

# ***QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold***

***(Μέθοδος σε Φιαλίδιο)***

**Εξέταση IFN-γ Πλήρους Αίματος  
Μετρώντας τις Αποκρίσεις στα Αντιγονικά Πεπτίδια  
ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4)**

**ΕΝΘΕΤΟ  
ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ**

Για Διαγνωστική Χρήση *In Vitro*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ	2
2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ	2
Βασικές Αρχές Της Ανάλυσης	3
Χρόνος Που Απαιτείται Για Την Ανάλυση	3
3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ	4
Υλικά Που Απαιτούνται (αλλά δεν παρέχονται)	4
Οδηγίες Φύλαξης	5
Φιαλίδια Συλλογής Αίματος	5
Αντιδραστήρια του Kit ELISA	5
Ανασυσταμένα και Αχρησιμοποίητα Αντιδραστήρια	5
4. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ	6
Προειδοποιήσεις	6
Προφυλάξεις	7
5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	8
6. ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ	10
ΠΡΩΤΟ ΣΤΑΔΙΟ - Επώαση Αίματος και Λήψη Πλάσματος	10
ΔΕΥΤΕΡΟ ΣΤΑΔΙΟ - Ανάλυση ELISA Ανθρώπινης IFN-γ	11
7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	14
Προετοιμασία Καμπύλης Βαθμονόμησης	14
Ποιοτικός Έλεγχος της Εξέτασης	15
Ερμηνεία Αποτελεσμάτων	16
8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ	20
9. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	20
10. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	22
Διφορούμενα Αποτελέσματα	22
Πηγμένα Δείγματα Πλάσματος	22
Αντιμετώπιση Προβλημάτων ELISA	23
Ακαθόριστη Ανάπτυξη Χρώματος	23
Χαμηλές Ενδείξεις Οπτικής Πυκνότητας στους Βαθμονομητές	23
Υψηλό Υπόβαθρο	24
Μη Γραμμική Καμπύλη Βαθμονομητή και Διακύμανση Επαναλήψεων	24
11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	25
12. ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ	26
13. ΣΥΝΤΟΜΕΥΜΕΝΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ	27

## 1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) είναι διαγνωστική μέθοδος *in vitro* που χρησιμοποιεί ένα απλό μίγμα πεπτιδίων που προσομοιώνονται με τις πρωτεΐνες ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4) για να διεγείρουν τα κύτταρα στο ηπαρινισμένο πλήρες αίμα. Ο εντοπισμός της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) με ανοσοπροσροφητική ανάλυση συνδεδεμένη με ένζυμο (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) χρησιμεύει στον εντοπισμό *in vitro* αντιδράσεων σε αυτά τα αντιγονικά πεπτίδια που συνδέονται με τη μόλυνση από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis*).

Το QuantiFERON®-TB Gold IT είναι μια έμμεση εξέταση για μόλυνση από το *M. tuberculosis* (συμπεριλαμβανόμενης και της νόσου) και προορίζεται για χρήση παράλληλα με την εκτίμηση κινδύνων, τη ραδιογραφία και άλλες ιατρικές και διαγνωστικές αποτιμήσεις.

## 2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η φυματίωση είναι μεταδοτική νόσος που προκαλείται από μόλυνση με οργανισμούς του *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), που συνήθως μεταφέρεται σε νέους ξενιστές αερογενώς με πυρήνες σταγονιδίων από ασθενείς με φυματίωση του αναπνευστικού συστήματος. Ένα άτομο που μόλις έχει μολυνθεί μπορεί να νοσήσει από φυματίωση σε εβδομάδες ή μήνες, αλλά τα περισσότερα μολυσμένα άτομα παραμένουν υγιή. Σε ορισμένα παραμένει μόλυνση από λανθάνουσα φυματίωση, μια μη μεταδοτική ασυμπτωματική πάθηση, και τα άτομα αυτά ίσως νοσήσουν από φυματίωση μήνες ή χρόνια αργότερα. Ο κύριος σκοπός της διάγνωσης φυματίωσης είναι η παροχή θεραπείας για να αποφευχθεί η φυματίωση. Μέχρι πρόσφατα η δερμοαντίδραση της φυματίωσης (TST ή Mantoux) ήταν η μοναδική μέθοδος διάγνωσης της λανθάνουσας φυματίωσης. Η δερματική ευαισθησία στη φυματίνη αναπτύσσεται 2 με 10 εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Ωστόσο, ορισμένα μολυσμένα άτομα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με ευρύ φάσμα παθήσεων που εμποδίζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, δεν αποκρίνονται στη φυματίνη. Αντίθετα, ορισμένα άτομα που δεν είναι πιθανό να έχουν μολυνθεί από το *M. tuberculosis* παρουσιάζουν ευαισθησία στη φυματίνη και έχουν θετικά αποτελέσματα έπειτα από εμβολιασμό με βάκιλο Calmette-Guérin (BCG), μόλυνση από μυκοβακτηρίδια εκτός του *M. tuberculosis complex*, ή άλλους απροσδιόριστους παράγοντες.

Η λανθάνουσα φυματίωση πρέπει να διαχωριστεί από τη φυματίωση, μια πάθηση που πρέπει να αναφέρεται και η οποία συνήθως επιδρά στους πνεύμονες και την άνω αναπνευστική οδό, αν και μπορούν να επηρεαστούν και άλλα οργανικά συστήματα. Η διάγνωση της φυματίωσης γίνεται με βάση το ιατρικό ιστορικό και φυσικές, ραδιολογικές, ιστολογικές και μυκοβακτηριδιακές εξετάσεις.

Η εξέταση QuantiFERON®-TB Gold IT είναι εξέταση για κυτταροεξαρτώμενη ανοσία (Cell Mediated Immunity - CMI) σε αντιγονικά πεπτίδια που προσομοιώνονται με μυκοβακτηριδιακές πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες, οι ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4), απουσιάζουν από όλα τα στελέχη BCG και από τα περισσότερα μη-φυματικά μυκοβακτηρίδια με εξαίρεση τα *M. kansasii*, *M. szulgai* και *M. marinum*.<sup>1</sup> Τα άτομα που έχουν μολυνθεί από οργανισμούς *M. tuberculosis* συνήθως έχουν λεμφοκύτταρα στο αίμα τους που αναγνωρίζουν αυτά και άλλα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα. Η διαδικασία αναγνώρισης γίνεται με την παραγωγή και έκκριση της κυτοκίνης ιντερφερόνης-γ (IFN-γ). Ο εντοπισμός και η επακόλουθη ποσοστοποίηση της IFN-γ αποτελούν τη βάση της παρούσας εξέτασης.

Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στο QuantiFERON®-TB Gold IT είναι ένα μίγμα πεπτιδίων που προσομοιώνονται με τις πρωτεΐνες ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα αντιγονικά πεπτίδια προκαλούν αποκρίσεις της IFN-γ σε T κύτταρα απόμων που έχουν μολυνθεί από *M. tuberculosis* αλλά συνήθως όχι από μη μολυσμένα άτομα ή άτομα εμβολιασμένα με BCG που δεν νοσούν ή που δεν κινδυνεύουν από λανθάνουσα φυματίωση.<sup>1-32</sup> Ωστόσο, ιατρικές θεραπείες ή παθήσεις που εμποδίζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν δυνητικά να μειώσουν την απόκριση της IFN-γ. Οι ασθενείς με ορισμένες άλλες μυκοβακτηριδιακές μολύνσεις πιθανώς να παρουσιάσουν και αυτοί ευαισθησία στα ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4), επειδή τα γονίδια, επάνω στα οποία βρίσκονται αυτές οι πρωτεΐνες, εμφανίζονται στα *M. kansasii*, *M. szulgai* και *M. marinum*.<sup>1,23</sup> Η εξέταση QuantiFERON®-TB Gold IT είναι τόσο εξέταση για λανθάνουσα φυματίωση όσο ένα χρήσιμο βοήθημα διάγνωσης μόλυνσης *M. tuberculosis complex* σε νοσούντες ασθενείς. Ένα θετικό αποτέλεσμα στηρίζει τη διάγνωση φυματίωσης, αλλά οι μολύνσεις από άλλα μυκοβακτηρίδια (π.χ. *M. kansasii*) μπορούν να επιφέρουν και αυτές θετικό αποτέλεσμα. Απαιτούνται και άλλες ιατρικές και διαγνωστικές εξετάσεις για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της φυματίωσης.

## **Βασικές Αργές της Ανάλυσης**

Η μέθοδος QuantiFERON®-TB Gold IT χρησιμοποιεί ειδικά φιαλίδια συλλογής αίματος που χρησιμεύουν στη λήψη πλήρους αίματος. Μετά από την επώαση εντός των φιαλιδίων για περίοδο 16 με 24 ωρών, γίνεται λήψη και εξέταση του πλάσματος για τον εντοπισμό της παρουσίας IFN-γ που παράχθηκε σε απόκριση στα αντιγονικά πεπτίδια.

Η εξέταση QuantiFERON®-TB Gold IT γίνεται σε δύο στάδια. Πρώτα, το πλήρες αίμα συλλέγεται σε καθένα από τα φιαλίδια συλλογής αίματος QuantiFERON®-TB Gold, τα οποία περιλαμβάνουν ένα φιαλίδιο Μηδενικού Ελέγχου, ένα φιαλίδιο Αντιγόνου Φυματίωσης και ένα προαιρετικό φιαλίδιο Μιτογόνου.

Το φιαλίδιο Μιτογόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί με την εξέταση QuantiFERON®-TB Gold IT σαν θετικός μάρτυρας. Αυτό ενδείκνυται ειδικά όταν υπάρχει αμφιβολία ως προς την ανοσία του ατόμου. Το φιαλίδιο Μιτογόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν έλεγχος για τον σωστό χειρισμό και τη σωστή επώαση του αίματος.

Τα φιαλίδια πρέπει να επωαστούν στους 37°C το συντομότερο δυνατόν, εντός 16 ωρών από τη συλλογή του αίματος. Μετά από περίοδο επώασης 16 με 24 ωρών, τα φιαλίδια φυγοκεντρίζονται, αφαιρείται το πλάσμα και η τιμή της IFN-γ (IU/mL) μετριέται μέσω ανάλυσης ELISA.

Μια εξέταση θεωρείται θετική όταν η απόκριση IFN-γ στο φιαλίδιο Αντιγόνου Φυματίωσης υπερβαίνει κατά πολύ τη μηδενική τιμή IFN-γ IU/mL. Εφόσον χρησιμοποιηθεί, το δείγμα πλάσματος που διεγείρεται από το Μιτογόνο χρησιμεύει ως θετικός έλεγχος IFN-γ για κάθε δείγμα που εξετάζεται. Μια χαμηλή απόκριση στο Μιτογόνο (<0.5 IU/mL) υποδηλώνει διαφορετικό αποτέλεσμα όταν το δείγμα αίματος παρουσιάζει επίσης αρνητική απόκριση στα αντιγόνα της φυματίωσης. Αυτό μπορεί να συμβεί σε περίπτωση ανεπάρκειας λεμφοκυττάρων, μειωμένης λεμφοκυτταρικής δραστηριότητας λόγω του κακού χειρισμού των δειγμάτων, λανθασμένου γεμίσματος/ανάμειξης του φιαλιδίου Μιτογόνου, ή επειδή τα λεμφοκύτταρα του ασθενή δεν μπορούν να παράγουν IFN-γ. Ο Μηδενικός Έλεγχος διορθώνει το υπόβαθρο, τις επιδράσεις των ετερόφιλων αντισωμάτων<sup>7</sup>, ή τη μη συγκεκριμένη IFN-γ στα δείγματα αίματος. Το επίπεδο της IFN-γ στο φιαλίδιο Μηδενικού Ελέγχου αφαιρείται από το επίπεδο IFN-γ στο φιαλίδιο Αντιγόνου Φυματίωσης και το φιαλίδιο Μιτογόνου (εφόσον χρησιμοποιηθεί).

## **Χρόνος που Απαιτείται για την Ανάλυση**

Ο εκτιμώμενος χρόνος που απαιτείται για τη μέθοδο QuantiFERON®-TB Gold IT παρουσιάζεται παρακάτω, μαζί με τον χρόνο ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων σε παρτίδες: με την μέθοδο Batch-Modus.

37°C Επώαση φιαλιδίων αίματος: 16 έως 24 ώρες

ELISA: Περίπου 3 ώρες για μια πλάκα ELISA (28 - 44 άτομα)

- <1 ώρα εργασίας
- Προσθέσετε 10 έως 15 ώρες για κάθε επιπλέον πλάκα

### 3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ

#### Φιαλίδια Συλλογής Αίματος Αντιγόνων Φυματίωσης και Ελέγχου

##### **Αρ. Καταλόγου 0590 0301**

- |   |                |
|---|----------------|
| 1. Μηδενικός Έλεγχος (Γκρίζο καπάκι)    | 100 x φιαλίδια |
| 2. Αντιγόνο Φυματίωσης (Κόκκινο καπάκι) | 100 x φιαλίδια |
| 3. Έλεγχος Μιτογόνου (Πορφυρό καπάκι)   | 100 x φιαλίδια |

*ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα φιαλίδια είναι διαθέσιμα και σε άλλους συνδυασμούς:*

*100 x φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου, 100 x φιαλίδια Αντιγόνου Φυματίωσης (Αρ. Κατ. 0590 0201)  
100 x φιαλίδια Ελέγχου Μιτογόνου (Αρ. Κατ. 0593 0201)*

*Αριθ. παραγγελίας 05900210: (για μεγάλα υψόμετρα) 100 φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου, 100 Tb φιαλίδια Αντιγόνου Φυματίωσης*

*Αριθ. παραγγελίας 05900505: (για μεγάλα υψόμετρα) 100 φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου, 100 Tb φιαλίδια Αντιγόνου Φυματίωσης και 100-x φιαλίδια Ελέγχου Μιτογόνου*

*Αριθ. παραγγελίας T0593 0502 (για μεγάλα υψόμετρα) 100 x φιαλίδια Ελέγχου Μιτογόνου*

#### Συστατικά ELISA

##### **Αρ. Καταλόγου 0594 0201**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. Ταινίες μικροπλακών                            | 24 x 8 θέσεις |
| 2. Ανθρώπινος λυοφιλοποιημένος βαθμονομητής IFN-γ | 1 x φιάλη     |
| 3. Πράσινο Αραιωτικό                              | 1 x 30mL      |
| 4. Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X, λυοφιλοποιημένο    | 1 x 0,3mL     |
| 5. Συμπυκνωμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 20X     | 1 x 100mL     |
| 6. Διάλυμα Ενζυμικού Υποστρώματος                 | 1 x 30mL      |
| 7. Ανασταλτικό Διάλυμα                            | 1 x 15mL      |

#### Υλικά Που Απαιτούνται (αλλά δεν παρέχονται)

- Κλίβανος 37°C. Δεν απαιτείται CO<sub>2</sub>.
- Βαθμονομημένες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου για διανομή 10μL - 1000μL με αναλώσιμα ρύγχη.
- Βαθμονομημένη πολυκάναλη πιπέτα για διανομή 50μL και 100μL με αναλώσιμα ρύγχη.
- Συσκευή ανάδευσης μικροπλακών.
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό - 2L.
- Συσκευή πλύσης μικροπλακών (συνιστάται αυτόματο πλυντήριο).
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών με φίλτρο 450nm και φίλτρο αναφοράς 620 - 650nm.

## **Οδηγίες Φύλαξης**

### *Φιαλίδια Συλλογής Αίματος*

- Φυλάσσετε τα φιαλίδια συλλογής αίματος στους 4 - 25°C.
- Η ημερομηνία λήξης των φιαλιδίων συλλογής αίματος QuantiFERON®-TB Gold είναι 15 μήνες από την ημερομηνία κατασκευής όταν φυλάσσονται στους 4 - 25°C.

### *Αντιδραστήρια του Κιτ*

- Φυλάσσετε το κιτ στους 2° - 8°C.
- Πάντα να προφυλάσσετε το Διάλυμα Ενζυμικού Υποστρώματος από την άμεση έκθεση στον ήλιο.
- Η ημερομηνία λήξης του κιτ QuantiFERON®-TB Gold IT ELISA είναι 3 έτη από την ημερομηνία κατασκευής όταν φυλάσσεται στους 2 - 8°C.

### *Ανασυσταμένα και Αχρησιμοποίητα Αντιδραστήρια*

Για οδηγίες ανασύστασης των αντιδραστηρίων, παρακαλούμε βλέπε την Ενότητα 6 (σελ. 9).

- Ο ανασυσταμένος Βαθμονομητής Κιτ διατηρείται μέχρι και 3 μήνες όταν φυλάσσεται στους 2 - 8°C.
  - Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του Βαθμονομητή Κιτ.
- Εφόσον ανασυσταθεί, το αχρησιμοποίητο Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X πρέπει να φυλαχτεί στους 2 - 8°C και επίσης να χρησιμοποιηθεί εντός 3 μηνών.
  - Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του Συζεύγματος.
- Το Σύζευγμα Εργασίας πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 6 ωρών από την παρασκευή του.
- Το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης Εργασίας μπορεί να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι και 2 εβδομάδες.

## 4. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

### Προειδοποιήσεις

- Ένα αρνητικό αποτέλεσμα εξέτασης QuantiFERON®-TB δεν αποκλείει την πιθανότητα μόλυνσης από *M. tuberculosis* ή φυματίωση: τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορούν να οφείλονται στο στάδιο μόλυνσης (π.χ. όταν το δείγμα λήφθηκε πριν αναπτυχθεί κυτταρική ανοσοαπόκριση), σε συννοσηρές παθήσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, στον λανθασμένο χειρισμό των φιαλιδίων συλλογής αίματος μετά τη φλεβοπαρακέντηση, στην εσφαλμένη εκτέλεση της ανάλυσης ή σε άλλες ανοσολογικές μεταβλητές.
- Ένα θετικό αποτέλεσμα εξέτασης QuantiFERON®-TB Gold IT δεν πρέπει να αποτελέσει την αποκλειστική ή καθοριστική βάση εξακρίβωσης της μόλυνσης από *M. tuberculosis*. Η εσφαλμένη εκτέλεση της ανάλυσης μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα.
- Ένα θετικό αποτέλεσμα εξέτασης QuantiFERON®-TB Gold IT πρέπει να ακολουθείται από παραπέρα ιατρική αποτίμηση και διαγνωστική αποτίμηση για ενεργό φυματίωση (π.χ. δείγμα AFB, ακτινογραφία θώρακα).
- Ενώ οι πρωτεΐνες ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4) απουσιάζουν από όλα τα στελέχη BCG και τα περισσότερα γνωστά μη-φυματικά μυκοβακτηρίδια, είναι δυνατόν ένα θετικό αποτέλεσμα QuantiFERON®-TB Gold IT να οφείλεται σε μόλυνση από *M. kansasii*, *M. szulgai* ή *M. marinum*. Αν υποψιάζεσθε τέτοια μόλυνση, πρέπει να γίνουν εναλλακτικές εξετάσεις.

## Προφυλάξεις

- **Για διαγνωστική χρήση in vitro.**
- **Επιβλαβές: Το Διάλυμα Ενζυμικού Υποστρώματος** περιέχει 3,3',5,5' τετρα-μεθυλ-βενζιδίνη που είναι επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης, όταν εισπνέεται και σε επαφή με το δέρμα. Ερεθίζει τα μάτια και το δέρμα. Μεταλλαξιογόνο. Να φοράτε γυαλιά ασφαλείας και γάντια και να το χειρίζεστε σαν πιθανό καρκινογόνο.
- **Επιβλαβές: Το Ανασχετικό Διάλυμα Enzyme** περιέχει H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> που είναι επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης, όταν εισπνέεται και σε επαφή με τα μάτια και το δέρμα. Να φοράτε γυαλιά ασφαλείας, γάντια και κανονικό προστατευτικό ρουχισμό εργαστηρίου. Αν έρθει σε επαφή με το δέρμα ή τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό και ζητήστε ιατρική συμβουλή.
- **Επιβλαβές: Ο Βαθμονομητής IFN-γ και το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X** μπορούν να προκαλέσουν δυσφορία σε περίπτωση κατάποσης και να προκαλέσουν ερεθισμό στο δέρμα. Να φοράτε γυαλιά ασφαλείας και κανονικό προστατευτικό ρουχισμό εργαστηρίου.
- **Χειρίζεστε το ανθρώπινο αίμα σαν να είναι ενδεχομένως μολυσματικό.** Ακολουθήστε τις σχετικές κατευθυντήριες οδηγίες για τον χειρισμό του αίματος.
- **Η θιμεροσάλη** χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε ορισμένα αντιδραστήρια. Μπορεί να είναι τοξική σε περίπτωση κατάποσης, όταν εισπνέεται και σε επαφή με το δέρμα.
- **Το Πράσινο Αραιωτικό** περιέχει κανονικό ορό ποντικού και καζεΐνη, που μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα.
- Η μη συμμόρφωση με τις οδηγίες του Ενθέτου Προϊόντος μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα. Παρακαλούμε διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες πριν από τη χρήση.
- Μην χρησιμοποιήσετε το κιτ αν οποιαδήποτε φιάλη αντιδραστηρίων φέρει ίχνη βλάβης ή διαρροής πριν από τη χρήση.
- Μην αναμειγνύετε και μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια ELISA προερχόμενα από διαφορετικές παρτίδες κιτ QuantiFERON®-TB.
- Η απόρριψη αχρησιμοποίητων αντιδραστηρίων και βιολογικών δειγμάτων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους τοπικούς, πολιτειακούς και εθνικούς κανονισμούς.
- Μην χρησιμοποιήσετε τα φιαλίδια συλλογής αίματος ή το κιτ ELISA μετά την ημερομηνία λήξης τους.

## 5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### Συλλογή αίματος

Το QuantiFERON®-TB Gold IT χρησιμοποιεί τα παρακάτω φιαλίδια συλλογής:

1. Μηδενικός Έλεγχος (γκρίζο καπάκι) (για υψόμετρα έως 810 μέτρα)
2. Αντιγόνο Φυματίωσης (Κόκκινο καπάκι) (για υψόμετρα έως 810 μέτρα)
3. Έλεγχος Μιτογόνου - προαιρετικό (μοβ καπάκι) (για υψόμετρα έως 810 μέτρα)
4. Μηδενικός Έλεγχος (γκρίζο καπάκι με κίτρινο δακτυλίδι) (για υψόμετρα μεταξύ 1020 και 1.875 μέτρων)
5. Αντιγόνο Φυματίωσης (κόκκινο καπάκι με κίτρινο δακτυλίδι) (για υψόμετρα μεταξύ 1020 και 1.875 μέτρων)
6. Έλεγχος Μιτογόνου - προαιρετικό (μοβ καπάκι με κίτρινο δακτυλίδι) (για υψόμετρα μεταξύ 1020 και 1.875 μέτρων)

Τα αντιγόνα δημιουργούν επίστρωση στα εσωτερικά τοιχώματα των φιαλιδίων συλλογής αίματος, συνεπώς το περιεχόμενο των φιαλιδίων πρέπει απαραίτητα να αναμιχθεί καλά με το αίμα. Τα φιαλίδια πρέπει να τοποθετηθούν σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C το συντομότερο δυνατόν, το αργότερο εντός 16 ωρών από τη συλλογή.

Η παρακάτω διαδικασία θα δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα:

1. Για κάθε άτομο συλλέξτε 1mL αίμα με φλεβοπαρακέντηση κατευθείαν σε καθένα από τα φιαλίδια συλλογής αίματος QuantiFERON®-TB Gold IT.

- Για υψόμετρα έως 810 μέτρα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα QuantiFERON® Standard φιαλίδια συλλογής αίματος. Σε υψόμετρα άνω των 1020 μέτρων πρέπει να χρησιμοποιούνται τα ειδικά για μεγάλα υψόμετρα QuantiFERON® φιαλίδια συλλογής αίματος

Στη περίπτωση που χρησιμοποιούνται QuantiFERON® φιαλίδια συλλογής αίματος εκτός των ως άνω ορίων υψόμετρου ή όταν η λήψη αίματος αποφέρει μικρή ποσότητα αίματος, το αίμα μπορεί να συλλεχθεί διά της χρησιμοποίησης μίας σύριγγας και να μεταφερθεί από 1mL στο καθένα από τα τρία φιαλίδια. Για λόγους ασφαλείας ο καλύτερος τρόπος για να γίνει αυτό είναι να βγει η βελόνα της σύριγγας, εξασφαλίζοντας έτσι τις κατάλληλες διαδικασίες ασφαλείας, να αφαιρεθούν τα καπάκια από τα τρία φιαλίδια QFT-Gold IT και να προστεθεί από 1mL σε κάθε φιαλίδιο (μέχρι το μαύρο σημείο στην πλευρά της ετικέτας του φιαλιδίου). Τοποθετείστε ξανά τα καπάκια και κλείστε τα ασφαλώς και ανακατέψτε το περιεχόμενο των φιαλιδίων, όπως περιγράφεται παρακάτω.

- Επειδή τα φιαλίδια 1mL λαμβάνουν το αίμα σχετικά αργά, παρακαλείσθε να κρατήσετε το φιαλίδιο στη βελόνα για 2-3 δευτερόλεπτα παραπάνω από όταν θα φαίνεται πως έχει γεμίσει, για να εξασφαλίσετε τη λήψη του σωστού όγκου.

*Το μαύρο σημείο στην πλευρά του φιαλιδίου δείχνει τον όγκο πληρότητας 1mL. Τα φιαλίδια συλλογής αίματος QuantiFERON®-TB Gold έχουν ελεγχθεί για όγκους από 0,8 - 1,2mL. Αν το επίπεδο του αίματος σε οποιοδήποτε φιαλίδιο δεν προσεγγίζει τη γραμμή πληρότητας, συνιστάται η λήψη άλλου δείγματος αίματος.*

- Αν η αιμοληψία γίνεται μέσω βελόνας-πεταλούδας, πρέπει να χρησιμοποιηθεί άδειο φιαλίδιο για να σιγουρευτείτε ότι ο σωλήνας είναι γεμάτος αίμα, πριν τοποθετηθούν επάνω της τα φιαλίδια QuantiFERON®-TB Gold.

2. Αναμίξτε τα φιαλίδια **ανακινώντας τα δυνατά για 5 δευτερόλεπτα** (ή 10 φορές ανακίνηση πάνω-κάτω). Σιγουρευτείτε, ότι **ολόκληρη η εσωτερική επιφάνεια του φιαλιδίου** έχει επικαλυφθεί με αίμα.

- Απαιτείται προσεκτική ανάμειξη για να εξασφαλιστεί η πλήρης ενσωμάτωση των περιεχομένων του φιαλιδίου στο αίμα.
  - Κατά την ανακίνηση πρέπει να αναμένεται κάποιος σχηματισμός αφρού. Αυτό δεν επηρεάζει αρνητικά την απόδοση της εξέτασης και δεν αποτελεί λόγο ανησυχίας
3. Τοποθετήσετε ετικέτες στα φιαλίδια.
  4. Τα φιαλίδια πρέπει να μεταφερθούν σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C το συντομότερο δυνατόν, το αργότερο εντός 16 ωρών από τη συλλογή. Πριν την επώαση διατηρείστε τα φιαλίδια σε θερμοκρασία δωματίου (22°C ± 5°C). Μην φυλάξετε τα δείγματα αίματος σε ψυγείο ή κατάψυξη!

## 6. ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

### Πρώτο Στάδιο - Επώαση αίματος και λήψη πλάσματος

#### Παρεχόμενα Υλικά

Φιαλίδια συλλογής αίματος QuantiFERON®-TB Gold IT (Βλέπε Ενότητα 3).

#### Υλικά που απαιτούνται (αλλά δεν παρέχονται)

Βλέπε Ενότητα 3.

#### Διαδικασία

1. Αν το αίμα δεν επωαστεί αμέσως μετά τη λήψη του, **η ανάμειξη των φιαλιδίων πρέπει να επαναληφθεί αμέσως πριν την επώαση**, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 5.
2. Τα φιαλίδια επωάζονται **ΟΡΘΙΑ** στους 37°C για 16 - 24 ώρες. Ο κλίβανος δεν χρειάζεται CO<sub>2</sub> ή να είναι υγρός.
3. Μετά την επώαση στους 37°C, τα φιαλίδια συλλογής αίματος μπορούν να διατηρηθούν στους 2 - 27°C μέχρι και 3 ημέρες πριν τη φυγοκέντρησή τους.
4. Μετά την επώαση των φιαλιδίων στους 37°C, η λήψη του πλάσματος διευκολύνεται με τη φυγοκέντρωση των φιαλιδίων για 15 λεπτά σε 2000 - 3000 RCF (g). Το βύσμα γέλης διαχωρίζει τα κύτταρα από το πλάσμα. Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να επαναληφθεί η φυγοκέντρωση σε υψηλότερη ταχύτητα.
  - Είναι δυνατόν να γίνει λήψη του πλάσματος χωρίς φυγοκέντρωση, αλλά απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αφαιρεθεί το πλάσμα χωρίς να στροβιλισθούν τα κύτταρα.
5. Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να μεταφερθούν κατευθείαν από τα φιαλίδια συλλογής αίματος στην πλάκα ELISA QuantiFERON®-TB Gold, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται αυτόματοι σταθμοί εργασίας ELISA.
6. Εναλλακτικά, τα δείγματα πλάσματος μπορούν να φυλαχτούν πριν από την ανάλυση ELISA, είτε στα φυγοκεντρισμένα φιαλίδια είτε σε δοχεία πλάσματος. Π.χ. μεταφέρετε >150μL πλάσματος σε θέσεις μικροπλακών ή μικροφιαλίδια σε πλαίσιο στήριξης σε διάταξη 96 θέσεων, και σφραγίστε τα για να αποφευχθεί το χύσιμο ή η εξάτμισή τους αν πρόκειται να φυλαχτούν.
  - Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να αποθηκευτούν έως και 4 εβδομάδες στους 2 - 8°C, ή υπό τους -20°C (ιδανικά λιγότερο από -70°C) για εκτεταμένες περιόδους.

## Δεύτερο Στάδιο - Ανάλυση ELISA Ανθρώπινης IFN-γ

### Παρεχόμενα Υλικά

Κιτ QuantiFERON®-TB Gold ELISA (Βλέπε Ενότητα 3).

### Υλικά που απαιτούνται (αλλά δεν παρέχονται)

Βλέπε Ενότητα 3.

### Διαδικασία

1. Φέρετε όλα τα δείγματα πλάσματος και τα αντιδραστήρια, εκτός από το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X, σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) πριν από τη χρήση. Αφήσετε τα να ισορροπήσουν με τη θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 60 λεπτά.
2. Αφαιρέστε τις μη απαιτούμενες ταινίες από το πλαίσιο στήριξης, ξανασφραγίστε τις στη σακούλα και φυλάξτε τις στο ψυγείο μέχρι να χρειαστούν.

Επιλέξτε τουλάχιστον μια ταινία για τους Βαθμονομητές QuantiFERON®-TB Gold και επαρκείς ταινίες για τον αριθμό ατόμων που εξετάζονται (βλ. Εικόνες 2A & 2B για εξετάσεις με δύο και τρία φιαλίδια αντίστοιχα). Μετά από τη χρήση κρατήστε το πλαίσιο στήριξης και το καπάκι για να τα χρησιμοποιήσετε με τις υπόλοιπες ταινίες.

3. Ανασυστήστε τον λυοφιλοποιημένο Βαθμονομητή Κιτ με τον όγκο απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού που εμφανίζεται στην ετικέτα της φιάλης Βαθμονομητή. Αναδεύστε απαλά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού και να επιτευχθεί πλήρης διαλυτότητα. Η ανασύσταση του Βαθμονομητή στον καθορισμένο όγκο θα παράγει διάλυμα συγκέντρωσης 8,0 IU/mL.

**Σημείωση: Ο όγκος ανασύστασης του Βαθμονομητή Κιτ διαφέρει ανάλογα με το βάρος!**

Χρησιμοποιήστε τον ανασυσταμένο Βαθμονομητή Κιτ για την παραγωγή μια σειράς διαλύματος IFN-γ σε Πράσινο Αραιωτικό (ΠΑ)σε αναλογία 1 προς 4 – βλ. Εικόνα 1. Το S1 (Βαθμονομητής 1) περιέχει 4 IU/mL, το S2 (Βαθμονομητής 2) περιέχει 1 IU/mL, το S3 (Βαθμονομητής 3) περιέχει 0,25 IU/mL, και το S4 (Βαθμονομητής 4) περιέχει 0 IU/mL (μόνο ΠΑ). Οι βαθμονομητές πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον εις διπλούν.

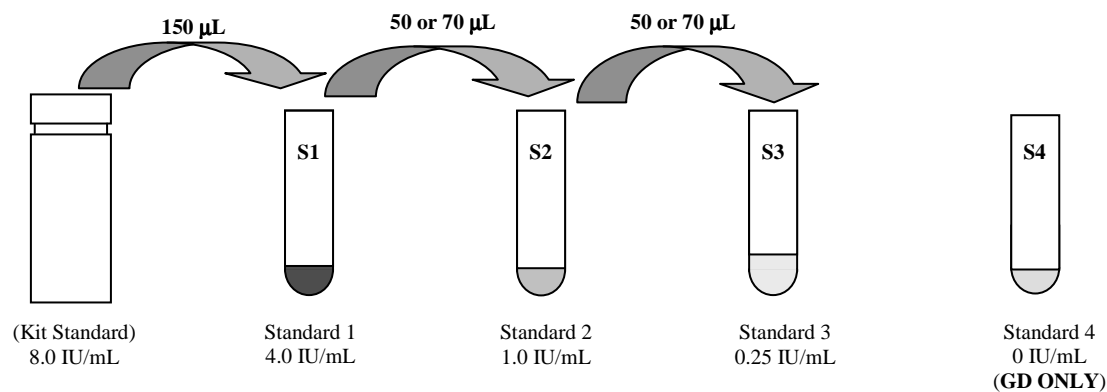
#### ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ΕΙΣ ΔΙΠΛΟΥΝ

- a. Προσδιορίσετε 4 φιαλίδια με ετικέτες "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Προσθέσετε **150μL** ΠΑ στα S1, S2, S3, S4.
- c. Προσθέσετε **150μL** Βαθμονομητή Κιτ στο S1 και αναμείξετε καλά.
- d. Μεταφέρετε **50μL** από το S1 στο S2 και αναμείξετε καλά.
- e. Μεταφέρετε **50μL** από το S2 στο S3 και αναμείξετε καλά.
- f. Το ΠΑ από μόνο του αποτελεί τον μηδενικό βαθμονομητή (S4).

#### ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ΕΙΣ ΤΡΙΠΛΟΥΝ

- a. Προσδιορίσετε 4 φιαλίδια με ετικέτες "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Προσθέσετε **150μL** ΠΑ στο S1.
- c. Προσθέσετε **210μL** ΠΑ στα S2, S3, S4.
- d. Προσθέσετε **150μL** Βαθμονομητή Κιτ στο S1 και αναμείξετε καλά
- e. Μεταφέρετε **70μL** από το S1 στο S2 και αναμείξετε καλά.
- f. Μεταφέρετε **70μL** από το S2 στο S3 και αναμείξετε καλά.
- g. Το ΠΑ από μόνο του αποτελεί τον μηδενικό βαθμονομητή (S4).

### ΕΙΚΟΝΑ 1. Προετοιμασία Καμπύλης Βαθμονόμησης



- Παρασκευάστε φρέσκα διαλύματα του Βαθμονομητή Κιτ για κάθε ανάλυση ELISA.
4. Ανασυστήσετε το λυοφιλοποιημένο Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X με 0,3mL απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Αναδεύσετε απαλά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού και να επιτευχθεί η πλήρης διαλυτότητα του Συζεύγματος.

Το σύζευγμα εργασίας παρασκευάζεται με τη διάλυση του απαιτούμενου ποσού λυοφιλοποιημένου Συμπυκνωμένου Συζεύγματος 100X σε Πράσινο Αραιωτικό όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 - Παρασκευή Συζεύγματος.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Παρασκευή Συζεύγματος

ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΑΙΝΙΩΝ	ΟΓΚΟΣ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 100X	ΟΓΚΟΣ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΑΡΑΙΩΤΙΚΟΥ
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

- Αναδεύσετε καλά αλλά απαλά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού.
  - Φυλάξτε το εναπομείνον Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X στους 2 - 8°C αμέσως μετά τη χρήση.
  - Χρησιμοποιείστε μόνο Πράσινο Αραιωτικό.
5. Πριν από την ανάλυση, τα πλάσματα πρέπει να αναμειχθούν για να εξασφαλιστεί η ίση κατανομή της IFN-γ σε ολόκληρο το δείγμα.
6. Διανείμετε 50µL φρέσκου παρασκευασμένου συζεύγματος εργασίας στις απαιτούμενες θέσεις ELISA με πολυκάναλη πιπέτα.

7. Διανείμετε 50μL δειγμάτων πλάσματος προς εξέταση στις κατάλληλες θέσεις με πολυκάναλη πιπέτα (Βλ. προτεινόμενη διάταξη πλάκας παρακάτω - Εικόνες 2A & 2B). Τέλος, προσθέστε 50μL από τον κάθε Βαθμονομητή 1 έως 4.

**ΕΙΚΟΝΑ 2Α. Προτεινόμενη Διάταξη Δειγμάτων για τα Φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου και Αντιγόνου Φυματίωσης**  
(44 εξετάσεις ανά πλάκα )

	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 (Βαθμονομητής 1), S2 (Βαθμονομητής 2), S3 (Βαθμονομητής 3), S4 (Βαθμονομητής 4).
- 1N (Δείγμα 1. Πλάσμα Μηδενικού Ελέγχου), 1A (Δείγμα 1. Πλάσμα Αντιγόνου Φυματίωσης).

**ΕΙΚΟΝΑ 2Β. Προτεινόμενη Διάταξη Δειγμάτων για τα Φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου, Αντιγόνου Φυματίωσης και Μιτογόνου**  
(28 εξετάσεις ανά πλάκα)

	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 (Βαθμονομητής 1), S2 (Βαθμονομητής 2), S3 (Βαθμονομητής 3), S4 (Βαθμονομητής 4).
- 1N (Δείγμα 1. Πλάσμα Μηδενικού Ελέγχου), 1A (Δείγμα 1. Πλάσμα Αντιγόνου Φυματίωσης), 1M (Δείγμα 1. Πλάσμα Ελέγχου Μιτογόνου).

8. Αναδεύσετε το σύζευγμα και τα δείγματα πλάσματος/βαθμονομητές καλά σε συσκευή ανάδευσης μικροπλακών για 1 λεπτό.
9. Σκεπάστε κάθε πλάκα με καπάκι και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) για  $120 \pm 5$  λεπτά.
- Αποφύγετε την άμεση έκθεση των πλακών στον ήλιο κατά την επώαση.
10. Κατά τη διάρκεια της επώασης, αραιώστε το Συμπυκνωμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 20X σε απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1 προς 19 και αναδεύσετε καλά. Υπάρχει αρκετό Συμπυκνωμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 20X για την παραγωγή 2L ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης εργασίας.

Πλύνετε τις θέσεις με **400μL** ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης εργασίας για τουλάχιστον 6 κύκλους. Συνιστάται η χρήση αυτόματου πλυντηρίου πλακών.

- Η προσεκτική έκπλυση είναι πολύ σημαντική για την απόδοση της ανάλυσης. Σιγουρευτείτε ότι κάθε θέση είναι γεμισμένη μέχρι πάνω με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης σε κάθε κύκλο. Συνιστάται μια περίοδος διαποτισμού 5 δευτερολέπτων ανάμεσα σε κάθε κύκλο.

- Προσθέστε κανονικό εργαστηριακό απολυμαντικό στη δεξαμενή εκροής και ακολουθήστε τις καθιερωμένες διαδικασίες απολύμανσης δυνητικά μολυσματικού υλικού.
11. Αδειάστε τις πλάκες και κτυπήστε τις ανάποδα πάνω σε απορροφητικό χαρτί για να απομακρυνθεί το υπολειμματικό ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Προσθέστε 100μL Διαλύματος Ενζυμικού Υποστρώματος σε κάθε θέση και αναδεύστε καλά σε συσκευή ανάδευσης μικροπλακών.
  12. Σκεπάστε κάθε πλάκα με καπάκι και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) για 30 λεπτά.
    - Αποφύγετε την άμεση έκθεση των πλακών στον ήλιο κατά την επώαση.
  13. Μετά από την 30λεπτη επώαση, προσθέστε 50μL of Ανασχετικού Διαλύματος σε κάθε θέση και αναμειξτε.
    - Το Ανασχετικό Διάλυμα πρέπει να προστεθεί στις θέσεις με την ίδια σειρά και σε περίπου τα ίδια χρονικά διαστήματα με το υπόστρωμα στο βήμα 11.
  14. Μετρήστε την Οπτική Πυκνότητα (ΟΠ) κάθε θέσης εντός 5 λεπτών από την ανάσχεση της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών με φίλτρο 450nm και φίλτρο αναφοράς 620nm - 650nm. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται με τις τιμές ΟΠ.

## 7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το Λογισμικό Ανάλυσης QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT για την ανάλυση ακατέργαστων δεδομένων και τον υπολογισμό αποτελεσμάτων διατίθεται από τη Cellestis.

Το λογισμικό κάνει μια αποτίμηση του Ποιοτικού Ελέγχου της ανάλυσης, παράγει καμπύλη βαθμονόμησης και δίνει αποτέλεσμα εξέτασης για κάθε άτομο, όπως περιγράφεται λεπτομερώς στην ενότητα Ερμηνείας Αποτελεσμάτων.

Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιήσετε το Λογισμικό Ανάλυσης QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT, τα αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν με την παρακάτω μέθοδο:

### **Προετοιμασία Καμπύλης Βαθμονόμησης**

*(σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιηθεί το Λογισμικό Ανάλυσης QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT)*

Υπολογίστε τις μέσες τιμές ΟΠ των επαναλήψεων Βαθμονομητή Kit σε κάθε πλάκα.

Κατασκευάστε μια λογαριθμική βαθμονομική καμπύλη  $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$  με γραφική παράσταση των βαθμονομικών τιμών  $\log_{(e)}$  της μέσης ΟΠ (άξονας y) έναντι των τιμών  $\log_{(e)}$  της συγκέντρωσης IFN- $\gamma$  στους βαθμονομητές σε IU/mL (άξονας x), χωρίς να υπολογίσετε τον μηδενικό βαθμονομητή. Υπολογίστε την καλύτερη γραμμή της καμπύλης βαθμονόμησης μέσω παλινδρομικής ανάλυσης.

Χρησιμοποιήστε την καμπύλη βαθμονόμησης για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση IFN- $\gamma$  (IU/mL) σε κάθε δείγμα πλάσματος προς εξέταση, με την τιμή ΟΠ κάθε δείγματος.

Οι υπολογισμοί αυτοί μπορούν να γίνουν με τα λογισμικά πακέτα που διατίθενται με συσκευές ανάγνωσης μικροπλακών, και με κανονικά προγράμματα λογιστικών φύλλων ή στατιστικής (π.χ. Microsoft Excel). Συνιστάται η χρήση αυτών των πακέτων για τον υπολογισμό της ανάλυσης παλινδρόμησης και του συντελεστή διακύμανσης (%CV) των βαθμονομητών, και του συντελεστή συσχέτισης (r) της καμπύλης βαθμονόμησης.

## Ποιοτικός Έλεγχος της Εξέτασης

Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων της εξέτασης εξαρτάται από την προετοιμασία ακριβούς καμπύλης βαθμονόμησης. Συνεπώς τα αποτελέσματα των βαθμονομητών πρέπει να εξεταστούν πριν από την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δειγμάτων.

Για να είναι έγκυρη η ανάλυση ELISA:

- **Η μέση τιμή ΟΠ του Βαθμονομητή 1 πρέπει να είναι  $\geq 0,600$ .**
- **Το ποσοστό CV σε % επί των τιμών αντιγράφων ΟΠ των Βαθμονομητών 1 και 2 πρέπει να είναι  $\leq 15\%$ .**
- **Οι τιμές αντιγράφων ΟΠ των Βαθμονομητών 3 και 4 δεν πρέπει να παρουσιάσουν απόκλιση πέραν των 0,040 μονάδων οπτικής πυκνότητας από τον μέσο όρο τους.**
- **Ο συντελεστής συσχέτισης (r) που υπολογίζεται από τις μέσες τιμές απορρόφησης των Βαθμονομητών πρέπει να είναι  $\geq 0,98$ .**

Το Λογισμικό Ανάλυσης QuantiFERON®-TB Gold υπολογίζει και αναφέρει αυτές τις παραμέτρους ποιοτικού ελέγχου.

Αν δεν ισχύουν τα παραπάνω κριτήρια, η ανάλυση είναι άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.

- **Η μέση τιμή ΟΠ του Μηδενικού Βαθμονομητή (Πράσινο Αραιωτικό) πρέπει να είναι  $\leq 0,150$ . Αν η μέση τιμή ΟΠ είναι  $> 0,150$ , πρέπει να εξεταστεί η διαδικασία έκλυσης πλακών.**

## Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα QuantiFERON®-TB Gold IT ερμηνεύονται ακολουθώντας τα παρακάτω κριτήρια:

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Η διάγνωση ή ο αποκλεισμός της φυματίωσης και η αποτίμηση της πιθανότητας λανθάνουσας φυματίωσης, απαιτεί έναν συνδυασμό επιδημιολογικών, ιστορικών, ιατρικών και διαγνωστικών διαπιστώσεων που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων QuantiFERON®-TB Gold IT.

### ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΟ ΦΙΑΛΙΔΙΩΝ ΜΗΔΕΝΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

Μηδενικό [IU/mL]	Αντιγόνο Φυματίωσης μείον Μηδενικό [IU/mL]	QuantiFERON®-TB [IU/mL]	Αναφορά/Ερμηνεία
≤ 8,0	< 0,35	Αρνητικό	Μόλυνση <i>M. tuberculosis</i> ΑΠΘΑΝΗ
	≥ 0,35 και < 25% Μηδενικής τιμής		
	≥ 0,35 και ≥ 25% Μηδενικής τιμής	Θετικό <sup>1</sup>	Μόλυνση <i>M. tuberculosis</i> πιθανή
> 8,0 <sup>2</sup>	Οτιδήποτε	Διφορούμενο <sup>3</sup>	Διφορούμενα αποτελέσματα για αποκρισιμότητα Αντιγόνου Φυματίωσης

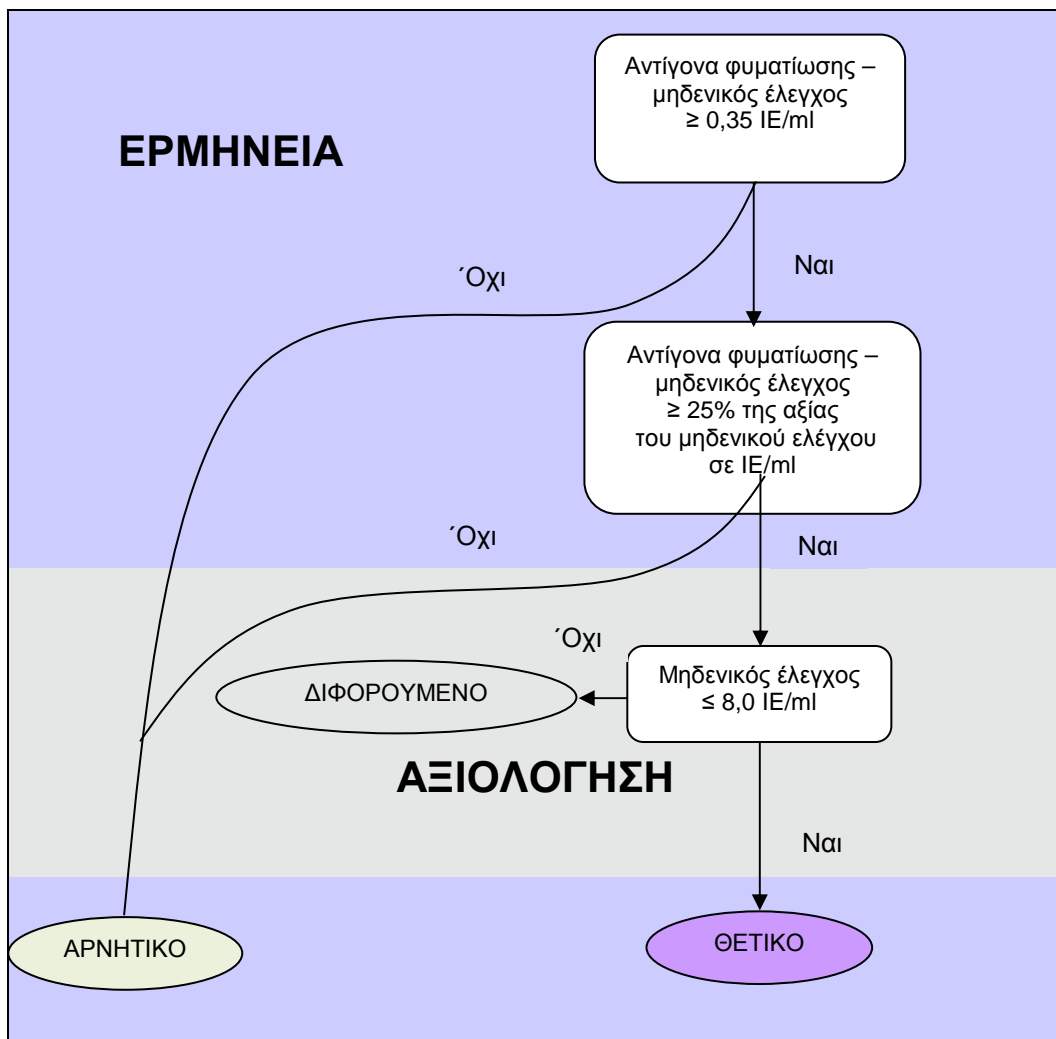
<sup>1</sup> Όπου δεν υπάρχει υποψία μόλυνσης από *M. tuberculosis*, τα αρχικά θετικά αποτελέσματα μπορούν να επαληθευθούν με την επανεξέταση εις διπλούν των αρχικών δειγμάτων πλάσματος με την ανάλυση ELISA QuantiFERON®-TB Gold. Αν η επανεξέταση ενός ή και των δύο αντιγράφων είναι θετική, το άτομο πρέπει να θεωρηθεί θετικό για την εξέταση.

<sup>2</sup> Στις κλινικές μελέτες λιγότεροι από 0,25% των εξεταζόμενων είχαν επίπεδα IFN-γ > 8,0 IU/mL στον Μηδενικό Έλεγχο.

<sup>3</sup> Βλέπε την ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων για πιθανές αιτίες.

Το ύψος του μετρούμενου επιπέδου IFN-γ δεν μπορεί να συσχετισθεί με το στάδιο ή τον βαθμό της μόλυνσης, την έκταση της ανοσοποιητικής αντιδραστικότητας ή την πιθανότητα ανάπτυξης της ενεργού νόσου.

**ΕΙΚΟΝΑ 3. ΕΡΜΗΝΕΥΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ (ΣΕ ΧΡΗΣΗ ΦΙΑΛΙΔΙΩΝ ΜΗΔΕΝΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ)**



**ΧΡΗΣΗ ΦΙΑΛΙΔΙΩΝ ΜΗΔΕΝΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ, ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ & ΜΙΤΟΓΟΝΟΥ**

Μηδενικό [IU/mL]	Αντιγόνο Φυματίωσης μείον Μηδενικό [IU/mL]	Μιτογόνο μείον Μηδενικό [IU/mL] <sup>1</sup>	QuantiferON®-TB [IU/mL]	Αναφορά/Ερμηνεία
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	<b>Αρνητικό</b>	Μόλυνση <i>M. tuberculosis</i> ΑΠΙΘΑΝΗ
	≥ 0,35 και < 25% Μηδενικής τιμής	≥ 0,5		
	≥ 0,35 και ≥ 25% Μηδενικής τιμής	Οτιδήποτε	<b>Θετικό<sup>2</sup></b>	Μόλυνση <i>M. tuberculosis</i> πιθανή
	< 0,35	< 0,5	<b>Διφορούμενο<sup>3</sup></b>	Διφορούμενα αποτελέσματα για αποκρισμότητα Αντιγόνου Φυματίωσης
	≥ 0,35 και < 25% Μηδενικής τιμής	< 0,5		
> 8,0 <sup>4</sup>	Οτιδήποτε	Οτιδήποτε		

<sup>1</sup> Οι αποκρίσεις στον θετικό έλεγχο Μιτογόνου (και μερικές φορές και στο Αντιγόνο Φυματίωσης) είναι συχνά εκτός των ορίων της συσκευής ανάγνωσης μικροπλακών. Αυτό δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της εξέτασης.

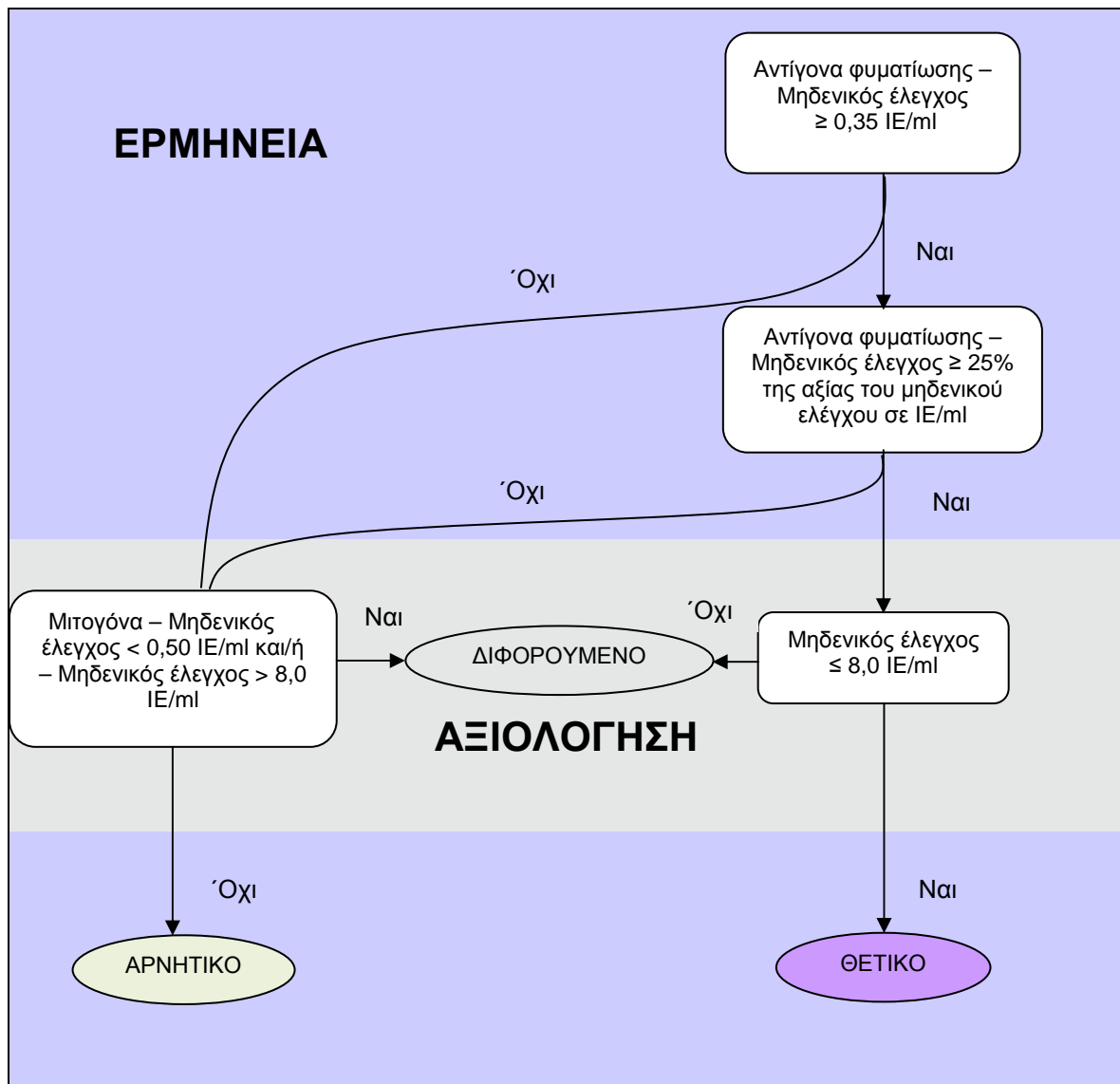
<sup>2</sup> Όπου δεν υπάρχει υποψία μόλυνσης από *M. tuberculosis*, τα αρχικά θετικά αποτελέσματα μπορούν να επαληθευθούν με την επανεξέταση εις διπλούν των αρχικών δειγμάτων πλάσματος με την ανάλυση ELISA QuantiFERON®-TB Gold. Αν η επανεξέταση ενός ή και των δύο αντιγράφων είναι θετική, το άτομο πρέπει να θεωρηθεί θετικό για την εξέταση.

<sup>3</sup> Βλέπε την ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων για πιθανές αιτίες.

<sup>4</sup> Στις κλινικές μελέτες λιγότεροι από 0,25% των εξεταζόμενων είχαν επίπεδα IFN-γ > 8,0 IU/mL στον Μηδενικό Έλεγχο.

Το ύψος του μετρούμενου επιπέδου IFN-γ δεν μπορεί να συσχετισθεί με το στάδιο ή τον βαθμό της μόλυνσης, το επίπεδο ανοσοαντίδρασης ή την πιθανότητα ανάπτυξης της ενεργού νόσου.

**ΕΙΚΟΝΑ 4. Ερμηνευτικό Διάγραμμα Ροής ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΙΑΛΙΔΙΩΝ ΜΗΔΕΝΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ, ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ & ΜΙΤΟΓΟΝΟΥ**



## 8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Τα αποτελέσματα της εξέτασης QuantiFERON®-TB Gold IT πρέπει να χρησιμοποιηθούν παράλληλα με το επιδημιολογικό ιστορικό και την τρέχουσα ιατρική κατάσταση του ατόμου, καθώς και άλλες διαγνωστικές αποτιμήσεις.

Άτομα με τιμές Μηδενικού Ελέγχου άνω των 8 IU/mL ταξινομούνται ως “διφορούμενοι” επειδή μια απόκριση 25% παραπάνω στα Αντιγόνα Φυματίωσης πιθανόν να είναι έξω από τα μετρήσιμα όρια της εξέτασης.

Τα αναξιόπιστα ή ασαφή αποτελέσματα μπορούν να οφείλονται σε:

- Αποκλίσεις από τη διαδικασία που περιγράφεται στο Έντυπο Προϊόντος,
- Υπερβολικά επίπεδα IFN-γ στο κυκλοφοριακό ή παρουσία ετερόφιλων αντισωμάτων,
- Παρέλευση άνω των 16 ωρών από τη λήψη του δείγματος αίματος μέχρι την επώαση στους 37°C

## 9. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### Κλινικές Μελέτες

Καθώς δεν υπάρχει καθιερωμένη εξέταση για τη μόλυνση από λανθάνουσα φυματίωση, η ευαισθησία και η ειδικότητα του QuantiFERON®-TB Gold IT δεν μπορούν να αποτιμηθούν πρακτικά. Η ευαισθησία του QuantiFERON®-TB Gold IT καθορίστηκε κατά προσέγγιση με τη αποτίμηση των ψευδών θετικών αποτελεσμάτων σε άτομα χαμηλού κινδύνου (χωρίς γνωστούς παράγοντες κινδύνου) μόλυνσης από φυματίωση. Η ευαισθησία καθορίστηκε κατά προσέγγιση με τη αποτίμηση ομάδων ασθενών με ενεργό νόσο φυματίωσης επαληθευμένη μέσω καλλιέργειας.

#### **Ειδικότητα**

Σε μια μελέτη στις ΗΠΑ με 866 εθελοντές, το αίμα λήφθηκε για ανάλυση με QuantiFERON®-TB Gold IT και παράλληλα έγινε ανίχνευση φυματικής μόλυνσης με φυματινοαντίδραση (TST). Οι δημογραφικές πληροφορίες και οι παράγοντες κινδύνου φυματίωσης καθορίστηκαν με μια καθιερωμένη επισκόπηση που ήταν έγκυρη όταν έγινε η εξέταση. Από 432 εθελοντές χωρίς γνωστούς παράγοντες κινδύνου μόλυνσης από *M. tuberculosis*, διατέθηκαν αποτελέσματα 391 αναλύσεων QuantiFERON®-TB Gold IT και TST. Κανένας δεν είχε εμβολιαστεί με BCG. Μια δεύτερη μελέτη ειδικότητας έγινε με QuantiFERON®-TB Gold IT σε άτομα χαμηλού κινδύνου στην Ιαπωνία, περίπου 90% εκ των οποίων είχαν εμβολιαστεί με BCG. Τα αποτελέσματα των δύο μελετών ειδικότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2. Ειδικότητα QuantiFERON®-TB Gold IT: Αποτελέσματα από άτομα χωρίς αναφερόμενο κίνδυνο μόλυνσης από *M. tuberculosis*.**

ΜΕΛΕΤΗ	Κατάσταση Εμβολιασμένων BCG %	Σύνολο Εξετασθέντων	Αρ. Διφορούμενων QFT-G	Αρ. QFT-G Θετικών / Αρ. Έγκυρων Εξετάσεων	Ειδικότητα QFT-G (95% CI)	Αρ. Θετικών TST / Αρ. Εξετασθέντων	Ειδικότητα TST* (95% CI)
ΗΠΑ (αδημοσίευτη)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (97,6-99,8)	6 / 391	98,5% (96,5-99,4)
Ιαπωνία (αδημοσίευτη)	~90%	190	4	3 / 186	98,4% (95-99,6)	-	-
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>		<b>581</b>	<b>5/584 (0,9%)</b>	<b>6 / 576</b>	<b>99,0%</b>	-	-

\*Χρήση επάρματος 10mm TST. Η εκτίμηση ειδικότητας TST είναι 99,1% με έπαρμα 15mm.

#### **Ευαισθησία στην ενεργό φυματίωση**

Άτομα ύποπτα για φυματίωση από την Αυστραλία και την Ιαπωνία, που ακολούθως επαληθεύθηκε μέσω καλλιέργειας ότι παρουσίαζαν μόλυνση από *M. tuberculosis*, εξετάστηκαν για να αποτιμηθεί η ευαισθησία του QuantiFERON®-TB Gold IT. Όσο δεν υπάρχει καθιερωμένη εξέταση για μόλυνση από λανθάνουσα φυματίωση, η μικροβιολογική καλλιέργεια *M. tuberculosis* αποτελεί κατάλληλο υποκατάστατο, εφόσον οι νοσούντες ασθενείς είναι μολυσμένοι εξ' ορισμού. Οι ασθενείς είχαν κάνει κάτω από 8 ημέρες θεραπείας πριν τη λήψη αίματος για εξέταση με QuantiFERON®-TB Gold IT.

Ο Πίνακας 3 συνοψίζει τα αποτελέσματα των δύο ομάδων ασθενών με θετική καλλιέργεια *M. tuberculosis*. Η συνολική ευαισθησία του QuantiFERON®-TB Gold IT προς την ενεργό φυματίωση ήταν 89% (48/54).

**Πίνακας 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Άτομα με μόλυνση *M. tuberculosis* που επαληθεύθηκε με καλλιέργεια.**

ΜΕΛΕΤΗ		Επαλήθευση νόσου με	Αρ. Θετικών QFT-Gold /Αρ. Έγκυρων Εξετάσεων	Ευαισθησία QFT-Gold (95% CI)
Μελέτη Επικύρωσης Ιαπώνων Φυματικών Ασθενών		Καλλιέργεια	24 / 27	89% (72-96%)
Μελέτη Επικύρωσης Αυστραλών Φυματικών Ασθενών	Πνευμονική	Καλλιέργεια	7 / 10	70% (40-89%)
	Εξωπνευμονική		17 / 17	100% (82-100%)
<b>TOTAL</b>			<b>48 / 54</b>	<b>89% (78-95%)</b>

**Διάγνωση Λανθάνουσας Φυματίωσης**

Έχει δημοσιευθεί αριθμός μελετών πάνω στην απόδοση του QuantiFERON®-TB Gold IT σε διάφορους πληθυσμούς εκτεθειμένους σε λανθάνουσα φυματίωση. Τα κύρια αποτελέσματα ορισμένων επιλεγμένων μελετών παρατίθενται στον Πίνακα 4.

**Table 4. Επιλεγμένες δημοσιευμένες μελέτες πάνω στο QuantiFERON®-TB Gold IT σε πληθυσμούς εκτεθειμένους σε λανθάνουσα φυματίωση.**

ΜΕΛΕΤΗ	Σύνολο Εξετασθέντων	Αποτελέσματα και Διαπιστώσεις
HCW στην Ινδία (Pai <i>et al</i> 2005) <sup>26</sup>	726	Περιβάλλον πολύ υψηλών ποσοστών φυματίωσης. 40% θετικό QFT-Gold IT πβ. 41% θετικό TST στα 10mm. Υψηλή συμφωνία TST, καμία επίδραση BCG από τις δύο πλευρές. Και οι δύο εξετάσεις σχετίστηκαν με παράγοντες κινδύνου ηλικίας και περιόδου εργασίας στον τομέα υγείας.
HIV στη Δανία (Brock <i>et al</i> 2006) <sup>5</sup>	590	Η συνολική διάδοση λανθάνουσας φυματίωσης με QFT-Gold IT ήταν 4,6% (27/590) σε άτομα με HIV λοίμωξη. Τα θετικά αποτελέσματα συνδέονταν με κίνδυνο φυματίωσης. Δύο άτομα με θετικό QFT-Gold IT προχώρησαν σε ενεργό φυματίωση εντός ενός έτους. Τα διαφορούμενα αποτελέσματα συσχετιζόνταν σημαντικά με CD4 <100 / μL.
Νοσηλεύομενα Παιδιά (Dogra <i>et al</i> 2006) <sup>12</sup>	105	Παιδιά ύποπτα για φυματίωση ή με ιστορικό επαφής με τη νόσο εξετάστηκαν με QFT-Gold IT και TST. 10,5% θετικό QFT-Gold IT πβ. 9,5% θετικό TST στα 10mm. Η συμφωνία των εξετάσεων ήταν 95,2% συνολικά και 100% στα μη BCG εμβολιασμένα άτομα.
Γερμανικές Επαφές (Diel <i>et al</i> 2006) <sup>11</sup>	309	Εξετάστηκαν στενές επαφές 15 διαφορετικών περιπτώσεων δείκτη. Οι 51% είχαν εμβολιαστεί με BCG, 27% ήταν γεννημένοι στο εξωτερικό. 70% των BCG εμβολιασμένων και 18% των μη εμβολιασμένων ήταν TST θετικοί (5mm), ενώ 9% και 11% ήταν QFT-Gold IT θετικοί αντίστοιχα. Το QFT-Gold IT συνδεόταν με κίνδυνο φυματίωσης. Το TST συνδεόταν μόνο με BCG εμβολιασμό.

Υπάρχουν πολλές ακόμη δημοσιεύσεις που περιγράφουν την απόδοση της λιγότερο ευαίσθητης εκδοχής υγρού αντιγόνου QuantiFERON®-TB Gold (ο πρόδρομος του QuantiFERON®-TB Gold IT) και της εξέτασης QuantiFERON®-TB Gold IT. Οι μελέτες αυτές συμπεριλαμβάνουν την εφαρμογή των εξετάσεων σε άτομα που είχαν έρθει σε επαφή με περιπτώσεις ενεργούς φυματίωσης,<sup>9, 11, 19, 25</sup> παιδιά<sup>6-10, 25, 28</sup>, άτομα με HIV λοίμωξη<sup>2, 5, 20</sup>, εργαζόμενους στον τομέα υγείας<sup>13, 26, 32</sup>, ανοσοκατασταλμένα άτομα<sup>4, 22, 23, 27, 30, 31</sup>, καθώς και υπόπτους φυματίωσης<sup>7, 8, 10, 18</sup> και άτομα χαμηλού κινδύνου<sup>15</sup>.

**Επαναληψιμότητα και επίδραση του TST σε μετέπειτα εξετάσεις QuantiFERON®-TB Gold**

Ως μέρος της μελέτης ειδικότητας στις ΗΠΑ, μια υποομάδα εθελοντών εξετάστηκε για δεύτερη φορά από 4 με 5 εβδομάδες μετά από την αρχική εξέταση QuantiFERON®-TB Gold IT και TST. Τα αποτελέσματα QuantiFERON®-TB Gold IT για 260 εθελοντές ήταν διαθέσιμα και στις δύο χρονικές στιγμές και το επίπεδο συμφωνίας ήταν 99,6% (259/260). Η προηγούμενη εξέταση TST δεν επέφερε θετικές αποκρίσεις QuantiFERON®-TB Gold IT.

## 10. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

### Διφορούμενα Αποτελέσματα

Τα διφορούμενα αποτελέσματα είναι ασυνήθιστα και ίσως να οφείλονται στο ανοσοποιητικό σύστημα του εξεταζόμενου, αλλά ίσως να οφείλονται και σε αριθμό τεχνικών παραγόντων:

- Παρέλευση άνω των 16 ωρών από τη λήψη αίματος μέχρι την επώαση στους 37°C
- Φύλαξη αίματος εκτός των προτεινόμενων ορίων θερμοκρασίας (22°C ± 5°C)
- Ανεπαρκής ανάμειξη των φιαλιδίων συλλογής αίματος
- Ανεπαρκής έκπλυση της πλάκας ELISA

Αν υποψιάζεστε την ύπαρξη τεχνικών προβλημάτων κατά τη λήψη ή τον χειρισμό δειγμάτων αίματος, επαναλάβετε ολόκληρη την εξέταση QuantiFERON®-TB Gold IT με νέο δείγμα. Αν υποψιάζεστε ότι έγινε ανεπαρκής έκπλυση ή άλλη απόκλιση από τη διαδικασία κατά την ανάλυση ELISA, επαναλάβετε την εξέταση του διεγερμένου πλάσματος. Διφορούμενα αποτελέσματα που οφείλονται σε χαμηλές τιμές Μιτογόνου ή υψηλές τιμές Μηδενικού Ελέγχου δεν αναμένεται να αλλάξουν κατά την επανάληψη, εκτός εάν υπήρξε σφάλμα κατά την ανάλυση ELISA. Τα διφορούμενα αποτελέσματα πρέπει να αναφέρονται. Ο ιατρός μπορεί να λάβει άλλο δείγμα ή να εκτελέσει άλλες διαδικασίες, όπως κρίνει κατάλληλο.

### Πηγμένα Δείγματα Πλάσματος

Αν εμφανιστούν πηγμένα ινικών πρωτεϊνών κατά την μακροπρόθεσμη φύλαξη δειγμάτων πλάσματος, πρέπει να φυγοκεντριστούν τα δείγματα ώσπου να κατακαθίσει το ίζημα. Αυτό διευκολύνει την αναρρόφηση του πλάσματος με πιπέτα.

## Αντιμετώπιση Προβλημάτων ELISA

### Ακαθόριστη Ανάπτυξη Χρώματος

ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ	ΛΥΣΗ
Ανεπαρκής έκπλυση πλάκας.	Πλύνετε την πλάκα με 400μL/θέση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Ίσως να απαιτηθούν πάνω από 6 κύκλοι πλύσης ανάλογα με το διάλυμα πλύσης. Συνιστάται περίοδος διαποτισμού τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων ανάμεσα σε κάθε κύκλο.
Επιμόλυνση θέσεων ELISA.	Προσέξτε όταν χρησιμοποιείτε πιπέτα και κατά την ανάμειξη του δείγματος για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης.
Ληγμένο Κιτ / Συστατικά.	Σιγουρευτείτε ότι δεν έχει περάσει η ημερομηνία λήξης του κιτ. Χρησιμοποιείστε τον ανασκευασμένο Βαθμονομητή και το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X εντός 3 μηνών από την ημερομηνία κατασκευής.
Μόλυνση Διαλύματος Ενζυμικού Υποστρώματος.	Απορρίψτε το υπόστρωμα αν δείτε μπλε χρωματισμό. Χρησιμοποιείτε καθαρές δεξαμενές αντιδραστηρίων.

### Χαμηλές Ενδείξεις Οπτικής Πυκνότητας στους Βαθμονομητές

ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ	ΛΥΣΗ
Σφάλμα διάλυσης βαθμονομητή.	Εξασφαλίστε τη σωστή παρασκευή διαλυμάτων Βαθμονομητή Κιτ σύμφωνα με τις οδηγίες του Ενθέτου Προϊόντος.
Σφάλμα χρήσης πιπέτας.	Σιγουρευτείτε ότι οι πιπέτες είναι βαθμονομημένες και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
Υπερβολικά χαμηλή θερμοκρασία επώασης.	Η ELISA επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, στους 17- 27°C.
Υπερβολικά σύντομος χρόνος επώασης.	Η πλάκα με το σύζευγμα, τους βαθμονομητές και τα δείγματα πρέπει να επωαστεί για 120 ± 5 λεπτά. Το Διάλυμα Ενζυμικού Υποστρώματος επωάζεται στην πλάκα για 30 λεπτά.
Χρήση λάθους φίλτρου συσκευής ανάγνωσης πλακών.	Η πλάκα πρέπει να διαβάζεται στα 450nm με φίλτρο αναφοράς 620 – 650nm.
Υπερβολικά κρύα αντιδραστήρια.	Όλα τα αντιδραστήρια, με εξαίρεση το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X, πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της ανάλυσης. Αυτό χρειάζεται περίπου μία ώρα.
Ληγμένο Κιτ / Συστατικά.	Βεβαιωθείτε ότι δεν έχει περάσει η ημερομηνία λήξης του κιτ. Χρησιμοποιείστε τον ανασκευασμένο Βαθμονομητή και το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X εντός 3 μηνών από την ημερομηνία κατασκευής.

Υψηλό Υπόβαθρο

<b>ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ</b>	<b>ΛΥΣΗ</b>
Ανεπαρκής έκπλυση πλάκας.	Πλύνετε την πλάκα με 400μL/θέση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Ίσως να απαιτηθούν πάνω από 6 κύκλοι πλύσης ανάλογα με το διάλυμα πλύσης. Συνιστάται περίοδος διαποτισμού τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων ανάμεσα σε κάθε κύκλο.
Υπερβολικά υψηλή θερμοκρασία επώασης.	Η ELISA επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, στους 17- 27°C.
Ληγμένο Kit / Συστατικά.	Βεβαιωθείτε ότι δεν έχει περάσει η ημερομηνία λήξης του kit. Χρησιμοποιείτε τον ανασκευασμένο Βαθμονομητή και το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X εντός 3 μηνών από την ημερομηνία κατασκευής.
Μόλυνση Διαλύματος Ενζυμικού Υποστρώματος.	Απορρίψτε το υπόστρωμα αν δείτε μπλε χρωματισμό. Χρησιμοποιείτε καθαρές δεξαμενές αντιδραστηρίων.

Μη Γραμμική Καμπύλη Βαθμονομητή και Διακύμανση Επαναλήψεων

<b>ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ</b>	<b>ΛΥΣΗ</b>
Ανεπαρκής έκπλυση πλάκας.	Πλύνετε την πλάκα με 400μL/θέση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Ίσως να απαιτηθούν πάνω από 6 κύκλοι πλύσης ανάλογα με το διάλυμα πλύσης. Συνιστάται περίοδος διαποτισμού τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων ανάμεσα σε κάθε κύκλο.
Σφάλμα διάλυσης βαθμονομητή.	Εξασφαλίστε τη σωστή παρασκευή διαλυμάτων Βαθμονομητή σύμφωνα με τις οδηγίες του Ενθέτου Προϊόντος.
Ανεπαρκής ανάμειξη.	Αναδεύσετε καλά τα αντιδραστήρια γυρίζοντάς τα ή με απαλό στροβιλισμό πριν την τοποθέτησή τους στην πλάκα.
Ασυνεπής τεχνική χρήσης πιπέτας ή διακοπή κατά την εγκατάσταση της ανάλυσης.	Η πρόσθεση δειγμάτων και βαθμονομητών πρέπει να γίνει με αδιάκοπο ρυθμό. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να προετοιμαστούν πριν από την έναρξη της ανάλυσης.

Το βίντεο της εξεταστικής διαδικασίας και οι λύσεις στα περισσότερα τεχνικά προβλήματα υπάρχουν στο CD-ROM Πληροφοριών Προϊόντος και Τεχνικού Οδηγού που διατίθεται δωρεάν από τη Cellestis ή μέσω του προμηθευτή σας.

## 11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A comprehensive list of QuantiFERON<sup>®</sup>-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. [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- $\gamma$  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. ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ

Για την τεχνική υπηρεσία παρακαλούμε επικοινωνήστε με:

Cellestis International Pty Ltd: Τηλ: +61 3 9571 3500  
 Fax: +61 3 9571 3544  
 Email: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)  
 Ιστοσελίδα: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Cellestis GmbH:  
 (Europe) Τηλ: +49 6151 428 59 - 0  
 Fax: +49 6151 428 59 - 110  
 Email: [europe@cellestis.com](mailto:europe@cellestis.com)

### 13. ΣΥΝΤΟΜΕΥΜΕΝΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

#### ΣΤΑΔΙΟ 1 – ΕΠΩΑΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

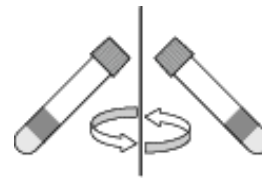
1. Συλλέξτε το αίμα του ασθενούς με τα φιαλίδια συλλογής αίματος και αναμίξτε τα εντατικά **ανακινώντας τα δυνατά για 5 δευτερόλεπτα** (ή 10 φορές κούνημα πάνω-κάτω). **Ολόκληρη η εσωτερική επιφάνεια του φιαλιδίου** πρέπει να έχει επικαλυφθεί με αίμα.



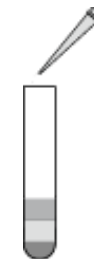
2. Τα φιαλίδια επωάζονται **ΟΡΘΙΑ** στους 37°C για 16 - 24 ώρες.



3. Μετά την επώαση, φυγοκεντρήστε τα φιαλίδια για 5-15 λεπτά σε 2000 - 3000 RCF (g) για τον διαχωρισμό του πλάσματος από τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

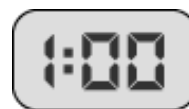


4. Μετά τη φυγοκέντρωση, κάνετε λήψη του δείγματος πλάσματος από κάθε φιαλίδιο για την ποσοτικοποίηση της IFN-γ.

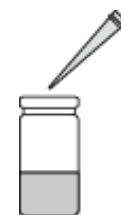


## ΣΤΑΔΙΟ 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

1. Φέρετε όλα τα συστατικά ELISA, εκτός από το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X, σε θερμοκρασία δωματίου και αφήστε τα να ισορροπήσουν για τουλάχιστον 60 λεπτά.

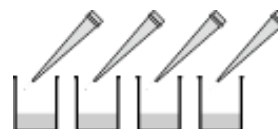


2. Ανασκευάστε τον Βαθμονομητή Κιτ στα 8.0 IU/mL με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Παρασκευάστε τέσσερα (4) διαλύματα βαθμονομητή.

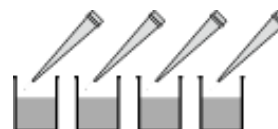


3. Ανασκευάστε το λυοφιλοποιημένο Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

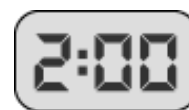
4. Παρασκευάστε σύζευγμα εργασίας με Πράσινο Αραιωτικό και προσθέστε 50 $\mu$ L σε κάθε θέση.



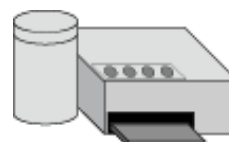
5. Προσθέστε 50 $\mu$ L δειγμάτων πλάσματος προς εξέταση και 50 $\mu$ L βαθμονομητών στις κατάλληλες θέσεις. Αναδεύσετε σε συσκευή ανάδευσης.



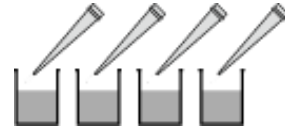
6. Επώαστε για 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



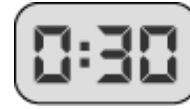
7. Πλύνετε τις θέσεις τουλάχιστον 6 φορές με 400 $\mu$ L/θέση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης



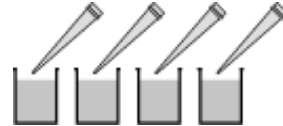
8. Προσθέστε 100μL Διαλύματος Ενζυμικού Υποστρώματος στις θέσεις. Αναδεύσετε σε συσκευή ανάδευσης.



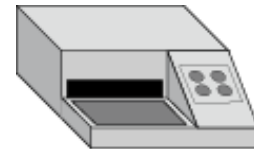
9. Επωάστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



10. Προσθέστε 50μL Ανασχετικού Διαλύματος σε όλες τις θέσεις. Αναδεύσετε σε συσκευή ανάδευσης.



11. Ανάγνωση αποτελεσμάτων στα 450nm με φίλτρο αναφοράς 620 - 650nm.



12. Ανάλυση αποτελεσμάτων





Παρασκευάζεται για την:  
Cellestis Limited (Australia) και Cellestis GmbH (Europe)  
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia  
Τηλ. (Aust) +61 3 9571 3500, (Europe) +49 6151 428 59-0  
E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)  
Ιστοσελίδα: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Αρ. εγγράφου 05990301B  
August 2009



EC	REP
----	-----

MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover  
Germany