

QuantiFERON[®]-TB Gold

(„In-Tube“-metoda = u epruveti)

**IFN-gama test pune krvi
za mjerenje reakcije na peptidne antigene
ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p.4)**

**UPUTA
ZA UPORABU**

In vitro dijagnostički proizvod



SADRŽAJ

1. NAMJENA	2
2. SAŽETAK I OBJAŠNJENJE TESTA	2
Princip testa	3
Trajanje testa	3
3. REAGENSI I NJIHOVO POHRANJIVANJE	4
Potrebni materijal koji se ne nalazi u kitu	4
Pohranjivanje	5
Epruvete za uzimanje krvi	5
Reagensi kita	5
Rekonstituirani a nerabljeni reagensi	5
4. MJERE OPREZA I UPOZORENJA	6
Mjere opreza	6
Upozorenja	6
5. UZORKOVANJE I RUKOVANJE	8
6. UPUTA ZA UPORABU	9
1. korak: Inkubacija uzorka krvi i odvajanje plazme	9
2. korak: Human IFN- γ ELISA	10
7. IZRAČUNAVANJE I INTERPRETACIJA REZULTATA	13
Formiranje standardne krivulje	13
Kontrola kvalitete testa	14
Interpretacija rezultata	15
8. GRANICE POSTUPKA	19
9. ZNAČAJKE TESTA	19
10. TEHNIČKE INFORMACIJE	21
Nejasni rezultati	21
Zgrušani uzorci plazme	21
ELISA rješavanje problema	22
Nespecifična boja reakcije	22
Niska vrijednost optičke gustoće kod standarda	22
Jaka obojenost pozadine	23
Nelinearna standardna krivulja i odstupanja između replikata	23
11. BIBLIOGRAFIJA	24
12. TEHNIČKI SERVIS	25
13. POSTUPAK TESTIRANJA (UKRATKO)	26

1. NAMJENA

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) je *in vitro* dijagnostički test, koji sadrži koktel peptida, koji stimulira proteine ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4) i stanice u hepariniziranoj punoj krvi. Dokaz Interferon- γ (IFN- γ) pomoću metode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) služi prepoznavanju *in vitro* reakcija na ove peptidne antigene, koji su prisutni kod infekcije sa *Mycobacterium tuberculosis*.

QuantiFERON®-TB Gold IT je indirektan test za dokazivanje infekcije sa *M. tuberculosis* (uključivo aktivno oboljenje). Rezultate testa valja razmotriti zajedno sa ocjenom rizika, rezultatima rendgenskog pregleda i ostalih medicinskih i dijagnostičkih pretraga.

2. SAŽETAK I OBJAŠNENJE TESTA

Tuberkuloza (Tb) je zarazna bolest, prouzrokovana infekcijom sa mikroorganizmima *M. tuberculosis* kompleksa (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). Infekcija se obično širi kapljičnom infekcijom putem osoba koje pate od Tb dišnog sustava. Kod novo inficiranih bolesnika tuberkuloza se može razviti u roku od nekoliko tjedana ili mjeseci, ali kod većine inficiranih osoba ne nastupaju tegobe. Kod nekih od njih persistira latentna tuberkulozna infekcija (LTBI), kao nesimptomatično oboljenje koje nije zarazno a do izbijanja može doći tek nekoliko mjeseci ili godina poslije infekcije. Glavni cilj prepoznavanja LTBI se sastoji u primjeni preventivne terapije kako bi se spriječilo izbijanje oboljenja od tuberkuloze. Sve do nedavna tuberkulinski kožni test (tuberculin skin test, TST) je bila jedina metoda koja je stajala na raspolaganje za utvrđivanje dijagnoze LTBI. Osjetljivost kože na tuberkulin pojavljuje se 2 do 10 tjedana poslije infekcije. Međutim neke inficirane osobe ne reaguju na tuberkulin, npr. bolesnici sa oslabljenom imunološkom reakcijom, ali i osobe bez takovih poremećaja. Obrnuto neke osobe, koje najvjerojatnije ne boluju od infekcije sa *M. tuberculosis*, poslije cijepljenja sa bacilom Calmette-Guérin (BCG), poslije infekcije sa drugim mikobakterijama izvan kompleksa *M. tuberculosis* ili na osnovi drugih nepoznatih faktora pokazuju osjetljivost prema tuberkulinu i pokazuju pozitivan rezultat na tuberkulinski kožni test.

LTBI moramo razlikovati od bolesti tuberkuloze, za koju je obveza prijave propisana zakonom. Od tuberkuloze obično obolijevaju pluća i donji dišni putovi; ali mogu biti zahvaćeni i drugi organski sustavi. Tuberkuloza se dijagnosticira na temelju rezultata anamneze, tjelesnog, radiološkog, histološkog i mikobakteriološkog pregleda.

QuantiFERON®-TB Gold IT test mjeri stanicama posredovane imunološke (CMI) reakcije na peptidne antigene, koji simuliraju mikobakterijske proteine. Ti proteini (ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4)) nisu prisutni niti u jednom BCG soju niti u većini netuberkuloznih mikobakterija izuzev *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum*.¹ U krvi osoba koje su inficirane mikroorganizmima kompleksa *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), se općenito nalaze limfociti koji prepoznaju te i druge mikobakterijske antigene. U tom procesu prepoznavanja stvara se i otpušta IFN- γ citokin. Glavna svrha testa je dokaz i nakon toga utvrđivanje količine IFN- γ .

Antigeni primijenjeni u QuantiFERON®-TB Gold IT testu su koktel peptida, koji simuliraju proteine ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4). Mnogobrojne studije su pokazale da ti peptidni antigeni stimuliraju IFN- γ reakciju u T stanicama osoba zaraženih bakterijom *M. tuberculosis*, ali ne stimuliraju T stanice neinficiranih ili BCG cijepljenih koji nisu oboljeli od TB ili ne pripadaju grupi sa LTBI rizikom¹⁻³². Međutim medicinske terapije ili oboljenja koja oštećuju funkcije imunološkog sustava potencijalno smanjuju i IFN- γ reakciju. Bolesnici koji pate od određenih drugih mikobakterioloških infekcija mogu isto reagirati na ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4), pošto su geni, na kojima se nalaze ovi proteini, prisutni i u *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum*^{1,23}. QuantiFERON®-TB Gold IT test stoga pruža važnu pomoć kod dijagnoze bolesnika koji su inficirani bakterijama kompleksa *M. tuberculosis*. Pozitivan rezultat testa podupire dijagnozu TB oboljenja; ali može biti izazvan i drugim mikobakterijama (npr. *M. kansasii*). Da bi se potvrdilo ili isključilo oboljenje od TB, potrebni su daljnji medicinski i dijagnostički pregledi.

Princip testa

Sustav QuantiFERON®-TB Gold IT sadrži specijalne epruvete u koje se uzimaju uzorci pune krvi. Nakon uzimanja krvi vrši se inkubacija uzoraka u epruveti, koja traje 16 do 24 sata. Potom se odvoji plazma i ispita prisutnost IFN- γ , koji je eventualno nastao kao reakcija na peptidne antigene.

QuantiFERON®-TB Gold IT test se sastoji iz dva koraka. U 1. koraku se uzimaju uzorci pune krvi u različite QuantiFERON®-TB Gold epruvete. To su jedna epruveta Nulta kontrola, jedna Tb Antigen epruveta i jedna opcionalna Mitogen epruveta.

Mitogen epruveta može se kod QuantiFERON®-TB Gold IT testa koristiti kao pozitivna kontrola. To može biti od posebne važnost, ako je imunološki status bolesnika nejasan. Mitogen epruveta može poslužiti i kao kontrola pravilnog postupanja sa uzorkom krvi i pravilne inkubacije.

Epruvetu treba što brže, ali svakako u roku od 16 sati nakon uzimanja krvi inkubirati pri temperaturi od 37°C. Nakon inkubacije u trajanju od 16 do 24 sata epruvete se centrifugiraju. Potom se oduzima plazma i utvrđuje se količina IFN- γ (u IJ/ml) metodom ELISA.

Test se smatra pozitivnim glede IFN- γ reakcije u Tb Antigen epruveti, ako je ta vrijednost signifikantno viša od vrijednosti Nulte kontrole (IFN- γ u IJ/ml). Ako se koristi Mitogen epruveta, mitogenom stimuliran uzorak plazme služi kao IFN- γ pozitivna kontrola svakog testiranog uzorka. Neznatna reakcija na mitogen ($< 0,5$ IJ/ml) smatra se nejasnim rezultatom, iako uzorak krvi pokazuje negativnu reakciju na Tb antigene. Takav rezultat može nastati u slučaju nedovoljnog broja limfocita, smanjene aktivnosti limfocita uslijed nepravilnog postupanja sa uzorkom, nepravilnog uzimanja krvi ili miješanja Mitogen epruvete ili ako limfociti bolesnika nisu u stanju producirati IFN- γ . Nulti uzorak obuhvata korekturu nespecifične pozadine, heterofilnih efeketa antitijela⁷ kao i nespecifični IFN- γ u uzorku krvi. IFN- γ vrijednost Nulte epruvete se odbija od IFN- γ vrijednosti Tb-Antigen epruvete i Mitogen epruvete (ukoliko je korištena).

Trajanje testa

Slijede podaci o približnom trajanju QuantiFERON®-TB Gold IT testa kao i potrebno vrijeme kod testiranja više uzoraka metodom skupne obradbe (Batch).

Inkubacija uzoraka pri 37 °C:

16 - 24 sati

ELISA:

oko 3 sata za svaku ELISA ploču

- < 1 sat rada
- plus 10–15 min. za svaku dodatnu ploču

3. REAGENSI I NJIHOVO POHRANJIVANJE

Epruvete za uzimanje krvi: tuberkulosis i antigen kontrola

Narudžbeni br. 0590 0301

1. Epruvete Nulta kontrola (sivi čep)	100 epruveta
2. Epruvete Tb-Antigen (crveni čep)	100 epruveta
3. Epruvete Mitogen kontrola (ljubičasti čep)	100 epruveta

NAPOMENA: Epruvete se mogu kupiti i u slijedećim pakovanjima:

100 Epruveta Nulta kontrola + 100 Epruveta Tb-Antigen (*narudžb. br. 0590 0201*)
100 Epruveta Mitogen Kontrola (*narudžb. br. 0593 0201*)

Epruvete za primjenu na velikim nadmorskim visinama:

Narudž.br. 05900210: (za velike visine) 100 epruveta Nulta kontrola, 100 epruveta Tb-Antigen

Narudž. br. 05900505: (za velike visine) 100 epruveta Nulta kontrola, 100 epruveta Tb-Antigen i 100 epruveta Mitogen kontrola

Narudž. br. T0593 0502: (za velike visine) 100 epruveta Mitogen kontrola

Reagensi kita

Narudžb. br. 0594 0201

1. Mikrotitar trake	24 x 8 udubljenja
2. Humani IFN- γ Standard, liofiliziran	1 bočica
3. Zeleni razblaživač	1 x 30 ml
4. Konjugat 100x koncentriran, liofiliziran	1 x 0,3 ml
5. Pufer za ispiranje 20x koncentriran	1 x 100 ml
6. Otopina enzimskog supstrata	1 x 30 ml
7. Enzimska otopina za zaustavljanje reakcije	1 x 15 ml

Potrebni materijal koji se ne nalazi u sastavu kita

- 37 °C inkubator; CO₂ nije potreban.
- Kalibrirane pipete sa varijabilnim volumenom (10 μ l do 1000 μ l) sa jednokratnim vrhovima
- Kalibrirane višekanalne pipete za doziranje 50 μ l i 100 μ l sa jednokratnim vrhovima
- Tresilica za mikrotitar ploče
- Deionizirana ili destilirana voda (2 litre)
- Aparat za ispiranje mikrotitar ploča (po mogućnosti automatiziran)
- Čitač mikrotitar ploča sa 450-nm filtrom i 620 do 650 nm referentnim filtrom

Pohranjivanje

Epruvete za uzimanje krvi

- Čuvajte epruvete za uzimanje krvi na 4 - 25 °C.
- Održivost QuantiFERON®-TB Gold epruveta za uzimanje krvi iznosi 15 mjeseci od datuma proizvodnje (pohranjivanje na 4 – 25 °C).

Reagensi kita

- Čuvajte kit na temperaturi od 2 – 8 °C.
- Zaštitite enzimsku otopinu od izravnog utjecaja sunca.
- Održivost QuantiFERON®-TB Gold IT ELISA kita iznosi 3 godine od datuma proizvodnje (pohranjivanje na 2 - 8°C).

Rekonstituirani a nerabljeni reagensi

Upute o rekonstituiranju reagensa kita vidi u 6. poglavlju pod „Pripremanje reagensa“.

- Rekonstituirani Kit standard je pri skladištenju između 2 i 8 °C održiv tri mjeseca.
 - *Označite datum rekonstitucije Kit standarda.*
- Nakon rekonstitucije nepotreban konjugat 100x se mora i dalje čuvati na temperaturi od 2-8°C i isto u roku od tri mjeseca potrošiti.
 - *Označite datum rekonstitucije konjugata.*
- Rekonstituirani konjugat se mora potrošiti u roku od 6 sati nakon pripremanja.
- Pufer za ispiranje koji je pripremljen za uporabu održiv je na sobnoj temperaturi do dva tjedna.

4. MJERE OPREZA I UPOZORENJA

Mjere opreza

- Negativan rezultat testa QuantiFERON[®]-TB Gold IT ne isključuje mogućnost infekcije sa *M. tuberculosis* ili oboljenje od tuberkuloze, uzrok lažnog negativnog rezultata može biti faza infekcije (npr. ako je krv uzeta prije razvitka celularne imunološke reakcije), poremećaj funkcije imunološkog sustava zbog drugih oboljenja, nepravilno postupanje sa epruvetama nakon uzimanja krvi, nepravilno provođenje testa ili drugi imunološki čimbenici.
- Pozitivan rezultat testa QuantiFERON[®]-TB Gold IT ne može služiti kao jedina osnova za ocjenjivanje infekcije sa *M. tuberculosis*; nepravilnim provođenjem testa može doći do lažno pozitivnog rezultata.
- Pozitivan rezultat testa QuantiFERON[®]-TB Gold IT treba daljnjim medicinskim i dijagnostičkim pretragama razjasniti; samo tako je moguće utvrditi, da li postoji aktivno oboljenje od tuberkuloze (npr. AFB brisom i kulturom kao i rendgenskim pregledom toraksa).
- Iako BCG sojevi i najveći dio poznatih netuberkuloznih mikobakterija ne sadrže ESAT-6, CFP-10 i TB7.7(p4), pozitivan rezultat testa QuantiFERON[®]-TB Gold IT ipak može biti prouzrokovan i infekcijom sa *M. kansasii*, *M. szulgai* ili *M. marinum*. Ukoliko postoji sumnja da je došlo do takve infekcije, valja primijeniti alternativne metode testiranja.

Upozorenja

- **Dijagnostički proizvod koristiti samo *in vitro*.**
- **Opasno: Otopina enzimskog supstrata** sadrži 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, opasan ako se proguta, kod udisanja i dodira sa kožom. Draži kožu i oči. Djeluje mutageno. Nosite zaštitne naočale i laboratorijske rukavice i postupajte sa ovom otopinom kao sa potencijalno karcinogenom tvari.
- **Opasno: Enzimska otopina za zaustavljanje reakcije** sadrži H₂SO₄, opasan ako se proguta, kod udisanja i dodira sa očima i kožom. Draži kožu i oči. Nosite zaštitne naočale i laboratorijske rukavice i uobičajenu laboratorijsku zaštitnu odjeću. Ukoliko bi stop reagens nehotice dospio na kožu ili u oči, isperite sa puno vode i obratite se liječniku.
- **Opasno: IFN-γ standard i 100x koncentrirani konjugat** mogu u slučaju gutanja izazvati tegobe a kontakt sa kožom iritacije. Nosite laboratorijske rukavice i uobičajenu laboratorijsku zaštitnu odjeću.
- **Rukujte sa humanim uzorcima krvi uvijek kao sa potencijalno infekciозnima!** Pridržavajte se odgovarajućih smjernica glede rukovanja sa krvlju.
- Nekoliko reagensa sadrže **Thimerosal** kao sredstvo za konzerviranje. Thimerosal može djelovati toksično kod gutanja, udisanja i kontakta sa kožom.
- **Zeleni razblaživač** sadrži normalni serum miša i kazein; te supstance mogu izazvati alergične reakcije. Stoga izbjegavajte kontakt sa kožom.
- Odstupanje od u uputi opisanog postupka i instrukcije može dovesti do pogrešnih rezultata. Molimo Vas da prije uporabe pažljivo pročitate uputu za provođenje testa.
- Nemojte koristiti kit ako su jedna ili više bočica sa reagensima prije uporabe oštećene ili puštaju.
- Nemojte koristiti komponente ovog pakovanja zajedno sa ELISA reagensima drugih QuantiFERON[®]-TB Gold IT kit šarži.
- Otklonite nepotrebne reagense i biološke uzorke shodno mjesnim i nacionalnim propisima.
- Nakon isteka održivosti nije dozvoljeno dalje koristiti epruvete za uzimanje krvi i komponente ELISA kita.

5. UZORKOVANJE I RUKOVANJE

Uzimanje krvi

QuantiFERON®-TB Gold IT test sadrži slijedeće epruvete za uzimanje krvi:

1. Nulta kontrola (sivi čep sa bijelim prstenom) (za visine do 810 m nadmorske visine)
2. Tb Antigeni (crveni čep sa bijelim prstenom) (za visine do 810 m nadmorske visine)
3. Mitogen kontrola - opcionalno (ljubičasti čep sa bijelim prstenom) (za visine do 810 m nadmorske visine)
4. Nulta kontrola (sivi čep sa žutim prstenom) (za visine od 1020 do 1875 m nadmorske visine)
5. Tb Antigeni (crveni čep sa žutim prstenom) (za visine od 1020 do 1875 m nadmorske visine)
6. Mitogen kontrola - opcionalno (ljubičasti čep sa žutim prstenom) (za visine od 1020 do 1875 m nadmorske visine)

Antigeni se nalaze u sušenom obliku u prevlaci unutarnje stjenke epruvete za uzimanje krvi. Stoga se uzorci krvi moraju pažljivo promiješati sa sadržinom epruvete. Epruvete potom treba čim prije, ali najkasnije u roku od 16 sati nakon uzimanja krvi, staviti u inkubator pri temperaturi od 37 °C.

Optimalni rezultati se postižu pridržavanjem slijedećih uputa:

1. Uzmite od svakog pacijenta 1 ml venske krvi u svaku QuantiFERON®-TB Gold IT epruvetu.
 - Do nadmorske visine od 810 m treba koristiti QuantiFERON® Standard epruvete za uzimanje krvi. Na nadmorskoj visini iznad 1020 m treba koristiti specijalne QuantiFERON® epruvete za velike visine.

Pri korištenju epruveta QuantiFERON® iznad naznačenih visina ili pri malim količinama uzorka krv možete uzeti i štrcaljkom; tada u sve tri epruvete podajte po 1 ml krvi. Iz sigurnosnih razloga najbolje je u tu svrhu otkloniti iglu; pridržavajte se pri tomu uobičajenih sigurnosnih mjera. Izvadite čep iz triju epruveta QFT-Gold IT i podajte u svaku epruvetu 1 ml krvi (do crne oznake na bočnom rubu etikete). Nakon toga začepite epruvete i promiješajte kako je dolje opisano.

- Pošto se epruvete od 1 ml relativno polako pune krvlju, ostavite epruvetu nakon očiglednog postizanja razine punjenja još 2-3 sekunde na igli. Tako ćete osigurati uzimanje potrebne količine krvi.

Crna oznaka na strani epruvete obilježava razinu punjenja od 1ml. Epruvete QuantiFERON®-TB Gold su validirane za volumen od 0,8 do 1,2 ml. Ako pri uzimanju krvi nije postignuta ta crta, preporuča se ponovno uzimanje uzorka krvi.

- Ako se za uzimanje krvi koristi Butterfly igla, prvo pomoću prazne epruvete treba osigurati da je vod pun krvi prije nego što se postavi QuantiFERON®-TB Gold epruveta.

2. **Energično protresite epruvete u trajanju od 5 sekundi** (ili 10x promućkati). Uvjerite se da je **unutarnja stjenka epruvete potpuno** pokrivena krvlju.

- Pažljivo miješanje je važno, da bi se sadržaj epruvete u potpunosti pomiješao sa uzorkom krvi.
- Pri mućkanju će se vjerojatno stvoriti pjena. To ne utiče na učinak testa i nije uzrok za uznemiravanje.

3. Označite epruvete.

4. Epruvete treba čim prije, ali najkasnije u roku od 16 sati nakon uzimanja krvi staviti u inkubator na 37°C. Nemojte uzorke krvi držati u hladnjaku ili zamrzivaču!

6. UPUTA ZA UPORABU

1. korak: Inkubacija uzorka krvi i odvajanje plazme

Materijali, koje kit sadrži

QuantiFERON®-TB Gold IT epruvete za uzimanje krvi (vidi 3. poglavlje).

Potrebni materijali, koje kit ne sadrži

Vidi 3. poglavlje.

Postupak

1. Ukoliko se uzorci krvi ne inkubiraju odmah poslije uzimanja, **epruvete treba neposredno prije inkubacije ponovno promiješati odnosno promućkati**, kao što je opisano u 5. poglavlju.
2. Inkubirajte epruvete u **USPRAVNOM POLOŽAJU** 16 do 24 sata pri 37 °C. CO₂ ili vlaženje nije potrebno.
3. Epruvete sa uzorkom krvi možete prije centrifugiranja do 3 dana čuvati na temperaturi od 2 - 27°C.
4. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C epruvete treba radi lakšeg oduzimanja plazme 5 – 15 minuta centrifugirati na 1500 – 2200g (RCF). Uslijed nastalog ugruška stanice se odvajaju od plazme. Ukoliko to ne nastupi, epruvete treba ponovno centrifugirati na višoj brzini.
 - Plazma se može odvojiti i bez centrifugiranja, ali se pri tome mora veoma pažljivo postupati da ne bi pri odvajanju plazme uzkovitlali stanice.
5. Uzorke plazme možete staviti neposredno iz epruvete na QuantiFERON®-TB Gold ELISA ploču, posebice ako koristite ELISA automat.
6. Druga mogućnost je da uzorke plazme prije ELISA postupka pohranite – ili uzravno u centrifugiranim epruvetama ili u spremnicima za plazmu (npr. >150 µl u udubljenja ili u mikroeprevete u stalku formata 96. Za vrijeme pohrane uzoraka ploče treba pokriti da bi spriječili izlivanje ili gubitak ishlapljivanjem.
 - Uzorke plazme možete na temperaturi od 2 – 8 °C čuvati do 4 tjedana; pri temperaturi ispod –20 °C (po mogućnosti na temperaturi nižoj od –70°C) moguće je još duže pohranjivanje.

2. korak: Humani IFN- γ ELISA

Materijali, koje kit sadrži

QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA kit (vidi 3. poglavlje).

Potrebni materijali, koje kit ne sadrži

Vidi 3. poglavlje.

Postupak

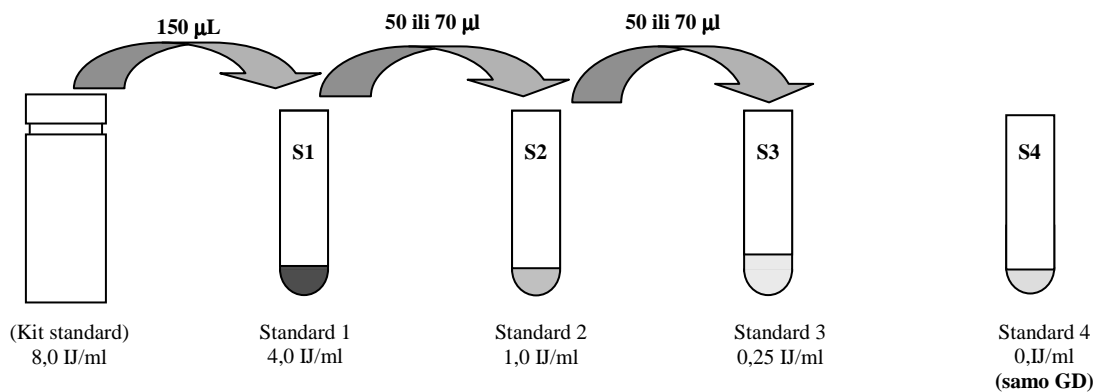
1. Svi uzorci plazme i svi reagensi - sa iznimkom 100x konjugata - moraju prije uporabe imati sobnu temperaturu ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$). Planirajte za to najmanje 60 minuta.
2. Uzmite trake, koje Vam nisu potrebne iz okvira, vratite ih u foliju i pohranite ih do uporabe u hladnjaku. Pripremite najmanje jednu traku za QuantiFERON[®]-TB Gold standarde i dovoljan broj traka za testiranje pacijenata (vidi slike 2A i 2B za korištenje 2 odnosno 3 epruvete). Nakon uporabe sačuvajte okvir i poklopac za preostale trake.
3. Rekonstituirajte liofilizirani Kit standard sa količinom deionizirane ili destilirane vode koja je naznačena na etiketi standard bočice. Pažljivo promiješajte sadržaj bočice (minimizirajući stvaranje pjene) i uvjerite se da je sadržaj potpuno rastopljen. Rekonstitucijom standarda na naznačen volumen dobivamo otopinu sa koncentracijom od 8,0 IU/ml.

Napomena: Volumen koji je potreban za rekonstituciju Kit standarda nije u svakoj šarži isti!

Uporabite rekonstituiran Kit standard za pripravljanje serije otopine 1:4 od IFN- γ u zelenom razblaživaču (GD) – vidi sliku 1. S1 (Standard 1) sadrži 4 IU/ml, S2 (Standard 2) sadrži 1 IU/ml, S3 (Standard 3) sadrži 0,25 IU/ml a S4 (Standard 4) sadrži 0 IU/ml (samo GD). Standarde treba testirati najmanje u duplikatu.

PREPORUČEN POSTUPAK ZA STANDARDE U DUPLIKATU	PREPORUČEN POSTUPAK ZA STANDARDE U TRIPLIKATU
<ol style="list-style-type: none">a. Označite 4 epruvete sa „S1”, „S2”, „S3” i „S4”.b. Podajte 150 μl GD u S1, S2, S3, S4.c. Podajte 150 μl Kit standarda u S1 i promiješajte pažljivo.d. Prenesite 50 μl iz S1 u S2 i pažljivo promiješajte.e. Prenesite 50 μl iz S2 u S3 i pažljivo promiješajte.f. „Samo GD” služi kao Nulti standard (S4).	<ol style="list-style-type: none">a. Označite 4 epruvete sa „S1”, „S2”, „S3” i „S4”.b. Podajte 150 μl GD u S1.c. Podajte 210 μl GD u S2, S3, S4.d. Podajte 150 μl Kit standarda u S1 i pažljivo promiješajte.e. Prenesite 70 μl iz S1 u S2 i pažljivo promiješajte.f. Prenesite 70 μl iz S2 u S3 i pažljivo promiješajte.g. „Samo GD” služi kao Nulti standard (S4).

Slika br. 1. Formiranje standardne krivulje



- Pripremite za svaki ELISA proces novu otopinu Kit standarda.
4. Rekonstituirajte liofilizirani 100x koncentrirani konjugat sa 0,3 ml deionizirane ili destilirane vode. Pažljivo promiješajte sadržaj bočice (minimizirajući stvaranje pjene) i uvjerite se da je sadržaj potpuno rastopljen.

Konjugat gotov za uporabu se priprema tako da se potrebna količina rekonstituiranog 100x koncentriranog konjugata razblaži sa zelenom razrjeđivačem kako to pokazuje tabela br. 1 (Pripremanje konjugata).

TABELA BR. 1 Pripremanje konjugata

BROJ TRAKA	KOLIČINA 100x KONCENTRIRANOG KONJUGATA	KOLIČINA ZELENOG RAZBLAŽIVAČA
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

- Dobro i pažljivo promiješajte; izbjegavajući stvaranje pjene.
 - Nerabljeni 100x koncentrirani konjugat odmah nakon uporabe i dalje držite na temperaturi između 2-8 °C.
 - Za razblaživanje koristite isključivo zeleni razblaživač.
5. Prije provođenja testa plazmu promiješajte, da bi se IFN-γ podjednako podijelio u uzorku.
6. Stavite 50 µl svježe pripravljenog gotovog konjugata pomoću višekanalne pipete u odgovarajuća ELISA udubljenja.
7. Podajte 50 µl uzorka plazme pomoću višekanalne pipete u odgovarajuća ELISA udubljenja (vidi preporučeni raspored na ploči na slikama 2A i 2B). Na kraju dodajte po 50 µl standarda 1 do 4.

Slika br. 2A. Preporučeni raspored uzoraka Nulta kontrola i Tb Antigen na ploči (44 testova po ploči)

	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	30°	34A	38A	42A
E	3N	7N	11N	15N	19N	21N	23N	27N	31N	35N	39N	43N
F	3A	7A	11A	15A	19A	21A	23A	27A	31A	35A	39A	43A
G	4N	8N	12N	16N	20N	22N	24N	28N	32N	36N	40N	44N
H	4A	8A	12A	16A	20A	22A	24A	28A	32A	36A	40A	44A

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Uzorak 1, Nulta kontrolna plazma); 1A (Uzorak 1, Tb Antigen plazma).

Slika br. 2B. Preporučeni raspored uzoraka Nulta kontrola, Tb Antigen i Mitogen na ploči (28 testova po ploči)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Uzorak 1, Nulta kontrolna plazma); 1A (Uzorak 1, Tb Antigen plazma); 1M (Uzorak 1, Mitogen kontrolna plazma).

- Promiješajte pažljivo konjugat i uzorke plazme/standarde u trajanju od 1 minute u tresilici za mikrotitar ploče.
- Pokrijte svaku ploču sa poklopcem i inkubirajte ploče 120 ± 5 minuta na sobnoj temperaturi ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Za vrijeme inkubacije ploče zaštitite od izravnog zračenja sunca.
- Za vrijeme inkubacije razblažite jedan dio 20x koncentriranog pufera za ispiranje sa 19 dijelova deionizirane ili destilirane vode i dobro promiješajte. U kitu se nalazi dovoljno 20x koncentriranog pufera za ispiranje da bi se dobilo 2 litre gotovog pufera za ispiranje.

Ispirite udubljenja najmanje 6 puta sa **400 µl** gotovog pufera za ispiranje. Preporučamo Vam da koristite automat za pranje mikrotitar ploča.

- Pažljivo ispiranje je veoma važno za učinak testa. Kontrolirajte pri svakom ciklusu ispiranja da li su sva udubljenja **do gornje ivice puna puferom za ispiranje**. Preporučamo da između ciklusa ispiranja računate najmanje 5 sekundi za namakanje.
- U sabirni spremnik za otpadnu tekućinu treba dodati dezinfekcijsko sredstvo koje se koristi u laboratorijima. Držite se osim toga uputa za dekontaminaciju potencijalno infektivnih materijala koje vrijede u Vašem laboratoriju.

11. Lupkanjem istresite ploče da udubljenjima prema dolje na papir, kako bi otklonili ostatak pufera za ispiranje. Potom dodajte 100 µl otopine enzimskog supstrata u svaku udubinu i promiješajte ploče pomoću tresilice.
12. Pokrijte svaku ploču sa poklopcem i inkubirajte ploče 30 minuta na sobnoj temperaturi ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Za vrijeme inkubacije ploče zaštitite od izravnog zračenja sunca.
13. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta dodajte 50 µl enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje i promiješajte.
 - Enzimsku otopinu za zaustavljanje reakcije dodajte u udubljenja po istom redoslijedu i sa približno istim tempom kao što ste učinili sa enzimskim supstratom pod brojem 11.
14. Izmjerite optičku gustoću (OD) svakog udubljenja u roku od 5 minuta nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije pomoću čitača za mikrotitar ploče, primjenom 450 nm filtra i 620 do 650 nm referentnog filtra. Izračunavanje rezultata vrši se pomoću očitane vrijednosti optičke gustoće.

7. IZRAČUNAVANJE I INTERPRETACIJA REZULTATA

Cellestis Vam nudi analizni softver za QuantiFERON[®]-TB Gold IT za analizu podataka i izračunavanje rezultata.

Softver provodi kontrolu kvalitete testa, formira standardnu krivulju i pruža za svakog testiranog pacijenta rezultat na temelju dolje opisane metode interpretacije.

Namjesto korištenja analiznog softvera QuantiFERON[®]-TB Gold IT rezultati se mogu utvrditi i dolje opisanom metodom:

Formiranje standardne krivulje

(ako ne koristimo QuantiFERON[®]-TB Gold IT softver)

Utvrđite srednju vrijednost optičke gustoće Kit standard replikata na svakoj ploči.

Formirajte $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standardnu krivulju grafičkim prikazom $\log_{(e)}$ srednje vrijednosti optičke gustoće (y-os) prema $\log_{(e)}$ IFN- γ koncentracije standarda u IJ/ml (x-os), izostavivši kod ovog izračunavanja Nulti standard. Izračunajte liniju najboljeg oblika standardne krivulje regresijskom analizom.

Koristite standardnu krivulju za utvrđivanje IFN- γ koncentracije (IJ/ml) za svaki testirani uzorak plazme primjenom optičke gustoće.

Za ta računanja mogu se koristiti softver paketi koje Cellestis nudi za čitače mikrotitar ploča kao i standardnim formulama ili programima za statistiku (kao npr. Microsoft Excel). Mi preporučamo primjenu tih softver paketa za izračunavanje regresijske analize, varijacijskog koeficijenta standarda (%CV) kao i koeficijenta korelacije (r) za standardnu krivulju.

Kontrola kvalitete testa

Točnost rezultata testa ovisi od pravilnog formiranja standardne krivulje. Stoga se iz standarda izvedeni rezultati moraju preispitati prije interpretacije rezultata testa.

ELISA je valjan ako su ispunjeni slijedeći kriteriji:

- **Srednja vrijednost optičke gustoće Standarda 1 mora biti $\geq 0,600$.**
- **% CV repliciranih vrijednosti optičke gustoće Standarda 1 i Standarda 2 mora biti $\leq 15\%$.**
- **Replicirane vrijednosti optičke gustoće Standarda 3 i Standarda 4 ne smiju odstupati u većoj mjeri od srednjih vrijednosti nego 0,040 OD jedinica.**
- **Koeficijent korelacije, izračunat iz srednjih vrijednosti apsorbancije Standarda mora biti $(r) \geq 0,98$.**

Analizni softver QuantiFERON[®]-TB Gold IT izračunava i pokazuje ove parametre kontrole kvalitete.

Ukoliko ovi kriteriji nisu ispunjeni, test nije valjan i mora se ponoviti.

- **Srednja vrijednost optičke gustoće Nultog standarda (zeleni razblaživač) trebao bi biti $\leq 0,150$.
Ukoliko je srednja OD vrijednost $> 0,150$, preporuča se kontrola postupka ispiranja ploča.**

Interpretacija rezultata

Rezultate testa QuantiFERON®-TB Gold IT treba interpretirati po slijedećim kriterijima:

NAPOMENA: Diagnoza odnosno isključenje oboljenja od tuberkuloze kao i prognoza vjerojatnosti LTBI iziskuje zajedničku ocjenu epidemioloških, anamnestičkih, medicinskih i dijagnostičkih rezultata; svi ovi rezultati se moraju uzeti u obzir pri interpretaciji rezultata testa QuantiFERON®-TB Gold IT.

AKO SE RABE SAMO EPRUVETE NULTA KONTROLA I TB-ANTIGEN

<u>Nula</u> [IJ/ml]	<u>Tb-Antigen minus Nula</u> [IJ/ml]	QuantiFERON®-TB [IJ/ml]	Mišljenje/Interpretacija
≤ 8,0	< 0,35	negativan	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE vjerojatna
	≥ 0,35 i < 25% Nula vrijednosti		
	≥ 0,35 i ≥ 25% Nula vrijednosti	pozitivan ¹	<i>M. tuberculosis</i> infekcija vjerojatna
> 8,0 ²	svejedno koliko	nejasan ³	Rezultati Tb Antigen reakcije nejasni

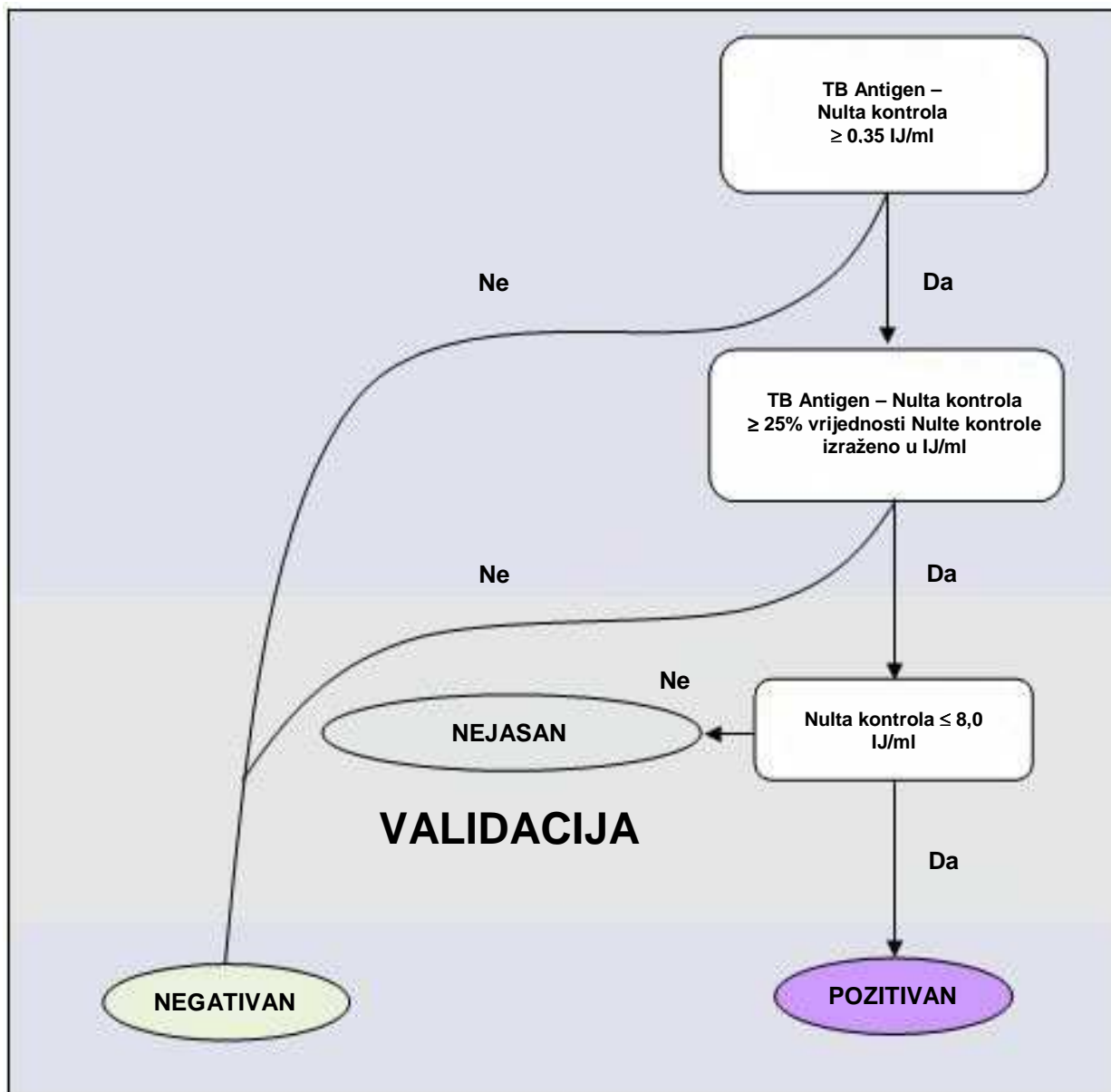
¹ U slučajevima kada se ne pretpostavlja infekcija *M. tuberculosis*, početni pozitivni rezultati mogu se potvrditi ponovnim, dupliciranim testiranjem prvobitnih uzoraka plazme metodom QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Ukoliko se u ponovljenom testu prvog ili drugog uzorka pokaže pozitivan rezultat, rezultat testa treba interpretirati kao pozitivan.

² U kliničkim studijama kod manje od 0,25 % sudionika je Nulta kontrola pokazala IFN- γ koncentraciju > 8,0 IJ/ml.

³ Moguće uzroke vidi u poglavlju Rješavanje problema.

Iz mjerene visine IFN- γ koncentracije ne može se izvesti zaključak o stadiju ili stupnju infekcije, mjeri imunološke reaktivnosti ili o vjerojatnoći progresije kod aktivnog oboljenja.

SLIKA 3. Dijagram interpretacije kod primjene epruveta NULA i TB ANTIGEN



AKO SE RABE EPRUVETE NULA, TB ANTIGEN I MITOGEN:

<u>Nula</u> [IJ/ ml]	<u>Tb Antigen minus Nula</u> [IJ/ml]	<u>Mitogen minus Nula</u> [IJ/ ml] ¹	QuantiFERON®-Tb [IJ/ml]	Mišljenje/Interpretacija
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativan	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NIJE vjerojatna
	≥ 0,35 i < 25% Nula vrijednosti	≥ 0,5		
	≥ 0,35 i ≥ 25% Nula vrijednosti	svejedno koliko	pozitivan ²	<i>M. tuberculosis</i> infekcija vjerojatna
	< 0,35	< 0,5	nejasan ³	Rezultati Tb Antigen reakcije nejasni
≥ 0,35 i < 25% Nula vrijednosti	< 0,5			
> 8,0 ⁴	svejedno koliko	svejedno koliko		

¹ Reakcija na pozitivnu Mitogen kontrolu (a ponekad i na Tb-Antigen) je često izvan mjernog opsega čitača za mikrotitar ploče. To međutim nema upliva na rezultate testa.

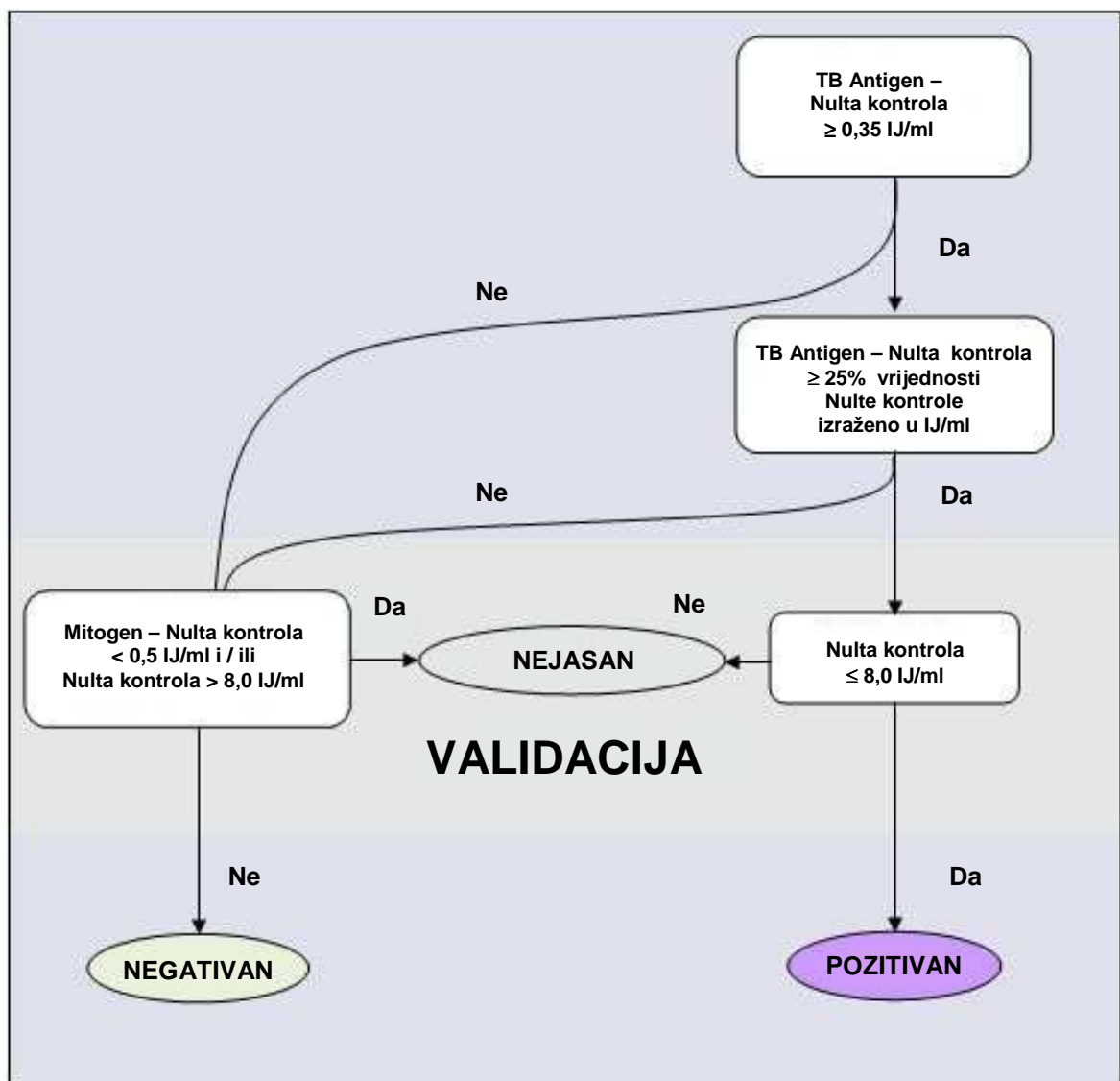
² U slučajevima kada se ne pretpostavlja infekcija *M. tuberculosis*, početni pozitivni rezultati mogu se potvrditi ponovnim, dupliciranim testiranjem prvobitnih uzoraka plazme metodom QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Ukoliko se u ponovljenom testu prvog ili drugog uzorka pokaže pozitivan rezultat, rezultat testa treba interpretirati kao pozitivan.

³ Moguće uzroke vidi u poglavlju Rješavanje problema.

⁴ U kliničkim studijama kod manje od 0,25 % sudionika je Nulta kontrola pokazala IFN- γ koncentraciju > 8,0 IJ/ml.

Iz mjerene visine IFN- γ koncentracije ne može se izvesti zaključak o stadiju ili stupnju infekcije, mjeri imunološke reaktivnosti ili o vjerojatnoći progresije kod aktivnog oboljenja.

SLIKA 4. Dijagram interpretacije kod primjene epruveta NULA, TB ANTIGEN i MITOGEN



8. GRANICE POSTUPKA

Rezultate testa QuantiFERON®-TB Gold IT treba posmatrati u kombinaciji sa epidemiološkom anamnezom svakog pojedinačnog pacijenta, njegovog trenutnog zdravstvenog stanja i drugih dijagnostičkih pretraga.

Rezultate osoba, kod kojih je Nulta vrijednost bila viša od 8 IU/ml treba interpretirati kao „nejasne“, pošto za 25 % povišena Tb-Antigen reakcija može biti izvan mjernog opsega.

Do nepouzdanih ili nejasnih rezultata može doći iz slijedećih razloga:

- Odstupanje od postupka opisanog u priloženoj uputi za uporabu
- Previsoka koncentracija cirkulirajućeg IFN- γ ili prisutnost heterofilnih antitijela
- Prekoračenje roka od 16 sati između uzimanja uzorka i inkubacije na temperaturi od 37 °C

9. ZNAČAJKE TESTA

Kliničke studije

Pošto za dokaz latentne Tb infekcije (LTBI) ne postoji opće prihvaćeni standard, za test QuantiFERON®-TB Gold IT praktički se ne može odrediti točna senzitivnost i specifikacija. Kod testa QuantiFERON®-TB Gold IT približna specifična vrijednost je određena tako da su utvrđeni lažno pozitivni rezultati osoba sa niskim rizikom Tb infekcije (bez poznatih rizičkih čimbenika). Približna vrijednost senzitivnosti određena je pregledima skupina bolesnika, kod kojih je kulturom dokazana prisutnost aktivne Tb infekcije.

Specifikacija

U Sjedinjenim Američkim Državama u jednoj studiji je učestvovalo 866 dragovoljaca; od sudionika su prilikom TST (tuberkulinski kožni test) uzeli krv za QuantiFERON®-TB Gold IT test. Demografski podaci i rizički čimbenici za Tb uzeti su istodobno sa testom pomoću standardizovanog upitnika. Od 432 dragovoljaca, kod kojih nije bilo rizičkih čimbenika *M. tuberculosis* infekcije, za 391 osobu je pored rezultata testa QuantiFERON®-TB Gold IT stajao na raspolaganju i rezultat TST pregleda. Nijedan dragovoljac nije primio BCG vakcinu. Jedan drugi test za utvrđivanje specifikacije QuantiFERON®-TB Gold IT izvršen je u Japanu, kod osoba sa malim rizikom oboljenja, od kojih je 90 % prije primilo BCG cijepljenje. Rezultate tih dviju ispitanja specifikacije prikazuje tabela broj 2.

Tabela br. 2: Ispitivanje specifikacije testa QuantiFERON®-TB Gold IT kod osoba bez rizičkih čimbenika infekcije *M. tuberculosis*.

ISPITIVANJE	BCG status % cijepljenih	Pregledane osobe ukupno	Pregledi sa nejasnim rezultatom	QFT-G pozitivan / broj valjanih testova	QFT-G specifičnost (95% CI)	TST pozitivan/ broj pregledanih osoba	TST* specifikacija (95% CI)
SAD (ne publicirano)	0%	391	1	3 / 390	99.2% (97.6-99.8)	6 / 391	98.5% (96.5-99.4)
Japan (ne publicirano)	~90%	190	4	3 / 186	98.4% (95-99.6)	-	-
UKUPNO		581	5/584 (0.9%)	6 / 576	99.0%	-	-

*Granična vrijednost TST je 10 mm. Približna vrijednost specifikacije TST pri graničnoj vrijednosti od 15 mm iznosi 99.1%.

Senzitivnost kod aktivne tuberkuloze

Senzitivnost testa QuantiFERON®-TB Gold IT utvrdili su kod australijskih i japanskih pacijenata, kod kojih je pretpostavljena Tb infekcija i kulturom dokazana infekcija *M. tuberculosis*. Iako za dokaz latentne infekcije tuberkulozom (LTBI) ne postoji opće priznat test, rezultatom kulture *M. tuberculosis* utvrđeno je da su ove osobe bez sumnje inficirane. Prije vršenja testa QuantiFERON®-TB Gold IT pacijenti su liječeni najviše 8 dana.

Tabela broj 3 prikazuje rezultate kultura tih dviju skupina pacijenata inficiranih sa *M. tuberculosis*. Kod aktivne tuberkuloze QuantiFERON®-TB Gold IT test je pokazao ukupnu senzitivnost od 89% (48/54).

Tabela broj 3: Ispitivanje senzitivnosti testa QuantiFERON®-TB Gold IT kod osoba, kod kojih je kulturom utvrđena infekcija sa *M. tuberculosis*

ISPITIVANJE		Potvrđivanje bolesti	Broj QFT-Gold pozitivnih / broj valjanih testova	Senzitivnost QFT-Gold (95% CI)
Validacijsko ispitivanje japanskih TB bolesnika		kulturom	24 / 27	89% (72-96%)
Validacijsko ispitivanje australijskih Tb bolesnika	pulmonaris	kulturom	7 / 10	70% (40-89%)
	extra pulmonaris		17 / 17	100% (82-100%)
UKUPNO			48 / 54	89% (78-95%)

LTBI dijagnoza

O populacijama sa visokim LTBI rizikom publicirana su monogobrojna ispitivanja u svezi sa značajkama testa QuantiFERON®-TB Gold IT. Tabela broj 4 prikazuje sažetak najvažnijih rezultata nekih od tih ispitivanja.

Tabela broj 4: Nekoliko publiciranih ispitivanja u populacijama sa visokim LTBI rizikom u svezi sa testom QuantiFERON®-TB Gold IT

ISPITIVANJE	Ispitivane osobe ukupno	Rezultati i nalazi
indijski HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Veoma visoki udio Tb, 40% QFT-Gold IT pozitivan, dok je udio TST pozitivnih rezultata 41% pri graničnoj vrijednosti od 10mm. Podudaranje sa TST u visokoj mjeri, BCG vakcina ne pokazuje utjecaja ni u jednom testu. U obadva testa rizički čimbenici su životna dob i vrijeme provedeno u zdravstvu.
danski HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	Ukupna prisutnost LTBI po testu QFT-Gold IT iznosi 4.6% (27/590) kod HIV ⁺ bolesnika. Pozitivni rezultati su povezani sa rizičkim čimbenicima Tb. Kod dva QFT-Gold IT pozitivna pacijenta razvila se u roku od 1 godinu dana aktivna tuberkuloza. Nejasne reakcije (n=20; 3,4%) pri signifikantno malim CD4 brojem (<100 / μl).
u bolnici liječena djeca (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Kod djece koja su u kontaktu sa pretpostavljeno Tb inficiranima ili anamnezom utvrđenim Tb pacijentima izvršeni su testovi QFT-Gold IT I TST. U testu QFT-Gold IT bilo je 10,5% pozitivnih, u TST 9,5% pozitivnih (pri 10mm). Testovi se podudaraju ukupno u 95,2%, unutar onih, koji nisu primili BCG vakcinu u 100%.
njemačke kontakt osobe (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	U 15 različitih slučajeva ispitivali su bliske kontakt osobe. 51% su prije primili BCG ovakcinu, 27% podrijetlom je iz inozemstva. 70% od BCG cijepljenih i 18% od necijepljenih bili su TST pozitivni (5mm), dok su 9% odnosno 11% bili QFT-Gold IT pozitivni. Rezultat testa QFT-Gold IT je povezan sa Tb rizikom. Rezultat testa TST je povezan samo sa BCG cijepljenjem.

Mnoge druge publikacije opisuju pored testa QuantiFERON®-TB Gold IT i značajke kvalitete testa QuantiFERON®-TB Gold. To je varijanta prije testa QuantiFERON®-TB Gold IT, produkt koji je manje osjetljiv, solubiln antigen. Te studije su ispitivale primjenu testova u slijedećim grupama: osobe koje imaju kontakt sa aktivno tuberkuloznim pacijentima^{9, 11, 19, 25}, djeca^{6-10, 25, 28}, HIV pozitivni pacijenti^{2, 5, 20}, zdravstveni radnici^{13, 26, 32}, imunosupresirani^{3, 4, 22, 23, 27, 30, 31}, osobe sa sumnjom na TB^{7, 8, 10, 18} i osobe sa malim rizikom¹⁵.

Reproducibilnost TST testa i djelovanje na kasniji rezultat QuantiFERON®-TB Gold testa

U SAD-u su kao dio ispitivanja specifikacije u jednoj podgrupi dragovoljaca 4-5 tjedana poslije prvobitnih testova QuantiFERON®-TB Gold IT i TST ponovo testirali. Kod 260 vojnika je rezultat testa QuantiFERON®-TB Gold IT u obadva slučaja stajao na raspolaganju, rezultati su se podudarali za 99,6% (259/260). Prije izvršen TST test nije izazvao pozitivan odgovor na QuantiFERON®-TB Gold IT.

10. TEHNIČKE INFORMACIJE

Nejasni rezultati

Nejasni rezultati bi se trebali pojavljivati samo rijetko a mogu biti prouzrokovani slijedećim tehničkim čimbenicima:

- Prekoračenje roka od 16 sati između uzimanja uzorka i inkubacije na temperaturi od 37 °C
- Pohrana uzoraka krvi izvan preporučenog područja temperature ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$)
- Nedovoljno miješanje epruveta za uzimanje krvi
- Nedovoljno pranje ELISA ploča

Ukoliko se pretpostavlja tehnički problem kod uzimanja krvi ili u rukovanju sa uzorcima, treba ponoviti cijeli test QuantiFERON®-TB Gold IT sa novim uzorkom krvi. ELISA test sa stimuliranim uzorcima plazme može se ponoviti, ako se pretpostavlja nedovoljno pranje ili druga odstupanja od propisane ELISA test metode. Nejasni rezultati, koji potiču iz niskih Mitogen vrijednosti ili visokih Nula vrijednosti, neće se mijenjati ponavljanjem testa, jedino ako je došlo do pogreške prilikom provođenja ELISA testa. Nejasne rezultate treba kao takve proslijediti. Liječnik će tada po potrebi uzeti novi uzorak krvi ili odrediti drugu vrst pretrage.

Zgrušani uzorci plazme

Ukoliko pri dužem pohranjivanju uzoraka plazme nastanu ugrušci fibrina, uzorke treba centrifugirati do stvaranja sedimenta, kako bi se plazma lakše pipetirala.

ELISA rješavanje problema

Nespecifična boja reakcije

MOGUĆI UZROCI	RJEŠENJE
Nedovoljno pranje ploča	Ploču prati najmanje 6x sa 400 µl pufera za ispiranje po udubljenju. Zavisno od primijenjenog uređaja za pranje može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporuča se pričekati najmanje 5 sekundi za namakanje.
Križna kontaminacija ELISA udubljenja	Brižljivo pipetiranje i miješanje uzoraka smanjuje rizik.
Održivost kita /komponenti istekla	Kontrolirajte da datum održivosti kita još nije istekao. Pobrinite se da Standard i 100x koncentrirani konjugat budu potrošeni u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije.
Enzimski otopina kontaminirana	Otklonite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Uvjerite se da se za reagense koriste samo čisti spremnici.

Niska vrijednost optičke gustoće kod standarda

MOGUĆI UZROCI	RJEŠENJE
Greška kod razblaživanja Standarda	Razrjeđenje Kit standarda provoditi točno po priloženoj uputi.
Pogrešno pipetiranje	Kontrolirajte da li su pipete kalibrirane i uporabljene točno po uputama proizvođača.
Temperatura inkubacije preniska	Inkubaciju za ELISA metodu treba vršiti na sobnoj temperaturi (17-27°C).
Vrijeme inkubacije prekratko	Vrijeme inkubacije ploče sa konjugatom, standardima i uzorcima treba trajati 120 ± 5 minuta. Enzimski otopina se inkubira na ploči 30 minuta.
Pogrešan filter za ploču	Ploču treba čitati pri 450 nm referentnim filtrom od 620-650 nm.
Reagensi pre hladni	Sve reagense (osim 100x koncentrirani konjugat) moraju postići prije početka testa sobnu temperaturu. To traje oko 60 minuta.
Održivost kita /komponenti istekla	Kontrolirajte da datum održivosti kita još nije istekao. Pobrinite se da Standard i 100x koncentrirani konjugat budu potrošeni u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije.

Jaka obojenost pozadine

MOGUĆI UZROCI	RJEŠENJE
Nedovoljno pranje ploča	Ploču prati najmanje 6x sa 400 µl pufera za ispiranje po udubljenju. Zavisno od primijenjenog uređaja za pranje može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporuča se pričekati najmanje 5 sekundi za namakanje.
Temperatura inkubacije previsoka	Inkubaciju za ELISA metodu treba vršiti na sobnoj temperaturi (17-27°C).
Održivost kita /komponenti istekla	Kontrolirajte da datum održivosti kita još nije istekao. Pobrinite se da Standard i 100x koncentrirani konjugat budu potrošeni u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije.
Enzimski otopina kontaminirana	Otklonite supstrat ako je poprmio plavkastu boju. Uvjerite se da se za reagense koriste samo čisti spremnici.

Nelinearna standardna krivula i odstupanja između replikata

MOGUĆI UZROCI	RJEŠENJE
Nedovoljno pranje ploča	Ploču prati najmanje 6x sa 400 µl pufera za ispiranje po udubljenju. Zavisno od primijenjenog uređaja za pranje može biti potrebno i više od 6 ciklusa pranja. Preporuča se pričekati najmanje 5 sekundi za namakanje.
Greška kod razblaživanja Standarda	Razrjeđenje Kit standarda provoditi točno po priloženoj uputi.
Nedovoljno miješanje	Promiješajte reagense brižljivo višekratnim okretanjem ili blagim vorteksiranjem, prije dispenciranja na ploču.
Nepodjednaka tehnika pipetiranja ili prekid pripremanja testa	Dispencirajte uzorke i Standarde kontinuirano. Svi reagensi moraju biti gotovo pripremljeni prije početka testa.

Video koji prikazuje postupak testiranja kao i rješenje najvećeg dijela tehničkih problema nalazi se na CD-ROM-u zajedno sa informacijama o produktu i tehničkim uputama. CD-ROM možete naručiti direktno kod firme Cellestis ili preko Vašeg isporučitelja.

11. BIBLIOGRAFIJA

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. [Epub ahead of print].
7. **Connell, T.G., et al.** A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. **Detjen, A.K., et al.** Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007. 45; 322-8.
9. **Diel, R., et al.** Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2008. [Epub ahead of print].
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2008. [Epub ahead of print].
17. **Kang, Y.A., et al.** Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA.* 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.

13. POSTUPAK TESTIRANJA (UKRATKO)

1. KORAK: INKUBIRANJE UZORKA KRVI

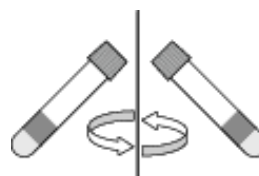
1. Uzmite krv od pacijenta u epruvete i dobro promiješajte uzorke **jakim mućkanjem u trajanju od 5 sekundi (ili 10 puta)**. Krv mora potpuno pokriti **unutarnju stijenku epruvete**.



2. Inkubirajte epruvete **u uspravnom položaju** 16-24 sata na temperaturi od 37°C.



3. Poslije inkubacije centrifugirajte epruvete 5-15 minuta pri obrtaju od 1500 - 2200g (RCF), da bi odvojili plazmu od crvenih krvnih stanica.

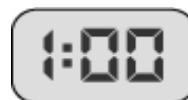


4. Nakon centrifugiranja uzmite uzorak plazme iz svake epruvete da bi odredili razinu IFN- γ .



2. KORAK: IFN- γ ELISA

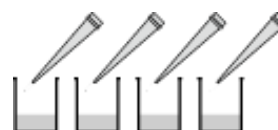
1. ELISA komponente – osim 100x koncentriranog konjugata – ostavite da se stabiliziraju na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta.



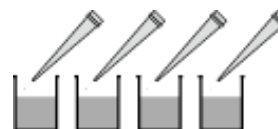
2. Rekonstituirajte Kit Standard destiliranom ili deioniziranom vodom na 8,0 IJ/ ml i pripremite 4 serije Standard otopine.



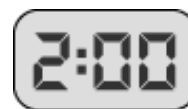
3. Rekonstituirajte liofilizirani, 100x koncentrirani konjugat sa destiliranom ili deioniziranom vodom.



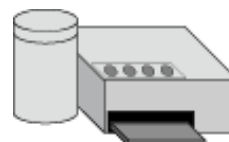
4. Pripremite pomoću zelenog razblaživača konjugat i podajte 50 μ l u svako udubljenje.



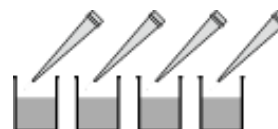
5. Podajte 50 μ l uzorka plazme i 50 μ l standarda u odgovarajuća udubljenja. Promiješajte tresilicom.



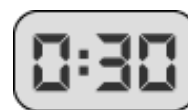
6. Inkubirajte 120 minuta na sobnoj temperaturi.



7. Izperite udubljenja najmanje 6x sa 400 μ l pufera za ispiranje po udubljenju.

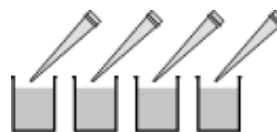


8. Podajte 100 μ l enzimske otopine u svako udubljenje. Promiješajte tresilicom.

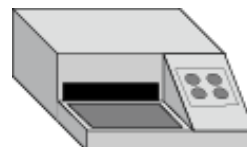


9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.

10. Dodajte 50 μ l stop reagensta u svako udubljenje.
Promiješajte tresilicom.



11. Očitajte rezultate na 450 nm primjenom referentnog filtra od 620-650 nm.



12. Interpretirajte rezultate.





Proizvedeno za:

Cellestis Limited (Australija) i Cellestis GmbH (Europa)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australija
Tel. (Australija) +61 3 9571 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0
E-Mail: quantiferon@cellestis.com
Web stranica: www.cellestis.com

Dok.-br. 05990301C
August 2009

EC	REP
----	-----

Autorizirani zastupnik:
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Germany

