

QuantiFERON[®]-TB Gold

(In-Tube -menetelmä)

**Kokoveren IFN-gammatesti
Mittausvasteet
ESAT-6-, CFP-10- ja TB7.7(p4)-peptidiantigeeneille**

**TUOTE-
SELOSTE**

In vitro diagnostiikkaan



SISÄLLYSLUETTELO

1. KÄYTTÖTARKOITUS	2
2. YHTEENVETO JA TESTIN KUVAUS	2
Testin periaatteet	3
Testin suorittamiseen tarvittava aika	3
3. REAGENSIT JA SÄILYTYS	4
Tarvittavat materiaalit (ei toimitettu)	4
Säilytysohjeet	5
Verinäytteen keräysputket	5
Reagenssipakkaus	5
Uudelleenliuotetut ja käyttämättömät reagenssit	5
4. VAROITUKSET JA HUOMAUTUKSET	6
Varoitukset	6
Huomautukset	7
5. NÄYTTEENOTTO JA KÄSITTELY	7
6. KÄYTTÖOHJEET	9
VAIHE YKSI - Veren inkubointi ja plasman keruu	9
VAIHE KAKSI - Ihmisen gammainterferonin (IFN- γ) ELISA	10
7. LASKELMAT JA TESTIN TULKINTA	13
Standardikäyrän muodostus	13
Testin laadunvalvonta	14
Tulosten tulkinta	15
8. RAJOITUKSET	19
9. TESTIN SUORITUSARVOT	19
10. TEKNISET TIEDOT	21
Määrittämättömät tulokset	21
Hyytyneet plasmanäytteet	21
ELISA-testin vianetsintä	22
Epämääräinen värin kehitys	22
Standardien matalat optisen tiheyden lukemat	22
Korkea tausta	23
Epälineaarinen standardikäyrä ja rinnakkaisotoksen vaihtelu	23
11. KIRJALLISUUS	24
12. TEKNINEN TUKI	25
13. TESTIMENETELMÄ LYHYESTI	26

1. KÄYTTÖTARKOITUS

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) on *in vitro* diagnostinen testi, jossa käytetään ESAT-6-, CFP-10- ja TB7.7(p4)-proteiineja muistuttavaa peptidiseosta heparinisoidun kokoveren solujen stimuloimiseen. Gammainterferonin (IFN- γ) havaitsemista ELISA-menetelmällä (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) käytetään tunnistamaan *in vitro* -vasteet *Mycobacterium tuberculosis* -tartunnalle ominaisten peptidiantigeenien kanssa.

QuantiFERON®-TB Gold IT on epäsuora *M. tuberculosis* -infektion (mukaan lukien itse sairaus) testi ja sitä käytetään yhdessä tartuntariskin arvioinnin, röntgenin ja muiden lääketieteellisten ja diagnostisten arvioiden kanssa.

2. YHTEENVETO JA TESTIN KUVAUS

Tuberkuloosi on tarttuva sairaus, jonka aiheuttaa *M. tuberculosis* -ryhmän organismit (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), jotka tyypillisesti leviävät uusiin isäntiin hengitysteiden tuberkuloosia sairastavien potilaiden hengittämien pisara-aerosolien välityksellä. Vastikään tartunnan saanut henkilö saattaa sairastua tuberkuloosiin viikkojen tai kuukausien kuluessa mutta useimmat tartunnan saaneet henkilöt pysyvät terveinä. Joillekin henkilöille jää latenttituberkuloosi-infektio (LTBI), tarttumaton oireeton tila, ja heille voi kehittyä tuberkuloosi kuukausia tai vuosia myöhemmin. LTBI:n diagnosoiminen päätarkoitus on lääkinnällisen hoidon tarpeen harkinta tuberkuloosin estämiseksi. Viime aikoihin saakka latentin tuberkuloosi-infektion (LTBI) diagnosoimiseen oli käytettävissä vain ihostesti (TST). Ihoherkkyys tuberkuloosille kehittyy 2–10 viikon sisällä infektiosta. Eräät infektoituneet henkilöt, erikoisesti sellaiset, joilla on laaja-alaisia immuunivasteita estäviä sairauksia, sekä myös muut henkilöt, joilla ei ole näitä sairauksia, eivät kuitenkaan vastaa tuberkuliiniin. Päinvastoin, eräät henkilöt, joilla *M. tuberculosis* -infektio on epätodennäköinen, osoittavat herkkyyttä tuberkuliinille ja heillä on muita positiivisia TST-tuloksia Calmette-Guérin (BCG) basillille, muun kuin *M. tuberculosis* -ryhmän lajeille tai muuten määrittämätön tulos muiden tekijöiden osalta.

LTBI on erotettava tuberkuloosista, raportoitavasta sairaudesta, johon yleensä liittyy keuhkojen ja alempien hengitysteiden sairaus, vaikkakin myös muissa elimissä voi olla oireita. Tuberkuloosi diagnosoidaan historiallisista, fyysisistä, radiologisista, histologisista ja mykobakteerologisista löydöksistä.

QuantiFERON®-TB Gold IT -testi testaa soluvälitteisen immuunivasteen (CMI) mykobakteeriproteiineja jäljitteleville peptidiantigeeneille. ESAT-6-, CFP-10- ja TB7.7(p4)-proteiinit puuttuvat BCG-kannoista ja useimmista ei-tuberkuliittisista mykobakteereista, joista poikkeuksena ovat *M. kansasii*, *M. szulgai* ja *M. marinum*.¹ Henkilöillä, joilla on *M. tuberculosis* -ryhmän lajin tartunta, on yleensä veressä lymfosyyttejä, joista voidaan tunnistaa nämä ja muut mykobakteeriset antigeenit. Tämä tunnistusprosessi koostuu sytokiinin, gammainterferonin (IFN- γ) muodostamisesta ja eristämisestä. Gammainterferonin (IFN- γ) havaitseminen ja sitä seuraava kvantifiointi muodostaa testin perustan.

QuantiFERON®-TB Gold IT -testissä käytetyt antigeenit muodostavat peptidiseoksen, joka jäljittelee ESAT-6-, CFP-10- ja TB7.7(p4)-proteiineja. Lukuisat tutkimukset ovat osoittaneet, että nämä peptidiantigeenit stimuloivat IFN- γ -vasteen *M. tuberculosis* -infektion saaneiden henkilöiden T-soluissa mutta ei yleensä tartuntaa saamattomilla tai BCG-rokotuksen saaneilla henkilöillä, joilla ei ole sairautta tai LTBI:n mahdollisuutta.¹⁻³² Immuunivastetta heikentävillä lääkinnällisillä hoidoilla tai sairauksilla saattaa olla IFN- γ -vastetta mahdollisesti heikentävä vaikutus. Potilaat, joilla on muita mykobakteeritartuntoja, saattavat vastata myös ESAT-6-, CFP-10- ja TB7.7(p4)-proteiineihin, sillä näitä proteiineja koodaavat geenit ovat läsnä myös *M. kansasii*-, *M. szulgai*- ja *M. marinum* -bakteereissa.^{1,23} QuantiFERON®-TB Gold IT -testi testaa sekä LTBI:tä ja auttaa diagnosoimaan *M. tuberculosis* -ryhmän aiheuttamia infektioita sairaisissa potilaissa. Positiivinen tulos tukee tuberkuloosin diagnosoimista. Myös muiden mykobakteerien (esim. *M. kansasii*) aiheuttamat infektiot saattavat kuitenkin aiheuttaa positiivisia tuloksia. Silloin tarvitaan muita lääketieteellisiä ja diagnostisia arviointia latentin tuberkuloosin vahvistamiseen tai poissulkemiseen.

Testin periaatteet

QuantiFERON®-TB Gold IT -järjestelmä käyttää erityisiä verinäytteen keräysputkia, joihin kerätään kokoverta. Verta inkuboidaan putkissa 16–24 tunnin ajan, jonka jälkeen plasma kerätään ja siitä testataan gammainterferonin (IFN- γ) peptidiantigeeneille tuottama vaste.

QuantiFERON®-TB Gold IT -testi suoritetaan kahdessa vaiheessa. Ensiksi kokoverta kerätään kuhunkin QuantiFERON®-TB Gold -veriputkeen, nollavertailuputkeen, TB-antigeeniputkeen ja valinnaiseen mitogeeniputkeen.

Mitogeeniputkea voidaan käyttää QuantiFERON®-TB Gold IT -testissä positiivisena vertailuna. Tämä saattaa olla erikoisesti tarpeen, jos henkilön immunologinen tila on epäselvä. Mitogeeniputken avulla voidaan myös valvoa veren keräämisen ja inkuboinnin oikeaa käsittelytapaa.

Putket tulee inkuboida 37 °C lämpötilassa mahdollisimman pian ja 16 tunnin sisällä verinäytteen keräämisestä. Putket sentrifugoidaan 16–24 tunnin inkubointijakson jälkeen, plasma erotetaan ja gammainterferonin (IFN- γ) (IU/ml) määrä mitataan ELISA-menetelmällä.

Testin katsotaan antavan positiivisen IFN- γ -vasteen TB-antigeeniputkessa, jonka arvo on huomattavasti yli nolla IFN- γ IU/ml -arvon. Jos käytetään mitogeeniputkea, stimuloitu plasmanäyte toimii gammainterferonin (IFN- γ) positiivisena kontrollina kussakin testatussa näytteessä. Matala vaste mitogeeniin (<0,5 IU/ml) osoittaa epäselvää tulosta, jos myös verinäytteessä on negatiivinen vaste TB-antigeeneille. Tämä malli voi ilmetä riittämättömien lymfosyyttien, näyteen väärän käsittelyn aiheuttaman vähentyneen lymfosyyttiaktiivisuuden, mitogeeniputken väärän täytön/sekoituksen tai potilaan lymfosyyttien gammainterferonituotantoon kykenemättömyyden vuoksi. Nollanäyte sopeutuu taustaan, heterofiilisiin vasta-ainevaikutuksiin tai epäspesifisiin IFN- γ -verinäytteisiin. Nollaputken IFN- γ -taso vähennetään TB-antigeeniputken ja mitogeeniputken (jos käytössä) IFN- γ -tasosta.

Testin suorittamiseen tarvittava aika

QuantiFERON®-TB Gold IT -testin suorittamiseen tarvittava aika on arvioitu jäljempänä. Myös useiden näytteiden erätestaus on kuvattu:

Verinäyteputkien inkubointi 37 °C lämpötilassa: 16 – 24 tuntia

ELISA-menetelmä:

Noin kolme tuntia yhdelle ELISA-maljalle
(28 – 44 henkilöä)

- <1 työtunti
- Kutakin maljaa kohti lisättävä 10–15 minuuttia

3. REAGENSIT JA SÄILYTYS

Tuberkuloosin ja vertailuantigeenin veriputket

Luettelonumero 0590 0301

- | | |
|--|--------------|
| 1. Nolla vertailu (harmaa korkki) | 100 x putkea |
| 2. TB-antigeeni (punainen korkki) | 100 x putkea |
| 3. Mitogeenivertailu (violetti korkki) | 100 x putkea |

HUOM: Putkia on satavana myös muina yhdistelminä:

Luettelonro 0590-0201: 100 x nollavertailu, 100 x TB-antigeeniputkea.

Luettelonro 0593 0201: 100 x mitogeenivertailuputkea.

Korkean paikan testien putkia (ks. osa 5)

Luettelonro 0590 0501: (Korkean paikan) 100 x nollavertailu, 100 x TB-antigeeniputkea.

Luettelonro 0590 0505: (Korkean paikan) 100 x nolla vertailu, 100 x TB-antigeeniputkea ja 100 x mitogeeniputkea.

Luettelonro T0593 0501 (korkean paikan) 100 x mitogeenivertailuputkea.

ELISA-komponentit

Luettelonumero 0594 0201

- | | |
|--|---------------|
| 1. Mikromaljojen liuskoja | 24 x 8 kaivoa |
| 2. Lyofilisoitu ihmisen gammainterferoni (IFN- γ), standardi | 1 x putki |
| 3. Vihreä liuotusaine | 1 x 30 ml |
| 4. Lyofilisoitu konjugaatti 100 x konsentraatti | 1 x 0,3 ml |
| 5. Pesupuskuri 20 x konsentraatti | 1 x 100 ml |
| 6. Entsyymi-substraattiliuos | 1 x 30 ml |
| 7. Entsyymin pysäytysliuos | 1 x 15 ml |

Tarvittavat materiaalit (ei toimitettu)

- 37 °C inkubaattori. Hiilidioksidia (CO₂) ei tarvita.
- Kalibroituja tilavuudeltaan vaihtelevia pipettejä 10 μ l – 100 μ l annosteluun, kertakäyttöiset kärjet
- Kalibroituja monikanavaisia pipettejä, joilla voidaan annostella 50 μ l ja 100 μ l, kertakäyttöiset kärjet.
- Mikromaljan ravistin.
- Deionisoitua tai tislattua vettä – 2 l.
- Mikromaljan pesulaite (suositellaan käytettäväksi automaattista pesulaitetta).
- Mikromaljan lukija, johon on kiinnitetty 450 nm suodatin ja 620 nm – 650 nm referenssisuodatin.

Säilytysohjeet

Verinäytteen keräysputket

- Verinäytteen keräysputkia on säilytettävä 4°C – 25°C lämpötilassa.
- QuantiFERON®-TB Gold verinäytteen keräysputkien säilytysaika on 15 kuukautta valmistuspäivästä, kun putkia säilytetään 4°C – 25°C lämpötilassa.

Reagenssipakkaus

- Pakkausta on säilytettävä 2°C – 8°C.
 - Entsyymi-substraattiliuosta on säilytettävä aina suoralta auringonvalolta suojattuna.
 - QuantiFERON®-TB Gold ELISA-pakkauksen säilytysaika on kolme vuotta valmistuspäivästä, kun pakkauksia säilytetään 2°C – 8°C lämpötilassa.

Uudelleenliuotetut ja käyttämättömät reagenssit

Ks. luvusta 6 ohjeet miten reagenssit liuotetaan uudelleen (sivu 11).

- Uudelleenliuotettua standardipakkausta voidaan säilyttää enintään kolme kuukautta, jos säilytys tapahtuu 2°C – 8°C lämpötilassa.
 - *Standardipakkauksen uudelleenliuotuspäivämäärä on merkittävä pakkaukseen.*
- Uudelleenliuotukset jälkeen käyttämättömät konjugaatti 100 x konsentraatit on palautettava 2°C – 8°C lämpötilan säilytykseen ja ne on myös käytettävä kolmen kuukauden sisällä sekoituksesta.
 - *Konjugaatin uudelleenliuotuspäivä on merkittävä pakkaukseen.*
- Käyttöpitoinen konjugaatti on käytettävä kuuden tunnin kuluessa valmistuksesta.
- Käyttöpitoista pesupuskuria voidaan säilyttää huonelämpötilassa enintään kaksi viikkoa.

4. VAROITUKSET JA HUOMAUTUKSET

Varoitukset

- Negatiivinen QuantiFERON®-TB Gold IT tulos ei poissulje *M. tuberculosis* -infektion tai tuberkuloosin mahdollisuutta. Vääriä negatiivisia tuloksia voi aiheutua infektiovaiheen (esim. näyte on otettu, ennen kuin solutason immuunivaste on kehittynyt), immuunitoimintoihin vaikuttavien samanaikaisten sairauksien, verinäytteen keräysputkien väärä käsittely laskimon avauksen jälkeen, testin väärin suorittamisen vuoksi tai muun immunologisen muuttujan vuoksi.
- Positiivinen QuantiFERON®-TB Gold IT -tulos ei saa olla ainoa tai perustava syy *M. tuberculosis* -infektion toteamiselle. Testin suorittaminen väärin saattaa aiheuttaa vääriä positiivisia tuloksia.
- Positiivisen QuantiFERON®-TB Gold IT -tuloksen jälkeen on jatkettava lääketieteellistä ja diagnostista aktiivisen tuberkuloosin esiintymisen mahdollisuuden arviointia (esim. AFB-näyte ja viljely, keuhkojen röntgenkuva).
- Koska ESAT-6-, CFP-10- ja TB7.7(p4)-proteiineja ei esiinny missään BCG-kannoissa eikä useimmissa ei-tuberkuloottisissa mykobakteereissa, on mahdollista, että positiivinen QuantiFERON®-TB Gold IT voi johtua *M. kansasii*-, *M. szulgai*- tai *M. marinum* -bakteerin aiheuttamasta infektiosta. Jos sellaista infektiota epäillään, vaihtoehtoisia testejä on suoritettava.

Huomautukset

- **In vitro diagnostiikkaan.**
- **Haitallista: Entsyymi-substraattiliuos** sisältää 3,3',5,5'-tetrametyyliibentsidiiniä, joka on haitallista nieltynä, hengitettynä ja ihokosketuksena. Ihoa ja silmiä ärsyttävää. Käytettävä suojalaseja, suojakäsineitä ja käsiteltävä mahdollisena karsinogeenina.
- **Haitallista: Entsyymien pysäytysliuos** sisältää rikkihappoa (H₂SO₄), joka on haitallista nieltynä, silmäkosketuksessa ja hengitettynä. Käytettävä suojalaseja, suojakäsineitä ja normaalia laboratorion suojavaatetusta. Jos pysäytysliuos joutuu kosketuksiin ihon tai silmien kanssa, aluetta on huuhdeltava runsaalla vesimäärällä ja hakeuduttava lääkärin hoitoon.
- **Haitallista: IFN- γ standardi ja konjugaatti 100 x konsentraatti** saattaa aiheuttaa epämukavuutta nieltynä ja voi aiheuttaa ihoärsytystä. Käytettävä suojakäsineitä ja normaalia laboratorion suojavaatetusta.
- **Ihmisverta on käsiteltävä mahdollisena infektion aiheuttajana.** Veren käsittelystä annettuja ohjeita on noudatettava.
- **Timerosaalia** käytetään säilöntäaineena joissain reagensseissa. Se voi olla myrkyllistä nieltynä, hengitettynä tai ihokosketuksessa.
- **Vihreä liuotusaine** sisältää normaalia hiiriseerumia ja kaseiinia, jotka saattavat aiheuttaa allergisia reaktioita. Vältettävä ihokosketusta.
- Pakkausselosteen ohjeista poikkeaminen saattaa aiheuttaa virheellisiä tuloksia. Ohjeet on luettava huolellisesti ennen käyttöä.
- Pakkausta ei saa käyttää, jos yksikin reagenssipullo osoittaa merkkejä vaurioista tai vuodosta ennen käyttöä.
- Älä sekoita tai käytä muita ELISA-reagensseja kuin QuantiFERON[®]-TB Gold -pakkauserien reagensseja.
- Käyttämättömät reagenssit ja biologiset näytteet on hävitettävä paikallisten, valtiollisten ja liittovaltion määräysten mukaisesti.
- Verinäytteen keräysputkia tai ELISA-pakkausta ei saa käyttää pakkaukseen merkityn viimeisen käyttöpäivän jälkeen.

5. NÄYTTEENOTTO JA KÄSITTELY

QuantiFERON®-TB Gold IT -testissä käytetään seuraavia keräysputkia:

1. Nollavertailu (harmaa korkki valkoisella renkaalla) (käytetään oltaessa merenpinnan ja 810 metrin korkeuden välillä merenpinnasta)
2. TB-antigeeni (punainen korkki valkoisella renkaalla) (käytetään oltaessa merenpinnan ja 810 metrin korkeuden välillä merenpinnasta)
3. Mitogeenivertailu - valinnainen (violetti korkki valkoisella renkaalla) (käytetään oltaessa merenpinnan ja 810 metrin korkeuden välillä merenpinnasta)
4. Nollavertailu (harmaa korkki jossa keltainen rengas) (käytetään oltaessa 1 020 metrin ja 1 875 metrin välillä merenpinnan korkeudesta)
5. TB-Antigeeni (punainen korkki jossa keltainen rengas) (käytetään oltaessa 1 020 metrin ja 1 875 metrin välillä merenpinnan korkeudesta)
6. Mitogeenivertailu - valinnainen (violetti korkki jossa keltainen rengas) (käytetään oltaessa 1 020 metrin ja 1 875 metrin välillä merenpinnan korkeudesta)

Antigeenit on kuivattu verinäytteen keräysputkien sisäpintoihin, joten on oleellista, että putkien sisältö sekoitetaan verellä kunnolla. Putket on siirrettävä 37 °C lämpötilaiseen inkubaattoriin mahdollisimman pian ja 16 tunnin sisällä näytteen keräämisestä.

Seuraavia toimia on noudatettava optimaalisten tulosten aikaansaamiseksi.

1. Kerää kultakin potilaalta 1 ml verta laskimopistoksella suoraan kuhunkin QuantiFERON®-TB Gold IT -testin verinäytteen keräysputkeen.

- Oltaessa enintään 810 metrin korkeudella merenpinnasta on käytettävä normaaleja QuantiFERON® verinäytteen keräysputkia. Oltaessa yli 1020 metrin korkeudella merenpinnasta on käytettävä korkean paikan (HA) QuantiFERON® verinäytteen keräysputkia.

Jos QuantiFERON® verinäytteen keräysputkia käytetään näiden korkeusrajojen ulkopuolella tai jos verta kertyy vain vähän, verinäyte voidaan imeä ruiskulla ja 1 ml verta voidaan siirtää kuhunkin kolmesta näyteputkesta. Turvallisuussyistä tämä on paras suorittaa irrottamalla ruiskun neula, noudattaen riittäviä varotoimia, ja irrottaa kunkin kolmen QFT-Gold IT verinäytteen keräysputken korkit ja lisätä 1 ml verta kuhunkin näyteputkeen (putken sivun mustan merkinnän tasolle). Korkit laitetaan takaisin paikoilleen kunnolla ja sekoitetaan alla kuvatulla tavalla.

- Koska 1 ml verta kertyy suhteellisen hitaasti, putkea on pidettävä neulassa kahden kolmen sekunnin ajan, kunnes putki näyttää täyttyneen kokonaan, jotta varmistetaan riittävän näyttemäärän keruu.

Musta merkki putkien sivussa osoittaa 1 ml:n täyttötilavuutta. QuantiFERON®-TB Gold verinäytteen keräysputket on hyväksytty 0,8–1,2 ml keräystilavuuksille. Jos jonkin putken verenpinta ei ole lähellä merkiviivaa, suositellaan ottamaan uusi verinäyte.

- Jos käytetään ns. perhosneulaa veren keräämiseen, on käytettävä puristusputkea, jotta varmistetaan, että putki on täyttynyt verellä, ennen kuin QuantiFERON®-TB Gold -putkia käytetään.

2. Putkea **sekoitetaan voimakkaasti viiden sekunnin ajan** (tai kymmenen kertaa), jotta varmistetaan, että **putken koko sisäpinta on peittynyt verellä**.

- Perusteellista sekoittamista tarvitaan, jotta varmistetaan putken sisällön täydellinen sekoittuminen vereen.
- Sekoituksen aikana on odotettavissa veren vaahtoamista. Tämä ei kuitenkaan vaikuta testin tulokseen eikä bioanalytiikan tarvitse ottaa sitä huomioon.

3. Putket on merkittävä asianmukaisesti.

4. Putket on siirrettävä 37 °C lämpötilaiseen inkubaattoriin mahdollisimman pian ja 16 tunnin sisällä näytteen keräämisestä. Verinäytteitä ei saa asettaa jääkaappiin tai pakastaa.

6. KÄYTTÖOHJEET

VAIHE YKSI - Veren inkubointi ja plasman keruu

Toimitetut materiaalit

QuantiFERON[®]-TB Gold IT verinäytteen keräysputket (ks. luku 3).

Tarvittavat materiaalit (ei toimitettu)

Ks. luku 3.

Toimintajärjestys

1. Jos verta ei inkuboida välittömästi keräämiseen jälkeen, **putkien sekoitus on toistettava välittömästi ennen inkubointia**, kuten kuvattu luvussa 5.
2. Putkia inkuboidaan **PYSTYASENNOSSA** 37°C lämpötilassa 16–24 tuntia. Inkubaattori ei tarvitse hiilidioksidia (CO₂) tai kostutinta.
3. Kun inkubointi on suoritettu 37 °C lämpötilassa, verinäytteen keräysputkia voidaan säilyttää 2°C – 27°C lämpötilassa ennen sentrifugointia.
4. Kun putkia on inkuboitu 37 °C lämpötilassa, plasman erottamista autetaan sentrifugoimalla putkia 15 minuutin ajan 2000 – 3000 RCF (g). Geelitulppa irrottaa solut plasmasta. Jos näin ei tapahdu, putket on sentrifugoitava uudelleen suuremmalla nopeudella.
 - Plasma voidaan koota ilman sentrifugointia. Siinä tapauksessa on kuitenkin käytettävä erityistä varovaisuutta plasmaa erotettaessa, jotta solut eivät vaurioidu.
5. Plasmanäytteet voidaan koota suoraan verinäytteen keräysputkista QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA-maljaan, erityisesti silloin, kun käytössä on automatisoitu ELISA-työasema.
6. Valinnaisesti plasmanäytteet voidaan laittaa säilytykseen ennen ELISAn suorittamista, joko sentrifugoituihin putkiin tai plasmasäiliöihin koottuna. Kerätään esimerkiksi >150 µl plasmaa mikromaljan kaivoihin tai telineessä oleviin mikroputkiin 96 kaivon muodossa ja maljat suljetaan roiskeiden ja haihtumisen estämiseksi, jos näytteet laitetaan säilytykseen.
 - Plasmanäytteitä voidaan säilyttää enintään neljä viikkoa 2°C – 8°C lämpötilassa tai kauemmin alle -20°C lämpötilassa (mielellään ei alle -70°C).

VAIHE KAKSI - Ihmisen gammainterferonin (IFN- γ) ELISA

Toimitetut materiaalit

QuantiFERON[®]-TB Gold IT ELISA-pakkaus (ks. luku 3).

Tarvittavat materiaalit (ei toimitettu)

Ks. luku 3.

Toimintajärjestys

1. Kaikki plasmanäytteet ja reagenssit, paitsi konjugaatti 100 x konsentraatti, on tuotava huonelämpötilaan (22 °C \pm 5 °C) ennen käyttöä. Tasaantumiselle on jätettävä aikaa vähintään tunti.
2. Irrotetaan liuskat, joita ei tarvita kehykseen, suljetaan foliopussi ja laitetaan takaisin jääkaappiin säilytettäväksi seuraavaa käyttöä varten.

QuantiFERON[®]-TB Gold Standardille tarvitaan vähintään yksi liuska ja riittävä määrä liuskoja kutakin testattavaa potilasta kohti (ks. kuvat 2A ja 2B 2-putken ja 3-putken osalta). Kehys ja kansi säilytetään käytön jälkeen käytettäväksi jäljelle jääneiden liuskojen kanssa.

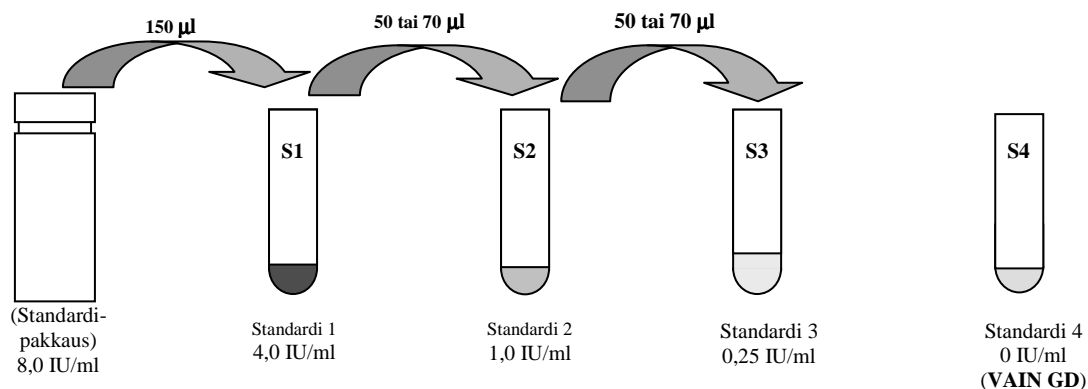
3. Liuotetaan uudelleen pakastettu standardipakkaus deionisoidulla tai tislatulla vedellä määrällä, joka on merkitty standarditestin pulloon. Sekoitetaan varovasti vaahtoamisen minimoimiseksi ja täydellisen liukenemisen varmistamiseksi. Standarditestin liuottaminen uudelleen merkittyyn tilavuuteen aikaan saa liuksen, jonka pitoisuus on 8,0 IU/ml.

Huom: Standardipakkauksen uudelleenliuotusvolyymi vaihtelee erien mukaan.

Uudelleenliuotettua standardipakkausta käytetään IFN- γ 1/ 4 liuotussarjojen muodostamiseen vihreällä liuotusaineella (GD) – ks. kuva 1. S1 (standardi 1) sisältää 4 IU/ml, S2 (standardi 2) sisältää 1 IU/ml, S3 (standardi 3) sisältää 0,25 IU/ml ja S4 (standardi 4) sisältää 0 IU/mL (vain vihreää liuotusainetta). Standarditestit on testattava vähintään kahtena otoksena.

KAHDEN TOISTOTESTISARJAN SUOSITELTU TOIMINTATAPA	KOLMEN TOISTOTESTISARJAN SUOSITELTU TOIMINTATAPA
<ol style="list-style-type: none">a. Merkitään neljä putkea S1, S2, S3, S4.b. Lisätään 150 μl vihreää laimennusliuosta putkiin S1, S2, S3, S4.c. Lisätään 150 μl standardipakkausta putkeen S1 ja sekoitetaan kunnolla.d. Siirretään 50 μl liuosta putkesta S1 putkeen S2 ja sekoitetaan kunnolla.e. Siirretään 50 μl liuosta putkesta S2 putkeen S3 ja sekoitetaan kunnolla.f. Pelkkä vihreä laimennusliuos (GD) toimii nollastandardina (S4).	<ol style="list-style-type: none">a. Merkitään neljä putkea S1, S2, S3, S4.b. Lisätään 150 μl vihreää laimennusliuosta putkeen S1.c. Lisätään 210 μl vihreää laimennusliuosta putkiin S2, S3, S4.d. Lisätään 150 μl standardipakkausta putkeen S1 ja sekoitetaan kunnolla.e. Siirretään 70 μl liuosta putkesta S1 putkeen S2 ja sekoitetaan kunnolla.f. Siirretään 70 μl liuosta putkesta S2 putkeen S3 ja sekoitetaan kunnolla.g. Pelkkä vihreä laimennusliuos (GD) toimii nollastandardina (S4).

KUVA 1. Standardikäyrän valmistelu.



- Kutakin ELISA-testiä varten valmistetaan standardipakkauksesta tuoreet laimennukset.
4. Pakastekuivattua konjugaatti 100 x konsentraattia sekoitetaan uudelleen 0,5 ml:aan deionisoitua tai tislattua vettä. Sekoitetaan varovasti vaahtoamisen minimoimiseksi ja konjugaatin täydellisen liukenemisen varmistamiseksi.

Käyttöpitoinen konjugaatti valmistetaan laimentamalla tarvittava määrä uudelleen sekoitettua konjugaatti 100 x konsentraattia vihreään liuotusaineeseen kuten taulukossa 1 - Konjugaatin valmistus, on kuvattu.

TAULUKKO 1. Konjugaatin valmistus.

LIUSKOJEN LUKUMÄÄRÄ	KONJUGAATTI 100 x KONSENTRAATIN VOLYYMI	VIHREÄN LIUOTUSAINEEEN VOLYYMI
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

- Sekoitettava huolellisesti vaahtoamisen estämiseksi.
 - Kaikki käyttämättömät konjugaatti 100 x konsentraatit on palautettava 2°C – 8°C lämpötilaan välittömästi käytön jälkeen.
 - Käytettävä vain vihreää liuotusainetta.
5. Ennen testiä plasmata on sekoitettava, jotta varmistetaan, että IFN- γ jakautuu tasaisesti näytteessä.
6. Lisätään 50 µl tuoretta käyttöpitoista konjugaattia vaadittuihin ELISA-kaivoihin monikanavaisen pipetin avulla.
7. Lisätään 50 µl testiplasmanäytettä asianmukaisesti kaivoihin monikanavapipeteillä (ks. alla suositeltu maljojen asettelu – kuvat 2A ja 2B). Lopuksi lisätään 50 µl kutakin standardeista 1–4.

**KUVA 2A. Suositeltu näyteasettelu nolla- ja TB-antigeeniputkille
(44 testiä maljaa kohti).**

	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 (standardi 1), S2 (standardi 2), S3 (standardi 3), S4 (standardi 4).
- 1N (näyte 1. nollavertailuplasma); 1A (näyte 1. TB-antigeeniplasma).

**KUVA 2B. Suositeltu näyteasettelu nolla-, TB-antigeeni- ja mitogeeniputkille
(28 testiä maljaa kohti).**

	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 (standardi 1), S2 (standardi 2), S3 (standardi 3), S4 (standardi 4).
- 1N (näyte 1. nollavertailuplasma), 1A (näyte 1. TB-antigeeniplasma), 1M (näyte 1. mitogeenivertailuplasma).

8. Konjugaattia ja plasmanäytteitä/standardeja sekoitetaan kunnolla mikromaljan sekoituslaitteella yhden minuutin ajan.

9. Kukin malja peitetään kannella ja inkuboidaan huonelämpötilassa ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) 120 ± 5 minuutin ajan.

- Maljoja ei saa altistaa suoralle auringonvalolle inkuboinnin aikana.

10. Inkuboinnin aikana laimennetaan yksi osa pesupuskurin 20 x konsentraattia 19 osaan deionisoitua tai tislattua vettä ja sekoitetaan kunnolla. Pesupuskuri 20 x konsentraattia on toimitettu riittävä määrä kahdelle litralle käyttöpitoista pesupuskuria.

Kaivot pestään **400 µl** käyttöpitoisella pesupuskurilla vähintään kuusi kertaa. Suositellaan käyttämään automatisoitua maljapesuria.

- Perusteellinen pesu on erittäin tärkeää testin onnistumiselle. Varmistettava, että kukin kaivo **täytetään kokonaan** pesupuskurilla kaivon yläreunaan saakka kunkin pesujakson aikana. Kunkin jakson välillä suositellaan suoritettavaksi viiden sekunnin liuotusjakso.
- Virtaussäiliöön on lisättävä normaalia laboratoriodien desinfiointiainetta ja mahdollisesti tarttuvan aineen käsittelyyn muodostettuja käytäntöjä on noudatettava.

11. Maljoja napautetaan imukykyiselle pyyhkeelle alassuun pesupuskurijäämien irrottamiseksi. Lisätään 100 µl entsyymisubstraattiliuosta kuhunkin kaivoon ja sekoitetaan kunnolla mikromaljan ravistimella.

12. Kukin malja peitetään kannella ja inkuboidaan huonelämpötilassa ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) 30 minuutin ajan.

- Maljoja ei saa altistaa suoralle auringonvalolle inkuboinnin aikana.
13. Kun 30 minuutin inkubointi on suoritettu, lisätään 50µl entsyymien pysäytysliuosta kuhunkin kaivoon ja sekoitetaan.
- Entsyymien pysäytysliuosta tulee lisätä kaivoihin samassa järjestyksessä ja suunnilleen samalla nopeudella kuin liuosta vaiheessa 11.
14. Mitataan kunkin kaivon optinen tiheys (OD) viiden minuutin sisällä reaktion pysäytyksen jälkeen mikromaljan lukijalla, johon on kiinnitetty 450nm suodatin ja 620–650nm referenssisuodatin. Optisen tiheyden arvoja käytetään tulosten laskennassa.

7. LASKELMAT JA TESTIN TULKINTA

Cellestis toimittaa QuantiFERON[®]-TB Gold IT -analyysiohjelmiston, jolla raakadata voidaan analysoida ja tulokset laskea.

Ohjelmisto suorittaa testin laadunvarmistusarvion, muodostaa standardikäyrän ja antaa testituloksen kullekin potilaalle kuten Tulosten tulkinta -osassa on kuvattu.

QuantiFERON[®]-TB Gold IT -analyysiohjelmistolla tehtävän analyysin asemesta tulokset voidaan määrittää seuraavalla tavalla.

Standardikäyrän muodostus

(jos QuantiFERON[®]-TB Gold IT -analyysiohjelmaa ei käytetä)

Määritetään standardipakkausten toisintojen optisen tiheyden arvot kussakin maljassa.

Muodostetaan $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standardikäyrä muodostamalla keskiarvoisen optisen tiheyden (y-akseli) $\log_{(e)}$ (y-axis) suhteessa standardien IFN- γ konsentraatioon IU/ml:ina (X-akseli) $\log_{(e)}$ ja jätetään nollastandardi pois näistä laskelmista. Lasketaan standardikäyrään parhaiten sopiva linja regressioanalyysin avulla.

Standardikäyrää käytetään määriteltäessä IFN- γ -konsentraatiopitoisuutta (IU/ml) kussakin testiplasmanäytteessä käyttämällä apuna kunkin näytteen optisen tiheyden arvoa.

Nämä laskelmat voidaan suorittaa mikromaljan lukijoiden mukana toimitettavilla ohjelmistoilla tai esimerkiksi taulukkolaskennalla (esim. Microsoft Excel). Suositellaan, että näitä ohjelmistoja käytetään regressioanalyysin, standardien variaatiokertoimien (%CV) ja standardikäyrän korrelaatiokertoimen (r) laskemiseen.

Testin laadunvalvonta

Testitulosten tarkkuus riippuu tarkan standardikäyrän luomisesta. Siksi standardeista johdetut tulokset on tarkistettava, ennen kuin testituloksia voidaan tulkita.

Jotta ELISA-tulos olisi kelvollinen:

- **Standardin 1 keskimääräisen optisen tiheyden tulee olla $\geq 0,600$.**
- **Standardin 1 ja 2 toistettujen optisten tiheyksien arvojen %CV on oltava $\leq 15\%$.**
- **Standardien 3 ja 4 rinnakkaisotosten optisten tiheyksien arvo ei saa poiketa yli 0,04 optisen tiheyden yksikköä näiden keskiarvosta.**
- **Keskimääräisistä imeytymisarvoista laskettujen korrelaatiokertoimien (r) on oltava $\geq 0,98$.**

QuantiFERON[®]-TB Gold -analyysiohjelmisto laskee ja raportoi nämä laadunvalvontaparametrit.

Jos edellä mainittuja kriteerejä ei täytetä, testierä ei kelpaa ja se on uusittava.

- **Nollastandardin (vihreän liuotusaineen) keskimääräisen optisen tiheyden on oltava $\leq 0,150$. Jos keskimääräinen optisen tiheyden arvo on $> 0,150$, maljojen pesuprosessi on tutkittava.**

Tulosten tulkinta

QuantiFERON®-TB Gold IT -tulokset tulkitaan seuraavien kriteerien mukaisesti:

HUOM: Tuberkuloosin diagnosoiminen tai poissulkeminen ja latentin tuberkuloosin mahdollisuuden arviointi vaatii epidemiologisia, historiallisia, lääketieteellisiä ja diagnostisia löydöksiä, jotka on huomioitava tulkittaessa QuantiFERON®-TB Gold IT -testin tuloksia.

JOS KÄYTETÄÄN VAIN NOLLA- JA TB-ANTIGEEENIPUTKIA

Nolla [IU/ml]	TB-antigeeni miinus nolla [IU/ml]	QuantiFERON®-TB [IU/ml]	Raportti/tulkinta
≤ 8,0	< 0,35	Negatiivinen	<i>M. tuberculosis</i> -infektio EI ole todennäköinen
	≥ 0,35 ja < 25 % nolla-arvosta		
	≥ 0,35 ja ≥ 25 % nolla-arvosta	Positiivinen¹	<i>M. tuberculosis</i> -infektio on todennäköinen
> 8,0 ²	Mikä tahansa	Määrittämätön³	Tulokset ovat riittämättömiä TB-antigeenin vasteen määrittämiseen.

¹ Silloin, kun *M. tuberculosis* -infektiota ei epäillä, alustavat positiiviset tulokset voidaan vahvistaa testaamalla uudelleen alkuperäiset

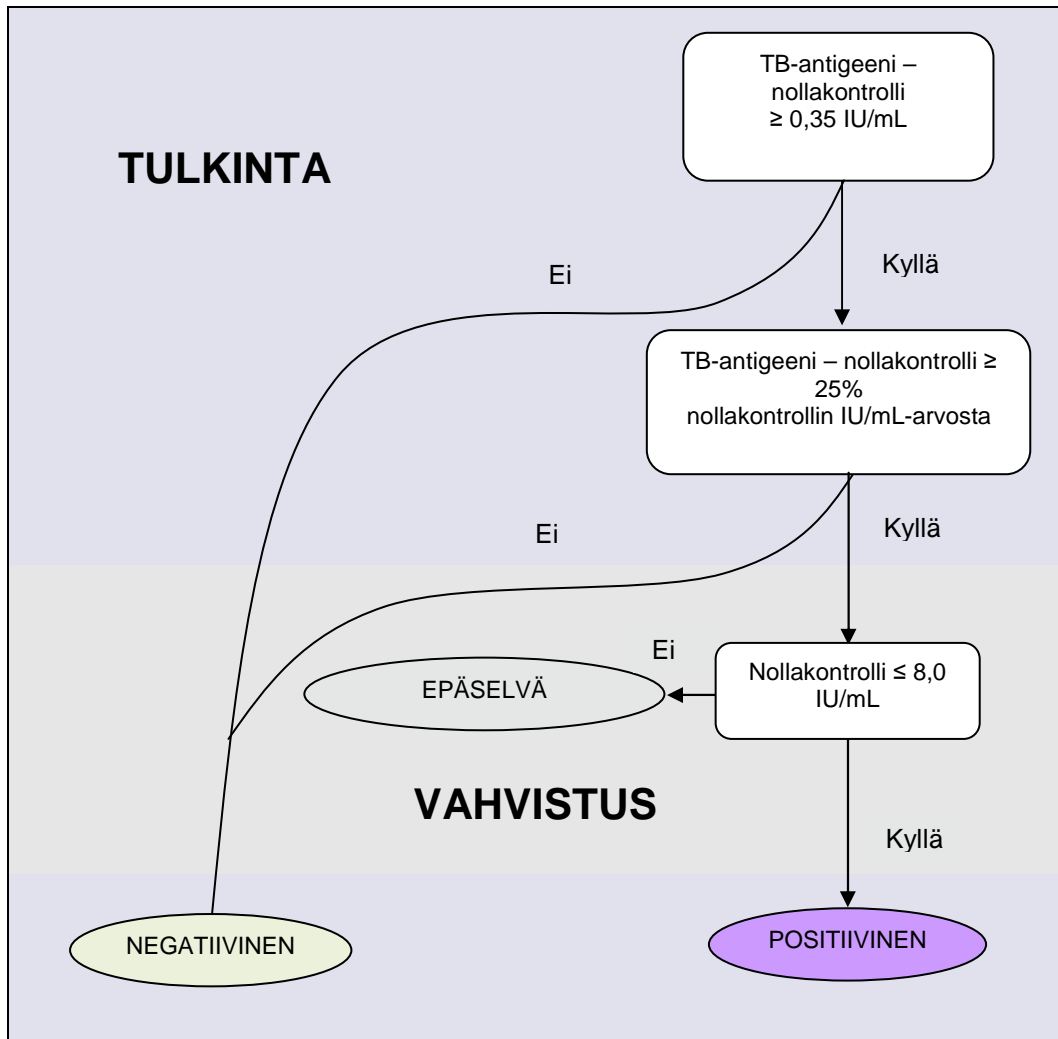
plasmanäytteet toisintoina QuantiFERON®-TB Gold ELISA -menetelmällä. Jos toistetun testin yksi tai molemmat toisinnot ovat positiivisia, henkilön testituloksen voidaan katsoa olevan positiivinen.

² Kliinisissä tutkimuksissa alle 0,25 % potilaista oli > 8,0 IU/ml IFN-γ-tasojä nollakontrollissa.

³ Mahdollisia syitä voi etsiä Vianetsintä-kappaleesta.

Mitatulla IFN-γ-tason voimakkuudella ei voida korreloida infekktion vaihetta tai astetta, immuunivasteen tasoa tai aktiivisen sairauden etenemisen mahdollisuutta.

KUVA 3. Tulkintavaihekaavio KUN käytössä NOLLA- ja TB-ANTIGEEENIPUTKET



KUN KÄYTÖSSÄ NOLLA-, TB-ANTIGEENI- ja MITOGEENIPUTKET

Nolla [IU/ml]	TB-antigeeni miinus nolla [IU/ml]	Mitogeeni miinus nolla [IU/mL] ¹	QuantiFERON®-TB [IU/ml]	Raportti/tulkinta
≤ 8.0	< 0,35	≥ 0,5	Negatiivinen	<i>M. tuberculosis</i> -infektio EI ole todennäköinen
	≥ 0,35 ja < 25 % nolla-arvosta	≥ 0,5		
	≥ 0,35 ja ≥ 25 % nolla-arvosta	Mikä tahansa	Positiivinen²	<i>M. tuberculosis</i> -infektio on todennäköinen
	< 0.35	< 0,5	Määrittämätön³	Tulokset ovat riittämättömiä TB-antigeenivasteen määrittämiseen
≥ 0,35 ja < 25 % nolla-arvosta	< 0,5			
> 8.0 ⁴	Mikä tahansa	Mikä tahansa		

¹ Vasteet mitogeenin positiiviseen vertailuun (ja joskus TB-antigeeniin) voivat yleisesti olla mikromaljan lukijan alueen ulkopuolella. Tällä ei ole vaikutusta testituloksiin.

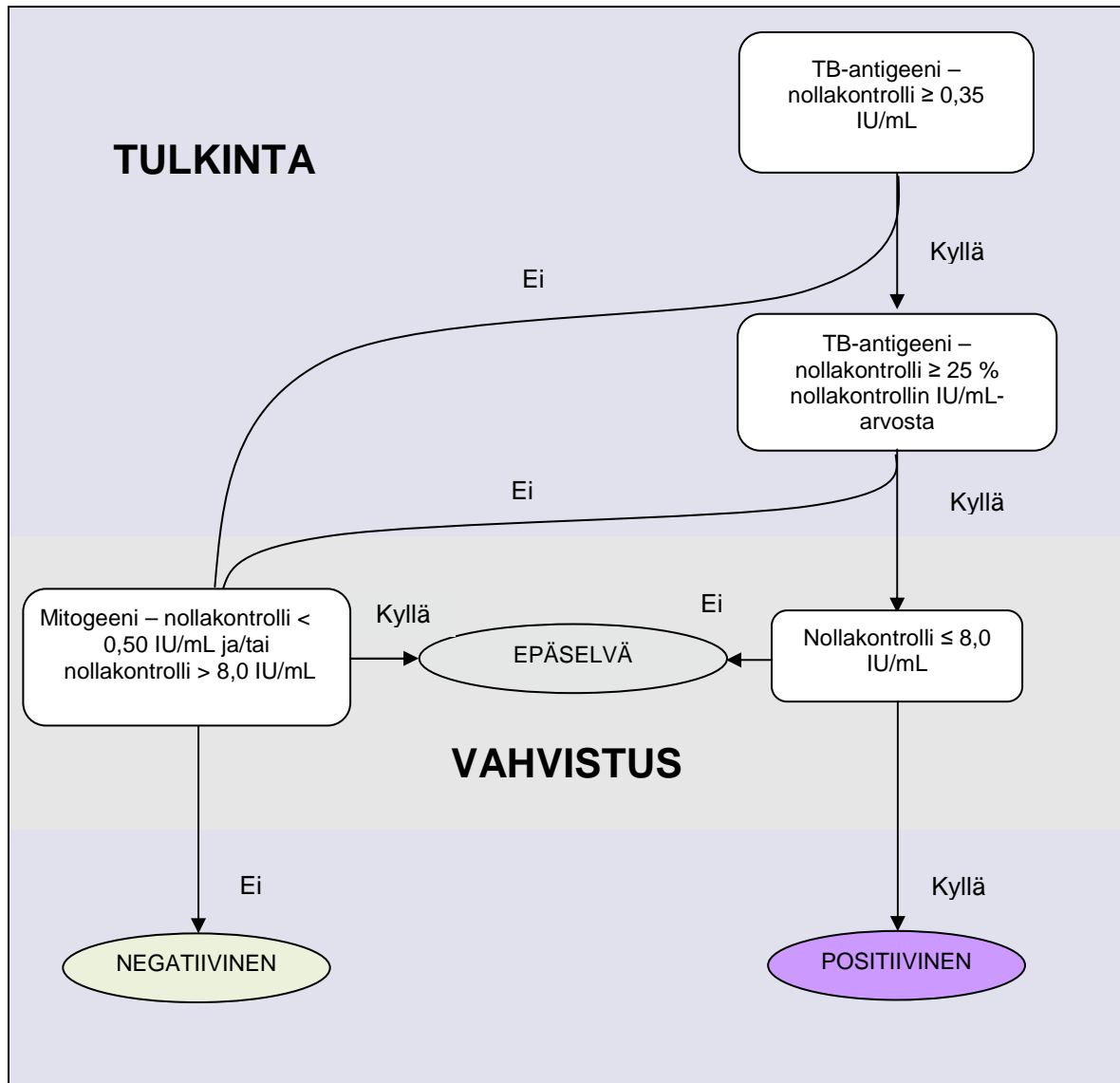
² Silloin, kun *M. tuberculosis* -infektiota ei epäillä, alustavat positiiviset tulokset voidaan vahvistaa testaamalla uudelleen alkuperäiset plasmanäytteet toisintoina QuantiFERON®-TB Gold ELISA -menetelmällä. Jos toistetun testin yksi tai molemmat toisinnot ovat positiivisia, henkilön testituloksen voidaan katsoa olevan positiivinen.

³ Mahdollisia syitä voi etsiä Vianetsintä-kappaleesta.

⁴ Kliinisissä tutkimuksissa alle 0,25 % potilaista oli > 8,0 IU/ml IFN-γ-tasoja nollakontrollissa.

Mitatulla IFN-γ-tason voimakkuudella ei voida korreloida infektion vaihetta tai astetta, immuunivasteen tasoa tai aktiivisen sairauden etenemisen mahdollisuutta.

KUVA 4. Tulkintavaihekaavio kun käytössä NOLLA-, TB-ANTIGEENI- ja MITOGEENIPUTKET



8. RAJOITUKSET

QuantiFERON®-TB Gold IT -testissä saatuja tuloksia on käytettävä yhdessä kunkin henkilön epidemiologisen historia, nykyisen lääketieteellisen tilan ja muiden diagnostisten arviointien kanssa.

Henkilöt, joiden nolla-arvot ovat suuremmat kuin 8 IU/ml, luokitellaan ”määrittämättömiksi”, koska 25 % korkeampi vaste TB-antigeeneihin voi olla testin mittausalueen ulkopuolella.

Epäluotettavia tai määrittämättömiä tuloksia voi syntyä, kun:

- poiketaan tuoteselosteessa kuvastuista toimintavaiheista
- verenkierrassa on suuria määriä gammainterferonia (IFN- γ) tai kehossa on heterofiilisiä vasta-aineita
- kun verinäytteen keräämisestä ennen inkubointia 37°C on kulunut yli 16 tuntia.

9. TESTIN SUORITUSARVOT

Kliiniset tutkimukset

Koska latentille tuberkuloosi-infektioille (LTBI) ei ole ehdotonta standardia, QuantiFERON®-TB Gold IT -testin herkkyyden ja spesifisyyden tarkkuutta ei voida käytännössä arvioida. QuantiFERON®-TB Gold IT -testin spesifisyys keskiarvoistettiin arvioimalla vääriä tuberkuloosi-infektion positiivisia lukemia matalan riskin (ei tunnettuja riskitekijöitä) henkilöillä Herkkyys keskiarvoistettiin arvioimalla potilasryhmiä, joilla oli viljelyllä vahvistettu aktiivinen tuberkuloosi.

Spesifisyys

Yhdysvaltalaisessa tutkimuksessa, johon osallistui 866 vapaaehtoista, verta kerättiin QuantiFERON®-TB Gold IT -testiä varten samalla, kun suoritettiin ihotestit (TST). Demograafiset tiedot ja tuberkuloosin riskikertoimet määritettiin testiajankohtana standarditutkimuksena. Vapaaehtoisista, joista 432 henkilöllä ei ollut tunnettuja riskitekijöitä sairastua *M. tuberculosis* -infektioon, saatiin QuantiFERON®-TB Gold IT- ja TST-tulokset 391 henkilöltä. Kukaan ei ollut saanut BCG-rokotetta. Toinen spesifinen tutkimus suoritettiin Japanissa QuantiFERON®-TB Gold IT -testillä matalan riskin henkilöillä, joista noin 90 % oli saanut BCG-rokotteen. Tulokset molemmista spesifisyystutkimuksista on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. QuantiFERON®-TB Gold IT -testin spesifisyys: Testitulokset henkilöillä, joilla ei ollut raportoitu *M. tuberculosis* -infektion vaaraa.

TUTKIMUS	BCG-tila % rokotettu	Testattuj a yhteensä	QFT-G määrittämätö n lkm	QFT-G positiivisten / hyväksytyjen testien lkm	QFT-G- spesifisyys (95% CI)	TST- positiivisten / testattujen lkm	TST*- spesifisyys (95% CI)
Yhdysvallat (julkaisemato n)	0 %	391	1	3 / 390	99,2 % (97,6–99,8)	6 / 391	98,5 % (96,5–99,4)
Japani (julkaise- maton)	~90 %	190	4	3 / 186	98,4 % (95–99,6)	-	-
YHTEENSÄ		581	5/584 (0,9 %)	6 / 576	99,0 %	-	-

*Käytettäessä 10 mm TST cut-off-arvoa. TST-testin spesifisyysarvio on 99,1 %, kun käytetään 15 mm cut-off-arvoa.

Herkyys aktiiviselle tuberkuloosille

Australiassa ja Japanissa testattiin tuberkuloosista epäiltyjä henkilöitä, jotka jälkeenpäin vahvistettiin *M. tuberculosis* -infektoituneiksi, QuantiFERON®-TB Gold IT -testin herkkyyden arvioimiseksi. Koska latentille tuberkuloosi-infektioille (LTBI) ei ole ehdotonta standarditestiä, sopivana korvaavana testinä käytettiin *M. tuberculosis* -bakteerin mikrobiologista viljelyä, koska sairastuneet potilaat ovat määritelmän mukaan infektoituneita. Potilaille oli annettu hoitoa alle kahdeksan päivän ajan, ennen kuin heiltä kerättiin verta QuantiFERON®-TB Gold IT -testiä varten.

Taulukossa 3 on esitetty yhteenvetona löydökset *M. tuberculosis* -viljelyssä positiivisten potilaiden kahdesta ryhmästä. QuantiFERON®-TB Gold IT -testin kokonaisherkyys aktiivisessa tuberkuloosissa oli 89 % (48/54).

Taulukko 3. QuantiFERON®-TB Gold IT -testi: Potilaat, joilla on viljelyllä vahvistettu *M. tuberculosis* -infektio.

TUTKIMUS		Sairauden vahvisti	QFT-Gold positiivisten / hyväksytyjen testien lkm	QFT-Gold-spesifisyys (95% CI)
Japanilaisilla TB-potilailla Validointitutkimus		Viljely	24 / 27	89 % (72–96 %)
Australialaisilla TB-potilailla Validointitutkimus	Pulmonaarinen	Viljely	7 / 10	70 % (40–89 %)
	Ekstrapulmonaarinen		17 / 17	100 % (82–100 %)
YHTEENSÄ			48 / 54	89 % (78–95 %)

LTBI-diagnoosit

Lukuisia tutkimuksia on julkaistu, joissa kuvataan QuantiFERON®-TB Gold IT -testin suoritusarvoja erilaisilla LTBI-riskin väestöryhmille. Joidenkin valittujen tutkimusten pääasialliset löydökset on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. Valikoima julkaistuja tutkimuksia QuantiFERON®-TB Gold IT -testistä LTBI-riskin väestöryhmissä.

TUTKIMUS	Testattuja yhteensä	Tulokset ja löydökset
Intialaiset HCW-potilaat (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Lähtökohtana erittäin korkeat TB-luvut. 40 % QFT-Gold IT positiivisia verrattuna 41 % TST -positiivisiin, cut-off 10 mm. Erittäin suuri korrelaation TST:n kanssa, BCG-rokotteella ei vaikutusta kummallakaan puolella. Molemmissa testeissä huomioitiin iän ja työskentelyn terveydenhoidossa aiheuttamat riskit.
Tanskalaiset HIV-potilaat (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	LTBI kokonaislevinneisyys QFT-Gold IT -testillä oli 4,6 % (27/590) HIV ⁺ henkilöistä. Positiiviset tulokset assosioitiin TB-riskeihin. Kahdella QFT-Gold IT -testissä positiivisella potilaalla sairaus eteni aktiiviseksi tuberkuloosiksi yhden vuoden aikana. Määrittämättömiä vasteita (n=20. 3,4 %) assosioitiin merkittävässä määrin CD4-lukemaan <100 / µl.
Sairaalahoidossa olevat lapset Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Lapsia, joilla epäiltiin tuberkuloosia tai joilla oli tuberkuloositartuntahistoria, testattiin QFT-Gold IT- ja TST-testeillä. 10,5 % QFT-Gold IT positiivisia verrattuna 9,5 % TST -positiivisiin, cut-off 10 mm. Testien välinen vastaavuus oli kokonaisuudessaan 95,2 % ja potilailla, jotka eivät olleet saaneet BCG-rokotetta 100 %.
Saksalaiset kontaktit (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Lähikontaktit 15 eri indeksitapauksessa testattiin. 51 % oli saanut BCG-rokotteen, 27 % oli syntyperältään ulkomaalaisia. 70 % BCG-rokotetuista ja 18 % rokottamattomista olivat TST-positiivisia (5 mm), kun taas 9 % ja 11 % olivat QFT-Gold IT -testissä positiivisia. QFT-Gold IT assosioitiin TB-riskin kanssa. TST-testi assosioitiin vain BCG-rokotuksen kanssa.

Lukuisat muut julkaisut kuvaavat QuantiFERON®-TB Gold- (QuantiFERON®-TB Gold IT -testin edeltäjä) ja the QuantiFERON®-TB Gold IT -testien vähemmän herkkien antigeeniliuosten suorituskykyä. Näissä tutkimuksissa on mm. käsitelty testien käyttöä aktiivisten TB-tapausten^{9, 11, 19, 25} kontaktien kanssa, lapsia^{6-10, 25, 28}, HIV positiivisia^{2, 5, 20}, terveydenhuollon työntekijöitä^{13, 26, 32}, immuunivajavuudesta kärsiviä^{3, 4, 22, 23, 27, 30, 31}, sekä TB-epäiltyjä^{7, 8, 10, 18} ja matalan riskin henkilöitä¹⁵.

Toistettavuus ja TST-testin vaikutus myöhemmin tehtävissä QuantiFERON®-TB Gold -testeissä

Osana Yhdysvaltoja koskenutta tutkimusta osa vapaaehtoisista testattiin uudelleen neljän viiden viikon kuluttua alkuperäisestä QuantiFERON®-TB Gold IT- ja TST-testistä. QuantiFERON®-TB Gold IT -testitulokset 260 vapaaehtoisesta olivat käytettävissä molempina ajankohtina ja yhteneväisyysprosentti oli 99,6 % (259/260). Aiempi TST-testi ei aiheuttanut positiivisia QuantiFERON®-TB Gold IT -vasteita.

10. TEKNISET TIEDOT

Määrittämättömät tulokset

Määrittämättömien tulosten pitäisi olla epätavallisia ja ne saattavat aiheuttaa testattavan henkilön immunologisesta tilasta mutta saattavat liittyä myös lukuisiin teknisiin tekijöihin:

- kun verinäytteen keräämisestä ennen inkubointia 37°C on kulunut yli 16 tuntia
- verta on säilytetty suositellun lämpötila-alueen (22°C ± 5°C) ulkopuolella
- verinäytteiden keräysputkien sekoittaminen on ollut riittämätöntä
- ELISA-maljoja ei ole pesty riittävän hyvin.

Jos epäillään teknisiä virhetekijöitä verinäytteiden käsittelyssä, koko QuantiFERON®-TB Gold IT -testi on toistettava uudella verinäytteellä. Stimuloidun plasman ELISA-testaus voidaan toistaa, jos epäillään riittämätöntä testimaljojen pesua tai muuta testipoikkeamaa ELISA-testissä. Matalista mitogeeniarvoista tai korkeista nolla-arvoista aiheutuvien määrittämättömien tuloksien ei voi odottaa muuttuvan testin toistolla, jos ELISA-testissä ei ole tapahtunut virhettä. Määrittämättömät tulokset tulee raportoida sellaisenaan. Lääkäri voi ottaa uuden näytteen tai suorittaa muita toimenpiteitä tarpeen mukaan.

Hyytyneet plasmanäytteet

Jos plasmanäytteitä kauan säilytettäessä syntyy fibriinihiyytymiä, näytteet on sentrifugoitava hyytyneen aineksen saostamiseksi ja plasman pipetoinnin helpottamiseksi.

ELISA-testin vianetsintä

Epämääräinen värin kehitys

MAHDOLLINEN SYY	RATKAISU
Maljoja ei ole pesty riittävän hyvin.	Maljat on pestävä pesupuskurilla vähintään kuudesti 400 µl / kaivo. Useampi kuin kuusi pesujaksoa saatetaan tarvita käytettävän pesurin mukaan. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään viiden sekunnin liuotusjakso.
ELISA-kaivojen ristikontaminaatio.	Pipetointi ja näytteen sekoitus on suoritettava huolella riskin minimoimiseksi.
Pakkaus / komponentit ovat ohittaneet viimeisen käyttöpäivämäärän.	Pakkauksen käyttö ennen käyttöajan umpeutumista on varmistettava. Varmistettava, että standardi ja konjugaatti x konsentraatti käytetään kolmen kuukauden sisällä uudelleenliuotuspäivämäärästä.
Entsyymi-substraattiliuos on kontaminoitunut.	Substraatti on hävitettävä, jos siinä näkyy sinistä väriä. Puhtaiden reagenssisäiliöiden käyttö on varmistettava.

Standardien matalat optisen tiheyden lukemat

MAHDOLLINEN SYY	RATKAISU
Standardin liuotusvirhe.	Varmistettava, että standardipakkauksen liuokset valmistetaan oikein tuoteselosteen mukaisesti.
Pipetointivirhe.	Pipettien kalibrointi ja käyttö valmistajan ohjeiden mukaan on varmistettava.
Inkubointilämpötila on liian matala.	ELISA-testin inkubointi on suoritettava huonelämpötilassa, 17°C – 27°C.
Inkubointiaika on liian lyhyt.	Konjugaatin, standardit ja näytteet sisältävän maljan inkubointiajan tulee olla 120 ± 5 minuuttia. Entsyymi-substraattiliuosta inkuboidaan maljassa 30 minuutin ajan.
Käytetty väärää maljan lukijan suodatinta.	Maljan luenta on tehtävä 450 nm suodattimella ja referenssisuodattimen on oltava 620–650 nm.
Reagenssit ovat liian kylmiä.	Kaikki reagenssit, paitsi konjugaatti 100 x konsentraatti, on otettava huonelämpötilaan ennen testin suorittamista. Tähän menee aikaa noin tunnin verran.
Pakkaus / komponentit ovat ohittaneet viimeisen käyttöpäivämäärän.	Pakkauksen käyttö ennen käyttöajan umpeutumista on varmistettava. Varmistettava, että standardi ja konjugaatti 100 x konsentraatti käytetään kolmen kuukauden sisällä uudelleenliuotuspäivämäärästä.

Korkea tausta

MAHDOLLINEN SYY	RATKAISU
Maljoja ei ole pesty riittävän hyvin.	Maljat on pestävä pesupuskurilla vähintään kuudesti 400 µl / kaivo. Useampi kuin kuusi pesujaksoa saatetaan tarvita käytettävän pesurin mukaan. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään viiden sekunnin liuotusjakso.
Inkubointilämpötila on liian korkea.	ELISA-testin inkubointi on suoritettava huonelämpötilassa, 17°C – 27°C.
Pakkaus / komponentit ovat ohittaneet viimeisen käyttöpäivämäärän.	Pakkauksen käyttö ennen käyttöajan umpeutumista on varmistettava. Varmistettava, että standardi ja konjugaatti 100 x konsentraatti käytetään kolmen kuukauden sisällä uudelleenliuotuspäivämäärästä.
Entsyymi-substraattiliuos on kontaminoitunut.	Substraatti on hävitettävä, jos siinä näkyy sinistä väriä. Puhtaiden reagenssisäiliöiden käyttö on varmistettava.

Epälineaarinen standardikäyrä ja rinnakkaisotoksen vaihtelu

MAHDOLLINEN SYY	RATKAISU
Maljoja ei ole pesty riittävän hyvin.	Maljat on pestävä pesupuskurilla vähintään kuudesti 400 µl / kaivo. Useampi kuin kuusi pesujaksoa saatetaan tarvita käytettävän pesurin mukaan. Jokaisen pesujakson välissä on suoritettava vähintään viiden sekunnin liuotusjakso.
Standardin liuotusvirhe.	Varmistettava, että standardipakkauksen liuokset valmistetaan oikein tuoteselosteen mukaisesti.
Huono sekoitus.	Reagenssit sekoitetaan kunnolla kääntelemällä putkea tai kevyesti pyöryttämällä niitä ennen maljaan lisäämistä.
Riittämätön pipetointitekniikka tai keskeytys testin suorituksessa.	Näytteen ja standardin lisääminen tulee suorittaa yhtäjaksoisesti. Kaikki reagenssit on oltava valmiina, ennen kuin testi aloitetaan.

Cellestis tai jälleenmyyjä voi toimittaa maksutta Tuotetiedot ja tekniset tiedot sisältävän CD-ROM-levyn, joka sisältää testimenetelmävideon.

11. KIRJALLISUUS

A comprehensive list of QuantiFERON[®]-TB Gold references is located on the Cellestis website (www.cellestis.com)

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. 62; 389-94.
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.

23. **Matulis, G., et al.** Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann Rheum Dis.* 2007. 67; 84-90.
24. **Mirtskhulava, V., et al.** Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 513-519.
25. **Nakaoka, H., et al.** Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis.* 2006. 12; 1383-8.
26. **Pai, M., et al.** Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. *JAMA.* 2005. 293; 2746-55.
27. **Ponce de Leon, D., et al.** 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.* 2008. 35; 776-81.
28. **Richeldi, L., et al.** Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur Respir J.* 2008. 32; 524-5.
29. **Rothel, J.S. and Andersen, P.** Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005. 3; 981-93.
30. **Schoepfer, A.M., et al.** Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2008. 103; 2799-806.
31. **Silverman, M.S., et al.** Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin Biochem.* 2007. 40; 913-5.
32. **Stebler, A., et al.** Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008. 29, 681-3.

12. TEKNINEN TUKI

Teknisen tuen yhteystiedot:

Cellestis International Pty Ltd: Puhelin: +61 3 9571 3500
 Faksi: +61 3 9571 3544
 Sähköposti: quantiferon@cellestis.com
 Internet: www.cellestis.com

Cellestis GmbH:
 (Eurooppa) Puhelin: +49 6151 428 59 - 0
 Faksi: +49 6151 428 59 - 110
 Sähköposti: europa@cellestis.com

13. TESTIMENETELMÄ LYHYESTI

VAIHE 1 – VEREN INKUBOINTI

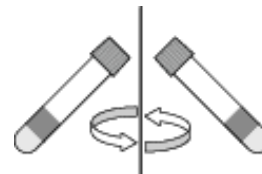
1. Potilaan verta otetaan veriputkeen ja putkea **sekoitetaan voimakkaasti viiden sekunnin ajan (tai kymmenen kertaa)**, jotta varmistetaan, että **putken koko sisäpuoli on peittynyt verellä**.



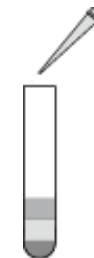
2. Putkia inkuboidaan **pystyasennossa 37 °C** lämpötilassa 16–24 tuntia.



3. Inkuboinnin jälkeen putkia sentrifugoidaan 5–15 minuuttia 2000–3000 g RCF (g) plasman ja punasolujen erottamiseksi.

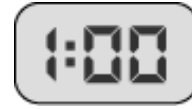


4. Sentrifugoinnin jälkeen kerätään plasmanäyte kustakin putkesta IFN- γ -kvantifikaatiota varten.



VAIHE 2 – IFN- γ ELISA

1. ELISA-komponenttien, lukuun ottamatta konjugaatti 100 x konsentraattia, annetaan tasaantua huonelämpötilassa vähintään tunnin ajan.

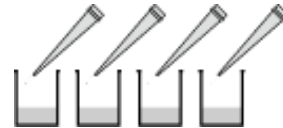


2. Standardipakkaus liuotetaan uudelleen 8,0 IU/ml vahvuiseksi tislatulla tai deionisoidulla vedellä. Valmistetaan neljä (4) standardiliuosta.

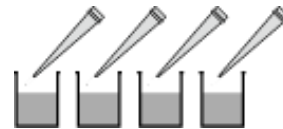


3. Liuotetaan konjugaatti 100 x konsentraatti tislatulla tai deionisoidulla vedellä.

4. Valmistetaan käyttöpitoinen liuos konjugaattia vihreään liuotusaineeseen ja lisätään sitä 50 μ l kaikkiin kaivoihin.



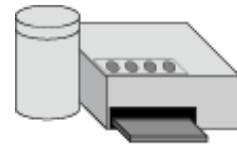
5. Lisätään 50 μ l testiplasmanäytteitä ja 50 μ l standardeja asianmukaisiin kaivoihin. Sekoitetaan sekoittimella.



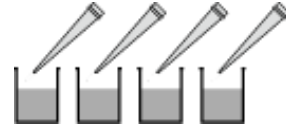
6. Inkuboidaan huonelämpötilassa 120 minuuttia.



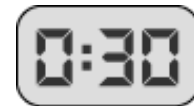
7. Kaivot pestään vähintään kuudesti 400 μ l / kaivo pesupuskurilla.



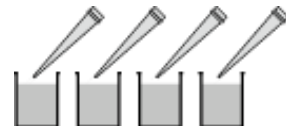
8. Lisätään 100 μ l entsyymisubstraattia kaivoihin. Sekoitetaan sekoittimella.



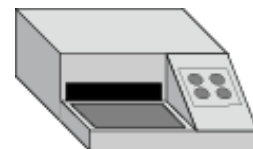
9. Inkuboidaan huonelämpötilassa 30 minuuttia.



10. Lisätään 50 μ l pysäytysliuosta kaikkiin kaivoihin. Sekoitetaan sekoittimella.



11. Luetaan tulokset 450 nm:n suodattimella ja 620–650 referenssisuodattimella.



12. Analysoidaan tulokset.





Valmistuttaja:

Cellestis Limited (Australia) ja Cellestis GmbH (Europe)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia
Puhelin (Australia) +61 3 9571 3500, (Eurooppa) +49 6151 428 59-0
Sähköposti: quantiferon@cellestis.com
Internet: www.cellestis.com

Asiakirjan numero 05990301C
August 2009

