

QuantiFERON[®]-TB Gold

(„In-Tube“- módszer = csőben)

**Az ESAT-6, CFP-10 és TB7.7(p.4) peptid antigének
kiváltotta IFN-gamma termelés
vizsgálata teljes vérben**

**HASZNÁLATI
ÚTMUTATÓ**

In vitro diagnosztikum

cellestis

TARTALOMJEGYZÉK

1. FELHASZNÁLÁSI TERÜLET	2
2. A VIZSGÁLAT ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MAGYARÁZATA	2
A vizsgálat alapjai	3
A vizsgálathoz szükséges idő	3
3. REAGENSEK ÉS TÁROLÁSUK	4
Szükséges anyagok, amelyeket a készlet nem tartalmaz	5
Tárolás	5
Vérvételi csövek	5
A készlet reagensei	5
Beoldott és fel nem használt reagensek	5
4. ÓVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK	6
Óvintézkedések	6
Figyelmeztetések	7
5. MINTA VÉTELE ÉS KEZELÉSE	8
6. ALKALMAZÁSI ÚTMUTATÓ	9
1. LÉPÉS: A vér inkubálása és a plazma elválasztása	9
2. LÉPÉS Humán IFN- γ ELISA	10
7. SZÁMÍTÁSOK ÉS A TESZT ÉRTÉKELÉSE	13
A standard görbe létrehozása	13
A vizsgálat minőségellenőrzése	14
Az eredmények értékelése	15
8. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI	19
9. MŰKÖDÉSI JELLEMZŐK	19
10. TECHNIKAI INFORMÁCIÓ	21
Nem egyértelmű eredmények	21
Alvadékos plazmaminták	21
ELISA hibaelhárítás	22
Aspecifikus színreakció	22
Alacsony OD értékek a standardoknál	22
Magas háttérszíneződés	23
Nem lineáris standard görbe és eltérés a replikátumok között	23
11. IRODALOMJEGYZÉK	24
12. MŰSZAKI SZOLGÁLAT	25
13. VIZSGÁLATI ELJÁRÁS (RÖVIDEN)	26

1. FELHASZNÁLÁSI TERÜLET

A QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) olyan *in-vitro* diagnosztikai teszt, amely heparinnal alvadásgátolt teljes vérben a sejteket ESAT-6, CFP-10 és TB7.7(p4) proteinek hatásával rendelkező peptid koktéllal stimulálja. Az Interferon- γ (IFN- γ) ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-módszerrel történő kimutatása a *Mycobacterium tuberculosis* fertőzéshez társuló peptid antigénekkal szembeni *in vitro* válaszreakción alapszik.

A QuantiFERON®-TB Gold IT a *M. tuberculosis*-fertőzés (és az azzal járó aktív betegség) közvetett kimutatására alkalmas teszt. A vizsgálat eredményeit a kockázati tényezőkkel, a radiológiai vizsgálatok és egyéb, orvosi és diagnosztikus vizsgálatok eredményeivel együtt kell értékelni.

2. A VIZSGÁLAT ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MAGYARÁZATA

A tuberculosis (Tb) fertőző betegség, amelyet a *M. tuberculosis* komplexbe tartozó mikroorganizmusok (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) okoznak. A légúti tuberculosisban szenvedő betegek a fertőzést általában cseppfertőzéssel terjesztik. Egy újonnan fertőződött egyén heteken, vagy hónapokon belül megbetegedhet tuberculosisban, bár a legtöbb esetben a fertőzött személynek nincsenek panaszai. Néhány betegnél a tuberculosis fertőzés látens formában (LTBI) perzisztál, nem fertőző, tünetmentes megbetegedésként, amely hónapokkal vagy évekkel később vezethet tuberculosishoz. Az LTBI felismerésének a fő célja az, hogy mérlegelni lehessen a gyógyszeres kezelést a tuberculosis megelőzése érdekében. Nemrégben még csak a tuberculin bőrteszt (tuberculin skin test, TST) volt az egyedüli rendelkezésre álló módszer az LTBI diagnosztizálására. A tuberculinnal szembeni bőrérzékenység a fertőzést követő 2-10 héten belül alakul ki. Ugyanakkor egyes fertőzött betegek nem reagálnak a tuberculinra, pl. azok, akiknél más megbetegedések miatt immunszuppresszió áll fenn. De vannak olyanok is, akiknél nem ismert ilyen zavar, mégsem lép fel reakció. Ennek az ellenkezője is előfordul. Vannak, akiknél ugyan valószínűtlen a *M. tuberculosis* fertőzöttség, de mégis érzékenyek a tuberculinra és a Calmette-Guérin bacillussal (BCG) történő oltás, a nem a *M. tuberculosis* komplexbe tartozó mycobacterium-fertőzés után, vagy egyéb, ismeretlen tényezők miatt a tuberculin-bőrteszt eredménye pozitív lesz.

Az LTBI-t meg kell különböztetni a tuberculosis betegségtől, amely általában a tüdőt és az alsó légutakat támadja meg, de más szervrendszereket is érinthet, és bejelentés-köteles. A tuberculosisot a kórtörténet, valamint a fizikális, radiológiai, szövettani és mikrobiológiai vizsgálatok eredményeinek összessége alapján diagnosztizálják.

A QuantiFERON®-TB Gold IT teszt egy olyan vizsgálat, melynek célja a mycobacterium-proteinek hatását szimuláló peptid-antigének elleni sejtközvetített immunitás (CMI) kimutatása. Ezek a proteinek (ESAT-6, CFP-10 és TB7.7(p4)) egyik BCG törzsben és a legtöbb nem-tuberculosis mycobacteriumban sincsenek jelen, kivéve a *M. kansasii*, *M. szulgai* és az *M. marinum* törzseket.¹ Az *M. tuberculosis* komplex tagjaival (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) fertőződött betegek vérében általában vannak olyan limfociták, amelyek ezeket az antigéneket és más mycobacteriális antigéneket felismerik. Ebben a felismerési folyamatban IFN- γ citokin keletkezik és szabadul fel. A vizsgálat az IFN- γ kimutatásán, majd mennyiségének meghatározásán alapszik.

A QuantiFERON®-TB Gold IT tesztben alkalmazott antigének olyan peptidkoktélt alkotnak, amely az ESAT-6, CFP-10 és a TB7.7(p4) fehérjék hatását szimulálja. Számos tanulmány kimutatta, hogy ezek a peptid antigének az *M. tuberculosis*-sal fertőzött betegektől származó T-sejtekben stimulálják az IFN- γ reakciót. De általában nem teszik ezt a nem fertőződött, vagy BCG-vel oltott, de LTBI kockázati csoportba nem tartozó egyének T-sejtjeiben.¹⁻³² Ugyanakkor azok az orvosi kezelések, vagy megbetegedések, amelyek csökkentik az immunrendszer működését, potenciálisan csökkenthetik az IFN- γ termelést is. Egyéb típusú mycobacterium-fertőzésben szenvedő betegek is érzékenyek lehetnek az ESAT-6, CFP-10 és TB7.7(p4) proteinekre, mivel az ezeket kódoló gének jelen vannak az *M. kansasii*, *M. szulgai* és az *M. marinum*^{1,2,3} törzsekben is. A QuantiFERON®-TB Gold IT ezért hasznos segítséget jelent a betegeknek az *M. tuberculosis* komplex fertőzés diagnosztizálására. A pozitív eredmény alátámasztja a tuberculosis betegség diagnózisát; ugyanakkor egyéb mycobacterium-törzsek (pl. *M. kansasii*) okozta fertőzések szintén pozitív eredményekhez vezethetnek. A tuberculosis betegség megerősítésére vagy kizárására további orvosi és diagnosztikai vizsgálatok is szükségesek.

A vizsgálat alapjai

A QuantiFERON® -TB Gold IT rendszer speciális vérvételi csöveket tartalmaz, a teljes vért ezekbe kell levenni. A levett vért a csövekben 16–24 órán át inkubálják, ezt követően a plazmát elkülönítik és vizsgálják a peptid antigének elleni reakcióként létrejövő IFN- γ jelenlétét.

A QuantiFERON® -TB Gold IT teszt végzése két lépésből áll. Először teljes vért vesznek a különböző QuantiFERON® -TB Gold vérvételi csövekbe. Ide tartozik egy Nil kontroll, egy TB Antigen és opcionálisan egy Mitogen cső.

A Mitogen cső a QuantiFERON® -TB Gold IT teszt során pozitív kontrollként használható. Alkalmazása különösen akkor javasolt, amikor kétséges az egyén immunrendszerének állapota. A Mitogen cső segítségével az is ellenőrizhető, hogy a vér kezelése és inkubálása megfelelő volt-e.

A csöveket minél előbb, de feltétlenül a vérvételtől számított 16 órán belül, 37°C-on inkubálni kell. A 16-24 órás inkubálás után a csöveket centrifugálják, elválasztják a plazmát, és az IFN- γ (NE/ml) mennyiségét ELISA módszerrel megméri.

A tesztet IFN- γ reakció szempontjából akkor tekintik pozitívnak, ha a TB Antigen csőben az IFN- γ szignifikánsan a Nil csőben mért (IFN- γ NE/ml) értéke fölötti. Ha alkalmazzák, a Mitogen cső plazmamintája IFN- γ pozitív kontrollként szolgál minden vizsgált minta esetében. Ha a Mitogénre adott reakció alacsony (<0,5 NE/ml), ez nem egyértelmű eredményt jelez akkor, ha a vérminta negatív reakciót mutat a TB antigénekre. Ez akkor is előfordulhat, ha nincs elegendő limfocita vagy csökkent a limfocita-aktivitás a helytelen mintakezelés, vérvétel vagy a Mitogen cső nem megfelelő felrázása miatt, vagy, ha a beteg limfocitái nem képesek az IFN- γ termelésre. A Nil minta alapján az aspecifikus háttér, a heterofil antitest-kötődések⁷, vagy a vérmintában aspecifikusan termelődő IFN- γ határozható meg. A Nil csőben mért IFN- γ szintet kivonják a TB Antigen csőben és (amennyiben használják) a Mitogen csőben mért IFN- γ szintből.

A vizsgálathoz szükséges idő

A QuantiFERON® -TB Gold IT teszt elvégzéséhez szükséges idő megközelítőleg a következő; egyúttal jelezzük az egyszerre több minta vizsgálatához szükséges időt Batch üzemmódban is:

37°C-on a vérvételi csövek inkubálása: 16-24 óra

ELISA: Kb. 3 óra egy ELISA lemezhez

- < 1 óra laboratóriumi munka
- lemezenként további 10–15 perc

3. REAGENSEK ÉS TÁROLÁSUK

Tuberculosis- és kontroll antigén vérvételi csövek

Rendelési szám: 0590 0301

- | | |
|--------------------------------------|------------|
| 1. Nil kontroll cső (szürke kupak) | 100 db cső |
| 2. Tb Antigen cső (vörös kupak) | 100 db cső |
| 3. Mitogen kontroll cső (lila kupak) | 100 db cső |

MEGJEGYZÉS: A csövek a következő kiszereelésben is kaphatók:

100 db Nil kontroll cső + 100 db Tb Antigen cső (rend. sz. 0590 0201)

100 db Mitogen kontroll cső (rend. sz. 0593 0201)

Magas fekvésű területeken használandó csövek:

Rend. sz. 05900210: (nagy magasságban) 100 db Nil kontroll cső, 100db Tb Antigen cső

Rend. sz. 05900505: (nagy magasságban) 100 db Nil kontroll cső, 100db Tb Antigen és 100 db Mitogen kontroll cső

Rend. sz. T0593 0502: (nagy magasságban) 100 db Mitogen kontroll cső

ELISA-komponensek

Rend. sz.: 0594 0201

- | | |
|--|------------------|
| 1. Mikrotitráló csíkok | 24 x 8 mintahely |
| 2. Humán IFN- γ standard, liofilizált | 1 ampulla |
| 3. Zöld hígító oldat | 1 x 30 ml |
| 4. Konjugátum (100-szoros töménységű), liofilizált | 1 x 0,3 ml |
| 5. Mosó puffer (20-szoros töménységű) | 1 x 100 ml |
| 6. Enzim szubsztrát oldat | 1 x 30 ml |
| 7. Enzim stop (leállító) oldat | 1 x 15 ml |

Szükséges anyagok, amelyeket a készlet nem tartalmaz

- 37 °C inkubátor; CO₂ nem szükséges.
- Kalibrált, különböző térfogatú (10 μ l-1000 μ l) pipetták, egyszerhasználatos hegygel
- Kalibrált, 50 μ l és 100 μ l bemérésére alkalmas többszoros pipetta, egyszerhasználatos hegygel
- Mikrotitráló lemez rázókészülék
- Ionmentes vagy desztillált víz (2 liter)
- Mikrotitráló lemezmosó (lehetőleg automata)

- Mikrotitráló lemezolvasó 450 nm-es szűrővel és 620-650 nm referenciaszűrővel

Tárolás

Vérvételi csövek

- A vérvételi csöveket tárolja 4 °C - 25 °C-on.
- A QuantiFERON®-TB Gold vérvételi csövek a gyártás idejétől számítva 15 hónapig használhatók fel (tárolás 4 °C – 25 °C között).

A készlet reagensei

- Tárolja a készletet 2 °C – 8 °C-on.
- Az enzim szubsztrát oldatot óvja a közvetlen napfénytől.
- A QuantiFERON®-TB Gold IT ELISA készlet a gyártás idejétől számítva 3 évig használható fel (tárolás 2°C - 8°C-on).

Beoldott és fel nem használt reagens

A reagens rekonstituálására vonatkozó útmutatót lásd „A reagens előkészítése” című 6. fejezetben.

- A 2°C-8°C-on tárolt Kit Standard a rekonstituálástól számított 3 hónapon belül használható fel.
 - *Jegyezze fel a Kit Standard rekonstituálásának időpontját.*
- A rekonstituálás után a fel nem használt tömény (100x) konjugátumot továbbra is 2°C-8°C-on kell tárolni és szintén 3 hónapon belül fel kell használni.
 - *Jegyezze fel a konjugátum rekonstituálásának időpontját.*
- A használatra kész konjugátumot az előkészítéstől számított 6 órán belül fel kell használni.
- A használatra kész mosó puffer szobahőmérsékleten 2 hétig tartható el.

4. ÓVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

Óvintézkedések

- A negatív QuantiFERON®-TB Gold IT teszteredmény nem zárja ki az *M. tuberculosis* fertőzést, vagy a tuberculosis betegséget: álnegatív eredményhez vezethet a fertőzés stádiuma (pl. a mintavétel a sejtes immunválasz kialakulása előtt történt), egyéb betegség, amely befolyásolja az immunfunkciót; a vérvételi csövek helytelen kezelése a vérvételt követően, a módszer helytelen végzése, vagy egyéb, az immunrendszert érintő eltérések.
- Nem lehet egyedül és kizárólag csak a pozitív QuantiFERON®-TB Gold IT teszteredményre alapozni a *M. tuberculosis* fertőzés diagnózisát. A módszer helytelen végzése álpozitív eredményt okozhat.
- Ha a QuantiFERON®-TB Gold IT teszt eredménye pozitív, akkor további orvosi és diagnosztikai vizsgálatokra (pl. AFB köpetvizsgálat és tenyésztés, mellkas-röntgen) van szükség az aktív tuberculosis betegség kimutatására.
- Míg az ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4) egyetlen BCG törzsben, és a legtöbb ismert nem tuberculosis mycobaktériumban sincs jelen, addig lehet, hogy a QuantiFERON®-TB Gold IT teszt pozitív eredményének oka *M. kansasii*, *M. szulgai* vagy *M. marinum* fertőzés. Ha fennáll ezeknek a fertőzéseknek a gyanúja, alternatív tesztmódszereket kell alkalmazni.

Figyelmeztetések

- **A diagnosztikum csak *in vitro* alkalmazható.**
- **Veszélyes:** Az **enzim szubsztrát oldat** 3,3',5,5' tetrametil-benzidint tartalmaz, amelynek lenyelése, belégzése, érintése veszélyes. Bőrre és szemre irritáló hatású. Mutagén hatású. Viseljen védőszemüveget, laboratóriumi védőkesztyűt, és kezelje az oldatot potenciálisan rákkeltő anyagként.
- **Veszélyes:** Az **enzim stop reagens** H₂SO₄-et tartalmaz, amelynek lenyelése, belégzése, szemmel és bőrrel való érintkezése veszélyes. Viseljen védőszemüveget, laboratóriumi védőkesztyűt és laboratóriumban használatos védőruházatot. Ha a gátlóoldat szembe, vagy bőrre jut, öblítse le bőven vízzel, és forduljon orvoshoz.
- **Veszélyes:** Az **IFN-γ Standard és a 100x töménységű konjugátum** lenyelve rosszul érzékelhető lehet, a bőrre kerülve irritálhatja a bőrt. Viseljen védőkesztyűt és laboratóriumban használatos védőruházatot.
- **A humán vérmintát mindig potenciálisan fertőzőként kezelje!** Tartsa be a vér kezelésére vonatkozó utasításokat!
- Néhány reagens **thimerosal** tartósítószerrel tartalmaz. A thimerosal lenyelése, belégzése, érintése mérgező hatást válthat ki.
- A **zöld hígító oldat** normál egérszérumot és kazeint tartalmaz; ezek az anyagok allergiás reakciót válthatnak ki. Kerülje a bőrrel való érintkezést.
- A Használati útmutatóban leírt eljárástól és instrukcióktól való eltérés hibás eredményekhez vezethet. Kérjük, hogy használat előtt figyelmesen olvassa el az útmutatót.
- Ne használja fel a reagens-készletet, ha a benne levő egy vagy több reagens üvege sérült vagy szivárog.
- Ne keverje össze, vagy használjon fel eltérő gyártási számú QuantiFERON[®]-TB Gold IT kitekből származó ELISA reagenseket ennek a csomagolásnak a komponenseivel.
- A fel nem használt reagenseket és biológiai mintákat a helyi és országos előírásoknak megfelelően távolítsa el.
- A vérvételi csöveket és az ELISA készlet komponenseit a lejáratási idő eltelte után nem szabad felhasználni.

5. MINTA VÉTELE ÉS KEZELÉSE

A QuantiFERON®-TB Gold IT teszt a következő vérvételi csöveket tartalmazza:

1. Nil kontroll (szürke kupak fehér gyűrűvel) (810 m feletti tengerszint feletti magasságig)
2. Tb Antigen (vörös kupak fehér gyűrűvel) (810 m feletti tengerszint feletti magasságig)
3. Mitogen kontroll - opcionális (lila kupak fehér gyűrűvel) (810 m feletti tengerszint feletti magasságig)
4. Nil kontroll (szürke kupak sárga gyűrűvel) (1020 m-től 1875 m-ig terjedő tengerszint feletti magasságig)
5. Tb Antigen (vörös kupak sárga gyűrűvel) (1020 m-től 1875 m-ig terjedő tengerszint feletti magasságig)
6. Mitogen kontroll - opcionális (lila kupak sárga gyűrűvel) (1020 m-től 1875 m-ig terjedő tengerszint feletti magasságig)

Az antigének a vérvevő cső belső falára vannak rászárítva. Fontos tehát, hogy a vérminta alaposan elkeveredjen cső tartalmával. A csöveket minél hamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül inkubátorba (37 °C) kell helyezni.

Az optimális eredmények elérése érdekében a következő utasításokat kell betartani:

1. Betegenként a QuantiFERON®-TB Gold IT minden egyes vérvételi csövébe vegyen le 1 ml vénás vért.

- 810 m magasságig a QuantiFERON® standard vérvételi csöveket kell használni. 1020 m-nél nagyobb magasságban a speciális, magas fekvésű területekre készült QuantiFERON® vérvételi csöveket használjuk.

Ha a QuantiFERON® csöveket a nevezett magasságokon kívül alkalmazzuk, vagy ha a minta térfogata kisebb, a vért fecskendővel is vehetjük; ekkor a három cső mindegyikébe 1-1 ml vért mérünk be. Biztonsági okokból legjobb, ha a tűt ilyenkor eltávolítjuk, betartva eközben az általános biztonsági előírásokat. Vegye le a három QFT-Gold IT cső kupakját és mérjen be mindhárom csőbe 1 ml vért (az etikett oldalsó szélén található fekete jelzésig). Ezután a kupakokat helyezze vissza és végezze el a keverést az alábbiakban megadottak szerint.

- Mivel az 1 ml-es csövek a vért viszonylag lassan szívják, tartsa a tűn a csövet 2-3 másodperccel tovább, miután a cső látszatra megtelt. Így biztosan a megfelelő vérmennyiséget veszi le.

A csövek oldalán lévő fekete jelzés mutatja az 1ml mennyiséget. A QuantiFERON®-TB Gold vérvételi csöveket 0,8 ml-től 1,2 ml-ig terjedő mennyiségre validálták. Ha a levett vérmennyiség nem éri el az indikátor vonalat, újabb vérminta vétele javasolt.

- Ha pillangókanült használ vérvételre, először egy üres csövet kell használni annak biztosítására, hogy a vezeték megteljen vérrel, mielőtt a QuantiFERON®-TB csövekbe venné le a vért.

2. Keverje el a cső tartalmát **5 másodpercig tartó alapos rázással** (vagy 10x fel-le rázogatva). Győződjön meg róla, hogy a cső **teljes belső felszíne** érintkezik a vérrel.

- Alapos keverésre van szükség, hogy a cső tartalma teljesen összekeveredjen a vérmintával.
- Rázás közben bizonyos habképződés várható. Ez nem befolyásolja a teszt teljesítményét és nem ok aggodalomra.

3. Feliratozza a csöveket.

4. A csöveket minél hamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül inkubátorba (37 °C) kell helyezni. A vérmintákat ne tegye hűtőbe vagy fagyasztozóba!

6. ALKALMAZÁSI ÚTMUTATÓ

1. lépés: A vérminta inkubálása és a plazma elválasztása

A készlet tartalma

QuantiFERON®-TB Gold IT vérvételi csövek (ld. 3. fejezet).

Szükséges anyagok, amelyeket a készlet nem tartalmaz

Ld. 3. fejezet

A vizsgálat menete

1. Ha a vért nem inkubálják azonnal a vérvétel után, **a csövek tartalmát közvetlenül az inkubálás előtt ismét meg kell keverni ill. fel kell rázni** az 5. fejezetben leírtak szerint.
2. Inkubálja a csöveket **ÁLLÓ HELYZETBEN** 37 °C-on 16-24 órán keresztül. Ehhez nem szükséges CO₂ vagy nedvesség.
3. A vérvételi csövek a centrifugálást megelőzően max. 3 napig tárolhatók 2°C és 27°C közötti hőmérsékleten.
4. A csövek 37 °C-on történő inkubálása után a plazma elválasztása a csövek 5 – 15 perces centrifugálásával , 1500 – 2200g (RCF) fordulatszámom történik. A dugóképződés által a sejtek leválnak a plazmáról. Amennyiben ez nem történik meg, a csöveket nagyobb fordulatszámom újra kell centrifugálni.
 - A plazmát centrifugálás nélkül is el lehet választani, de ekkor fokozott figyelemmel kell eljárni, hogy a plazma eltávolításakor a vérsejtek ne kavardjanak fel.
5. A plazmaminták a vérvételi csövekből közvetlenül rámérhetők a QuantiFERON®-TB Gold ELISA lemezre, különösen automata ELISA készülék alkalmazása esetén.
6. Másik lehetőség a plazmaminták ELISA mérés előtt közvetlenül a centrifugált csövekben, vagy plazmatárolóban való tárolása (pl. >150 µl mennyiséget a 96-os lemez mintahelyeiben, vagy mikrocövekben kell tárolni, és a kifröccsenés vagy elpárolgás megakadályozására le kell takarni).
 - A plazmaminták 2°C–8°C-on max. 4 hétig tárolhatók, –20 °C alatti hőmérsékleten (lehetőleg –70°C alatt) még hosszabb ideig tárolhatók.

2. lépés: Humán IFN- γ ELISA

A készlet tartalma

QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA készlet (ld. 3. fejezet).

Szükséges anyagok, amelyeket a készlet nem tartalmaz

Ld. 3. fejezet.

A vizsgálat menete

1. Az összes plazmamintát és reagenst, kivéve a 100x töménységű konjugátumot, használat előtt szobahőmérsékletre kell hagyni felmelegedni ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Számítson erre legalább 60 percet.
2. Vegye le a keretről azokat a csíkokat, amelyekre nem lesz szüksége, tegye őket vissza a fóliába és tárolja a hűtőben, amíg nem lesz rájuk szüksége.

Hagyjon legalább egy csíkot a QuantiFERON[®]-TB standardok számára, és a vizsgálandó betegek számától függően elegendő számú csíkot (ld. a 2A és 2B ábrát a két illetve három cső felhasználásával végzett vizsgálatokhoz). Használat után tartsa meg a keretet és a fedőt a megmaradt csíkok felhasználásához.

3. Rekonstituálja a liofilizált Kit Standardot a standard ampulla címkéjén megadott mennyiségű ionmentes vagy desztillált vízzel. Óvatosan keverje meg (minimális habképződés) és győződjön meg róla, hogy a tartalom teljesen feloldódott. A Standard előírt mennyiségre való rekonstituálása esetén 8,0 IE/ml koncentrációjú oldatot kap.

Megjegyzés: A Kit Standard rekonstituálásához szükséges térfogat gyártási sorozatonként eltérő!

A rekonstituált Kit Standard-dal készítsen 1:4 hígítási sort az IFN- γ és a zöld hígító oldat (GD) keverékével – ld. 1. ábra. Az IFN- γ szint az S1 (Standard 1) esetében 4 NE/ml, az S2 (Standard 2) esetében 1 NE/ml, az S3 (Standard 3) esetében 0,25 NE/ml és az S4 (Standard 4) esetében 0 NE/ml (csak GD). A standardokat legalább kétszer meg kell mérni.

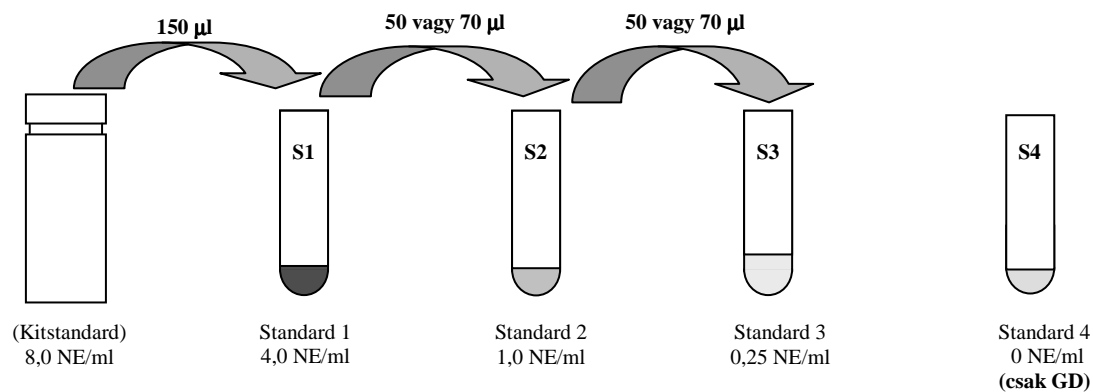
JAVASOLT ELJÁRÁS DUPLIKÁT STANDARDOK ELKÉSZÍTÉSÉRE

- a. Jelöljön meg 4 csövet a következő felirattal: „S1”, „S2”, „S3”, „S4”.
- b. Mérjen be **150 μl** GD-t az S1, S2, S3, S4 csövekbe.
- c. Mérjen be **150 μl** Kit Standardot az S1-hez, és keverje meg alaposan.
- d. Mérjen be **50 μl** -t az S1-ből az S2-be, és keverje meg alaposan.
- e. Mérjen be **50 μl** -t az S2-ből az S3-ba, és keverje meg alaposan.
- f. **Csak GD** zéró standardnak (S4) felel meg.

JAVASOLT ELJÁRÁS TRIPLIKÁT STANDARDOK ELKÉSZÍTÉSÉRE

- a. Jelöljön meg 4 csövet a következő felirattal: „S1”, „S2”, „S3”, „S4”.
- b. Mérjen be **150 μl** GD-t az S1-be.
- c. Mérjen be **210 μl** GD-t az S2, S3, S4 csövekbe.
- d. Mérjen be **150 μl** Kit Standardot az S1-hez és keverje meg alaposan.
- e. Mérjen be **70 μl** -t az S1-ből az S2-be, és keverje meg alaposan.
- f. Mérjen be **70 μl** -t az S2-ből az S3-ba, és keverje meg alaposan.
- g. **Csak GD** zéró standardnak (S4) felel meg.

1. ÁBRA: A standard görbe létrehozása



- Mindegyik ELISA futtatáshoz készítsen friss Kit Standard oldatot.
4. Rekonstituálja a liofilizált 100x töménységű konjugátumot 0,3 ml ionmentes vagy desztillált vízzel. Óvatosan keverje el (minimális habképződés) majd győződjön meg róla, hogy a konjugátum teljesen feloldódott.

A használatra kész konjugátumot megfelelő mennyiségű rekonstituált 100x tömény konjugátum zöld hígító oldatban történő hígításával nyerjük az 1. táblázatban (A konjugátum elkészítése) foglaltak szerint.

1. TÁBLÁZAT A konjugátum elkészítése

A csíkok száma	A 100x tömény konjugátum mennyisége	A zöld hígító oldat mennyisége
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

- Keverjük el alaposan, de óvatosan, kerülve a habképződést.
 - Használat után a fel nem használt 100x tömény konjugátumot azonnal 2 °C -8 °C-on kell tárolni.
 - Hígításhoz kizárólag a zöld hígító oldatot használja.
5. Mérés előtt a plazmamintákat meg kell keverni, hogy az IFN- γ egyenletesen eloszljék az egész mintában.
6. Mérjen a többcsatornás pipettával 50 µl frissen elkészített használatra kész konjugátumot az ELISA lemezen a megfelelő mintahelyekre.
7. Mérjen be a többcsatornás pipettával 50 µl-t a plazmamintákból a megfelelő mintahelyekre (ld. a javasolt lemezbeosztást az alábbi 2A és 2B ábrákon). Végül mérjen be 50 µl-t az 1-4 jelzésű standardok mindegyikéből a megfelelő helyekre.

2A. ÁBRA: Javasolt mintaelhelyezés a Nil és Tb Antigént tartalmazó csövek esetében (44 vizsgálat lemezenként)

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

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Minta 1, Nil kontroll plazma); 1A (Minta 1, Tb Antigén plazma).

2B. ÁBRA: Javasolt mintaelhelyezés Nil kontroll, Tb Antigént és Mitogent tartalmazó csövek esetében (28 vizsgálat lemezenként)

Sor	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 (Minta 1, Nil kontroll plazma); 1A (Minta 1, Tb Antigén plazma); 1M (Minta 1, Mitogen kontroll plazma).

8. Keverje el 1 percig alaposan a konjugátumot és a plazmamintákat/standardokat mikrotitráló lemez rázókészülékkel.
9. Takarjon be minden lemezt fedőlappal és inkubálja a lemezeket 120 ± 5 percig szobahőmérsékleten ($22^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Az inkubálás alatt a lemezeket közvetlen napfénytől óvni kell.
10. Az inkubálás alatt hígítson fel egy rész 20x tömény mosó puffert 19 rész ionmentes vagy desztillált vízzel, és alaposan keverje el. A reagenskészlet 2 liter használatra kész mosó puffer előállításához elegendő 20x tömény mosó puffert tartalmaz.

Mossa ki a mintahelyeket legalább 6-szor **400 µl** használatra kész mosó pufferrel. Javasoljuk automata lemezmosó alkalmazását.

- A vizsgálat sikeres elvégzésének fontos feltétele az alapos mosás. Győződjön meg minden mosóciklusban arról, hogy minden mintahely **színültig megtelt** mosó pufferrel. Javasolt a ciklusok között legalább 5 másodperces áztatási időt betartani.
- A használt mosó puffert felfogó edénybe laboratóriumokban használatos fertőtlenítőszerrel kell tenni. Ezen kívül az Ön laboratóriumában érvényes, potenciálisan fertőző anyagokra vonatkozó dekontaminálási előírásokat is be kell tartani.

11. A bemélyedésekkel lefelé veregesse ki a lemezeket papírkendő felett, eltávolítva ezzel a bennük maradt puffert. Adjon 100 µl enzim szubsztrát oldatot minden bemélyedésbe, és keverje el alaposan rázókészülék segítségével.
12. Takarjon be minden lemezt fedőlappal és inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
 - Az inkubálás alatt a lemezeket közvetlen napfénytől óvni kell.
13. A 30 perces inkubálást követően adjon 50 µl enzim stop (leállító) oldatot minden mintahelyre és keverje meg.
 - Az enzim stop oldatot ugyanabban a sorrendben és megközelítőleg ugyanolyan sebességgel kell a mélyedésekbe adagolni, mint a szubsztrátumot a 11. pontban.
14. A reakció leállítását követő 5 percen belül mérje meg minden mintahely optikai denzitását (OD) 450 nm-es szűrővel és 620-650 nm-es referenciaszűrővel ellátott mikrotitráló lemez olvasó segítségével. Az eredmények kiszámítása az OD értékek alapján történik.

7. SZÁMÍTÁSOK ÉS A TESZT ÉRTÉKELÉSE

Cellestis a mérési adatok elemzésére és az eredmények kiszámítására a QuantiFERON[®]-TB Gold IT Analysis szoftvert kínálja Önnek.

A szoftver elvégzi a vizsgálat minőségellenőrzését, létrehozza a standard görbét, és kiszámítja minden vizsgált beteg teszteredményét az alább leírt értékelési módszer alapján.

A QuantiFERON[®]-TB Gold IT Analysis szoftver alkalmazása mellett másik megoldás az eredmények kiszámításához az alább leírt módszer:

A standard görbe létrehozása

(ha nem a QuantiFERON[®]-TB Gold IT szoftvert használják)

Határozza meg a Kit Standard replikátumok OD középértékét minden lemezen.

Hozzon létre grafikus ábrázolással egy $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standard görbét úgy, hogy az OD (y-tengely) $\log_{(e)}$ középértékét bejelöli a standardok IFN- γ koncentrációjának NE/ml-ben kifejezett $\log_{(e)}$ értékével szemben (x-tengely), kihagyva a zéró standard értéket a számításokból. Számítsa ki a standard görbéhez legjobban illeszkedő görbét regressziós analízissel.

A vizsgált plazmaminták esetében mért OD érték alapján a standard görbén határozza meg a minták IFN- γ koncentrációját (NE/ml) .

Ezeket a számításokat el lehet végezni a mikrotitráló lemez olvasóhoz beszerezhető szoftver csomagok, standard képletek, vagy statisztikai szoftver (mint pl. a Microsoft Excel) segítségével. Javasoljuk ezek a programcsomagok használatát a regressziós analízis, a standardok variációs koefficiense (%CV), és a standard görbe korrelációs koefficiense (r) kiszámításához.

A vizsgálat minőségellenőrzése

A vizsgálati eredmények pontossága függ a létrehozott standard görbe pontosságától. Tehát a minták eredményeinek értelmezése előtt a standardok alapján levezetett eredményeket ellenőrizni kell.

Az ELISA vizsgálat érvényes, ha az összes alábbi kritérium teljesítve van:

- **A Standard 1 OD középértékének $\geq 0,600$ kell lennie.**
- **Az ismételten mért Standard 1 és Standard 2 OD értékeknél a $\%CV \leq 15\%$ -nak kell lennie.**
- **A Standard 3 és Standard 4 replikátum OD értékeinek nem szabad $0,040$ OD egységnél nagyobb mértékben eltérniük a középértékektől.**
- **A standardok abszorbancia középértékéből kiszámított korrelációs koefficiens értéknek (r) $\geq 0,98$ -nak kell lennie.**

A QuantiFERON[®]-TB Gold IT Analysis szoftver kiszámítja és feltünteti ezeket a minőségellenőrzési paramétereket.

Ha a fent leírt kritériumok nincsenek kielégítve, a vizsgálat eredménye érvénytelen, a vizsgálatot meg kell ismételni.

- **A Zéró Standard (zöld hígító oldat) OD középértékének $\leq 0,150$ -nek kell lennie. Ha az OD középérték $> 0,150$, javasoljuk a lemezmosás ellenőrzését.**

Az eredmények értékelése

A QuantiFERON[®]-TB Gold IT vizsgálat eredményeit a következő kritériumok szerint kell értékelni:

MEGJEGYZÉS: A tuberculosis betegség diagnosztizálása, vagy kizárása, valamint az LTBI valószínűsítése szükségessé teszi az epidemiológiai adatok, az anamnézis, a fizikális és a diagnosztikus vizsgálatok eredményeinek együttes értékelését; mindezt figyelembe kell venni a QuantiFERON[®]-TB Gold IT eredményeinek értelmezésekor.

HA CSAK A NIL KONTROLL ÉS TB-ANTIGÉN CSÖVEKET HASZNÁLJÁK

Nil [NE/ml]	Tb-Antigén mínusz Nil [NE/ml]	QuantiFERON[®]-TB [NE/ml]	Vélemény/Értelmezés
≤ 8,0	< 0,35	negatív	<i>M. tuberculosis</i> fertőzés NEM valószínű
	≥ 0,35 és < 25% Nil érték		
	≥ 0,35 és ≥ 25% Nil érték	pozitív¹	<i>M. tuberculosis</i> fertőzés valószínű
> 8,0 ²	bármennyi	nem egyértelmű³	A Tb Antigén reakció eredményei nem egyértelműek

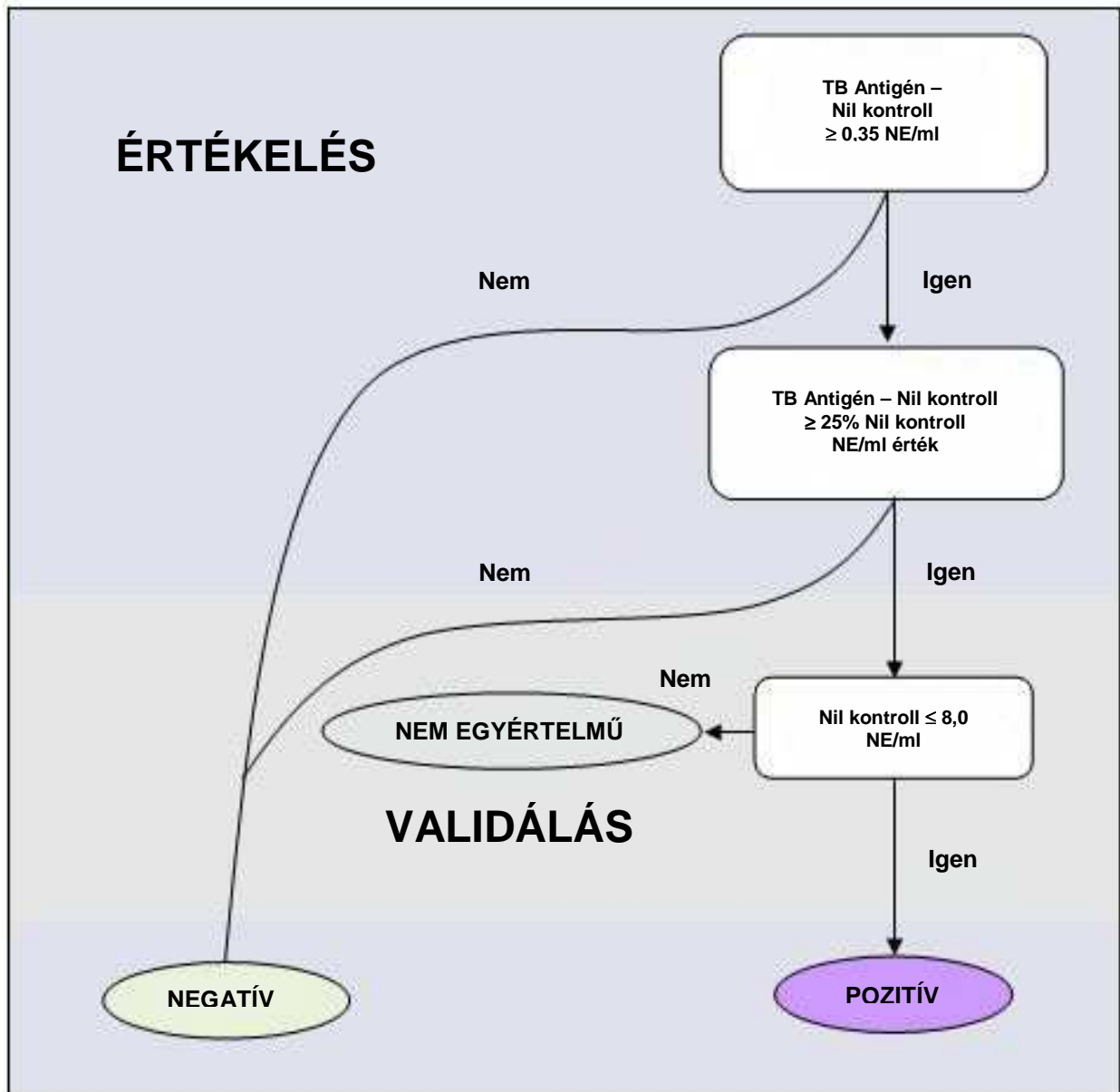
¹ Amikor *M. tuberculosis* fertőzést nem feltételeznek, a kezdeti pozitív eredményeket úgy lehet megerősíteni, hogy duplikátumban újra tesztelik az eredeti plazmamintákat QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA módszerrel. Ha az első vagy második replikátum ismételt tesztelése pozitív eredményt mutat, a vizsgálat eredménye pozitív.

² A klinikai tanulmányok résztvevőinek kevesebb, mint 0,25 %-nál fordult elő, hogy a Nil kontroll során az IFN- γ koncentrációjuk > 8,0 NE/ml volt.

³ A lehetséges okok megállapításához ld. a Hibaelhárítás című fejezetet.

A mért IFN- γ szint nem függ össze a fertőzés fázisával vagy fokával, az immunválasz-készség mértékével, vagy azzal, hogy mekkora a súlyosbodás valószínűsége aktív megbetegedésben.

3. ÁBRA A kiértékelés folyamatábrája NIL és TB ANTIGÉN csövek alkalmazása esetén



NIL, TB ANTIGÉN ÉS MITOGEN CSÖVEK ALKAMAZÁSA ESETÉN:

<u>Nil</u> [NE/ ml]	<u>Tb Antigen mínusz Nil</u> [NE/ml]	<u>Mitogen mínusz Nil</u> [NE/ ml] ¹	QuantiFERON®-Tb [NE/ml]	Vélemény/Értékelés
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	negatív	<i>M. tuberculosis</i> fertőzés NEM valószínű
	≥ 0,35 és < 25% Nil érték	≥ 0,5		
	≥ 0,35 és ≥ 25% Nil érték	bármennyi	pozitív²	<i>M. tuberculosis</i> fertőzés valószínű
	< 0,35	< 0,5	nem egyértelmű³	A Tb Antigen reakció eredményei nem egyértelműek
	≥ 0,35 és < 25% Nil érték	< 0,5		
> 8,0 ⁴	bármennyi	bármennyi		

¹ A pozitív Mitogen kontrollra (és esetenként Tb Antigenre) kialakult reakció gyakran a mikrotitráló lemez olvasó méréstartományán kívül esik. Ennek azonban nincsen kihatása a teszteredményekre.

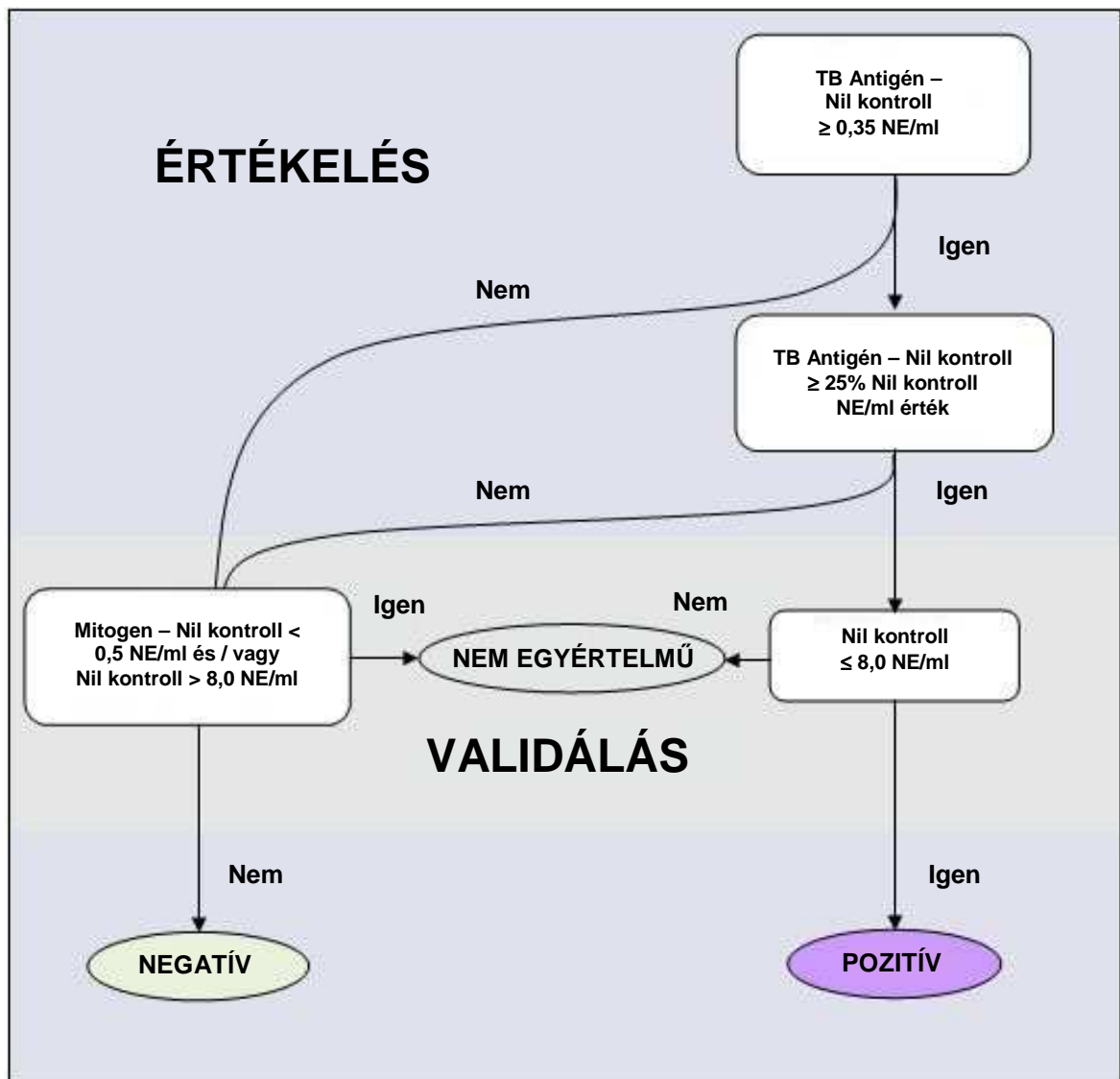
² Amikor *M. tuberculosis* fertőzést nem feltételeznek, a kezdeti pozitív eredményeket úgy lehet megerősíteni, hogy duplikátumban újra tesztelik az eredeti plazmamintákat QuantiFERON®-TB Gold ELISA módszerrel. Ha a megismételt tesztnél az egyik vagy mindkét replikátum pozitív, a vizsgálat eredménye pozitív.

³ A lehetséges okok megállapításához ld. a Hibaelhárítás című fejezetet.

⁴ A klinikai tanulmányok résztvevőinek kevesebb, mint 0,25 %-nál fordult elő, hogy a Nil kontroll során az IFN- γ -koncentrációjuk > 8,0 NE/ml volt.

A mért IFN- γ szint nem függ össze a fertőzés fázisával vagy fokával, az immunválasz-készség mértékével, vagy azzal, hogy mekkora a súlyosbodás valószínűsége aktív megbetegedésben.

4. ÁBRA: A kiértékelés folyamatábrája NIL, TB ANTIGÉN és MITOGEN csövek alkalmazása esetén



8. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

A QuantiFERON®-TB Gold IT teszt eredményeit minden egyes betegnél annak kórtörténetével, aktuális egészségi állapotával és az egyéb diagnosztikai vizsgálatok eredményeivel együtt kell értékelni.

Azoknak az egyéneknek az eredményeit, akiknél a Nil értékek 8 NE/ml-nél magasabbak voltak, a “nem egyértelmű” csoportba kell sorolni, mivel a Tb antigének elleni reakció 25%-os emelkedése esetén az IFN- γ szint a vizsgálat méréstartományán kívül eshet.

A nem megbízható vagy nem egyértelmű eredmények oka a következő lehet:

- eltérés a használati útmutatóban leírt eljárástól
- a keringő IFN- γ koncentrációja túl magas, vagy heterofil antitestek vannak jelen
- a mintavétel és a 37 °C-os inkubálás között 16 óránál több idő telt el

9. MŰKÖDÉSI JELLEMZŐK

Klinikai vizsgálatok

Mivel a látens tuberculosis fertőzés (LTBI) kimutatására nincs általánosan elfogadott vizsgálat, a QuantiFERON®-TB Gold IT esetében gyakorlatilag nem lehet megadni pontos szenzitivitást és specifitást. A QuantiFERON®-TB Gold IT esetében a specifitás közelítő értékét úgy adták meg, hogy meghatározták az álpozitív eredményeket azoknál a személyeknél, akiknél alacsony volt a tuberculosis fertőzés kockázata (akiknél nem volt ismert kockázati tényező). A szenzitivitás közelítő értékét olyan betegcsoportok vizsgálata alapján adták meg, amelyekben tenyésztéssel bizonyították az aktív Tb-fertőzés jelenlétét.

Specifitás

Az Egyesült Államokban 866 önkéntest vontak be egy vizsgálatba; a résztvevőktől a TST (tuberculin bőrteszt) végzésekor vették le a vért a QuantiFERON®-TB Gold IT teszthez. A demográfiai adatokat és a Tb kockázati tényezőit a teszt elvégzésével egyidőben standardizált kérdőívvel vették fel. Abból a 432 önkéntesből, akiknél nem álltak fenn a *M. tuberculosis* fertőzés kockázati tényezői, 391 személy esetében állt rendelkezésre a QuantiFERON®-TB Gold IT eredménye mellett a TST vizsgálat eredménye is. Egyik önkéntes sem kapott BCG oltást. Egy második QuantiFERON®-TB Gold IT teszt specifitását meghatározó vizsgálatra Japánban került sor, olyan egyéneknél, akiknél kicsi volt a betegség kockázat, és akiknek kb. 90 % kapott előzőleg BCG oltást. A két specifitásvizsgálat eredményét a 2. számú táblázat ábrázolja.

2. táblázat: A QuantiFERON®-TB Gold IT vizsgálat specifitása olyan személyeknél, akiknél nem álltak fenn a *M. tuberculosis* fertőzés kockázati tényezői.

VIZSGÁLAT	BCG státusz % beoltottak száma	Vizsgált egyének összesen	Nem egyértelmű eredményű vizsgálatok	QFT-G pozitív / érvényes tesztek száma	QFT-G specifitás (95% CI)	TST pozitív / vizsgált egyének száma	TST* specifitás (95% CI)
USA (nem publikált)	0%	391	1	3 / 390	99.2% (97.6-99.8)	6 / 391	98.5% (96.5-99.4)
Japán (nem publikált)	~90%	190	4	3 / 186	98.4% (95-99.6)	-	-
ÖSSZESEN		581	5/584 (0.9%)	6 / 576	99.0%	-	-

*A TST határértéke 10 mm. TST specifitás becslést értéke 15 mm-es határérték esetén 99.1%.

Szenzitivitás aktív Tb-ben

A QuantiFERON®-TB Gold IT teszt szenzitivitását olyan ausztrál és japán Tb-gyanús egyéneknél határozták meg, akiknél egyidejűleg tenyésztéssel igazolták a *M. tuberculosis* fertőzés fennállását. Bár a látens tuberculosis fertőzés (LTBI) kimutatására nincs általánosan elfogadott vizsgálat, a *M. tuberculosis* tenyésztés eredménye alapján ezek a betegek egyértelműen fertőzöttek. A betegeknél a QuantiFERON®-TB Gold IT teszt végzése előtt legfeljebb 8 napig tartott a kezelés.

A 3. számú táblázat a két, tenyésztés alapján *M. tuberculosis* betegcsoport esetében kapott eredményeket összegzi. Aktív Tb fennállása esetén a QuantiFERON®-TB Gold IT vizsgálat összesített szenzitivitása 89% (48/54) volt.

3. táblázat: A QuantiFERON®-TB Gold IT vizsgálat szenzitivitása tenyésztés alapján *M. tuberculosis* fertőzöttnek bizonyult egyéneknél

VIZSGÁLAT		A betegség megerősítése	QFT-Gold pozitívák száma / érvényes tesztek száma	QFT-Gold szenzitivitása (95% CI)
japán Tb betegek validációs vizsgálat		tenyésztéssel	24 / 27	89% (72-96%)
ausztrál Tb betegek validációs vizsgálat	pulmonaris	tenyésztéssel	7 / 10	70% (40-89%)
	extra pulmonaris		17 / 17	100% (82-100%)
ÖSSZESEN			48 / 54	89% (78-95%)

LTBI diagnózis

Magas LTBI kockázatú populációk esetében számos, a QuantiFERON®-TB Gold IT minőségi jellemzőivel kapcsolatos vizsgálatot publikáltak. A 4. számú táblázat néhány vizsgálat főbb eredményeit foglalja össze.

4. táblázat: Néhány publikált vizsgálat a magas LTBI kockázatú populációkban végzett QuantiFERON®-TB Gold IT teszttel kapcsolatosan

VIZSGÁLAT	Vizsgált egyének összesen	Eredmények és leletek
indiai HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Nagyon magas Tb előfordulási arány, 40% QFT-Gold IT pozitív, míg a TST pozitív eredmények aránya 41% 10mm-es határértéknél. Nagymértékű egyezés a TST-vel, a BCG oltásnak egyik tesztben sincs hatása. Mindkét teszt alapján kockázati tényező az életkor és az egészségügyben eltöltött idő.
dán HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	Az LTBI összes előfordulása QFT-Gold IT alapján 4,6% (27/590) HIV ⁺ betegekben. A pozitív eredmények összefüggnek a Tb kockázati tényezőivel. Két QFT-Gold IT pozitív betegnél 1 éven belül kialakult az aktív Tb. Nem egyértelmű reakciók (n=20; 3,4%) szignifikánsan kis CD4 szám (<100 / µl) mellett léptek fel.
kórházban kezelt gyermekek (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Tb gyanús vagy anamnézis alapján Tb-s személlyel érintkező gyermeknél QFT-Gold IT és TST tesztet végeztek. A QFT-Gold IT teszt pozitív volt 10,5% -ban, a TST pozitív 9,5%-ban (10mm-nél). A tesztek közötti egyezés összesen 95,2% volt, ezen belül 100% azoknál, akik nem kaptak BCG oltást.
német kontakt személyek (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	15 különböző esetben közeli kontakt személyeket vizsgáltak. 51% kapott korábban BCG oltást, 27% külföldi születésű volt. 70% a BCG oltottak közül és 18% a nem beoltottak közül TST pozitív lett (5mm), míg 9% ill. 11% lett QFT-Gold IT pozitív. A QFT-Gold IT eredménye összefügg a Tb kockázatával. A TST eredménye csak a BCG oltással függ össze.

Sok egyéb publikáció a QuantiFERON®-TB Gold IT teszt mellett QuantiFERON®-TB Gold teszt minőségi jellemzőit írja le. Ez a QuantiFERON®-TB Gold IT előtti, kevésbé érzékeny, szolubilis antigén változat. Ezek a tanulmányok a tesztek alkalmazását a következő csoportokban is vizsgálják: aktív Tb-s betegekkel érintkező személyek^{9,11, 19, 25}, gyermekek^{6-10, 25, 28}, HIV pozitív betegek^{2, 5, 20}, egészségügyben dolgozók^{13, 26, 32}, immunszuppresszált személyek^{3, 4, 22, 23, 27, 30, 31}, Tb gyanús személyek^{7, 8, 10, 18} és alacsony kockázatú egyének¹⁵.

A TST teszt reprodukálhatósága és hatása a későbbi QuantiFERON®-TB Gold teszt eredményre

Az Egyesült Államokban végzett specifitás-vizsgálat részeként az önkéntesek egy alcsoportját 4-5 héttel az eredeti QuantiFERON®-TB Gold IT teszt és a TST teszt után újra vizsgálták. 260 sorakatonára esetében a QuantiFERON®-TB Gold IT teszteredménye mindkét időpontban rendelkezésre állt, az eredmények 99,6%-ban megegyeztek (259/260). Az előzőleg elvégzett TST nem váltott ki pozitív QuantiFERON®-TB Gold IT választ.

10. TECHNIKAI INFORMÁCIÓ

Nem egyértelmű eredmények

Nem egyértelmű eredményeket csak ritkán szabadna kapni, és a következő technikai tényezők okozhatják:

- A max. 16 órás határidő átlépése a vérvétel és a 37 °C-os inkubálás között
- A vérminták javasolt hőmérséklet-tartományon (22°C ± 5°C) kívüli tárolása
- A vérvételi csövek tartalmának nem megfelelő megkeverése
- Az ELISA lemez nem megfelelő mosása

Ha a vérvétellel, vagy a vérminták kezelésével kapcsolatosan technikai probléma gyanúja merül fel, a teljes QuantiFERON®-TB Gold IT tesztet új vérmintán meg kell ismételni. A stimulált plazmaminták ELISA tesztjét meg lehet ismételni, ha felmerül a gyanú, hogy a mosás nem volt megfelelő, vagy az ELISA eljárástól egyéb módon eltértek. Az alacsony Mitogen vagy magas Nil értékekből eredő nem egyértelmű eredmények a teszt megismétlésével nem változhatnak, hacsak valamiféle hiba nem történt az ELISA vizsgálat során. A nem egyértelmű eredményeket, mint olyanokat kell továbbítani. Az orvos majd eldöntheti, hogy új vérmintát vesznek, vagy pedig szükség szerint egyéb eljárásokat alkalmaznak.

Alvadékos plazmaminták

Ha a plazmaminták hosszabb tárolása során fibrinrögök keletkeznének, centrifugálja le a mintákat üledékképződésig, ez megkönnyíti a plazma pipettázását.

ELISA hibaelhárítás

Aspecifikus színreakció

LEHETSÉGES OK	MEGOLDÁS
A lemezek nem megfelelő mosása	Mossa a lemezt legalább 6-szor 400 µl mosó pufferrel mintahelyenként. A használt mosókészüléktől függően lehet, hogy több mint 6 mosási ciklusra van szükség. Javasoljuk, hogy a ciklusok között tartsa be az 5 másodperces áztatási időt.
Az ELISA mintahelyek keresztszennyeződése	A gondos pipettázás és a minták alapos megkeverése minimizálja a kockázatot.
A készlet ill. komponenseinek szavatossága lejárt	Ellenőrizze, hogy a reagenskészlet szavatossági ideje még nem járt le. Gondoskodjon róla, hogy a Standard és a 100x tömény konjugátum a rekonstituálást követő 3 hónapon belül fel legyen használva.
Az enzim szubsztrát oldat szennyezett	Távolítsa el a szubsztrátumot, ha kékes elszíneződés mutatkozik. Gondoskodjon róla, hogy csak tiszta reagenstároló edényeket használjanak.

Alacsony OD értékek a standardoknál

LEHETSÉGES OK	MEGOLDÁS
Hiba a Standard hígításában	A Kit Standard hígítását szigorúan a használati útmutató utasításai szerint kell végezni.
Pipettázási hiba	Gondoskodjon róla, hogy a pipettákat a gyártó útmutatása szerint kalibrálják és használják.
Az inkubálási hőmérséklet túl alacsony	Az ELISA inkubálást szobahőmérsékleten (17°C -27°C) kell végezni.
Az inkubálási idő túl rövid	A konjugátumot, standardokat és mintákat tartalmazó lemezeket 120 ± 5 percig kell inkubálni. Az enzim szubsztrát oldatot a lemezen 30 percig kell inkubálni.
Téves lemez-szűrő	A lemezt 450 nm-en kell leolvasni, 620-650 nm közötti referenciaszűrővel.
A reagensek túl hidegek	Minden reagenst (a 100x tömény konjugátum kivételével) szobahőmérsékletre kell hagyni felmelegedni a vizsgálat megkezdése előtt. Ez kb. 60 percet vesz igénybe.
A készlet ill. komponenseinek szavatossága lejárt	Ellenőrizze, hogy a reagenskészlet szavatossági ideje még nem járt le. Gondoskodjon róla, hogy a Standard és a 100x tömény konjugátum a rekonstituálást követő 3 hónapon belül fel legyen használva.

Magas háttérszíneződés

LEHETSÉGES OK	MEGOLDÁS
A lemezek nem megfelelő mosása	Mossa a lemezt legalább 6-szor 400 µl mosó pufferrel mintahelyenként. A használt mosókészüléktől függően lehet, hogy több mint 6 mosási ciklusra van szükség. Javasoljuk, hogy a ciklusok között tartsa be az 5 másodperces áztatási időt.
Az inkubálási hőmérséklet túl magas	Az ELISA inkubálást szobahőmérsékleten (17°C -27°C) kell végezni
A készlet ill. komponenseinek szavatossága lejárt	Ellenőrizze, hogy a reagensek szavatossági ideje még nem járt le. Gondoskodjon róla, hogy a Standard és a 100x tömény konjugátum a rekonstituálást követő 3 hónapon belül fel legyen használva..
Az enzim szubsztrát oldat szennyezett	Távolítsa el a szubsztrátumot, ha kékes elszíneződés mutatkozik. Gondoskodjon róla, hogy csak tiszta reagenstároló edényeket használjanak.

Nem lineáris standard görbe és eltérések e replikátumok között

LEHETSÉGES OK	MEGOLDÁS
A lemezek nem megfelelő mosása	Mossa a lemezt legalább 6-szor 400 µl mosó pufferrel mintahelyenként. A használt mosókészüléktől függően lehet, hogy több mint 6 mosási ciklusra van szükség. Javasoljuk, hogy a ciklusok között tartsa be az 5 másodperces áztatási időt.
Hiba a Standard hígításában	A Kit Standard hígítását szigorúan a használati útmutató utasításai szerint kell végezni.
Elégtelen keverés	A reagenseket a lemezre adagolás előtt alaposan keverje meg forgatással vagy enyhe vortexeléssel.
Nem folyamatos pipettázás vagy a vizsgálati folyamat megszakítása	A minták és standardok adagolása folyamatosan történjen. Minden reagenst a vizsgálat megkezdése előtt elő kell készíteni.

A vizsgálati eljárást és a legtöbb technikai probléma megoldását bemutató videó megtalálható a CD-ROM-on, amely a terméktájékoztatót és a műszaki útmutatót is tartalmazza. A CD-ROM beszerezhető közvetlenül a Cellestis-től vagy az Ön forgalmazójától.

11. IRODALOMJEGYZÉK

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. VIZSGÁLATI ELJÁRÁS (RÖVIDEN)

1. LÉPÉS: A VÉRMINA INKUBÁLÁSA

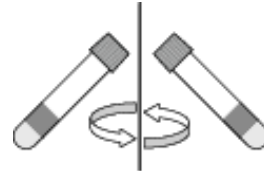
1. A beteg véré^t vegye le a vérvételi csövekbe és **5 másodpercig tartó (vagy 10-szer történő) erőteljes rázással** alaposan keverje el. A vérnek **a cső teljes belső felületével** érintkeznie kell.



2. A csöveket **állítva** 16-24 órán keresztül inkubálja 37°C-on.



3. Az inkubálást követően centrifugálja a csöveket 5-15 percig 1500 - 2200g (RCF) fordulatszámon, hogy elkülönítse a plazmát a vörös vértestektől.

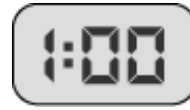


4. A centrifugálást követően vegye ki a plazmamintát mindegyik csőből az IFN- γ szint meghatározása érdekében.



2. LÉPÉS: IFN- γ ELISA

1. Az ELISA komponenseket - a 100-szorosan tömény kivételével - legalább 60 percig hagyja szobahőmérsékleten stabilizálódni.

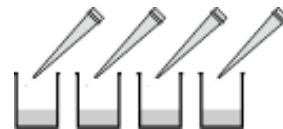


2. A Kit Standardot desztillált vagy ionmentes vízzel 8,0 NE/ ml-re oldja be és készítsen 4 Standard hígítási sort.

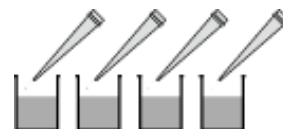


3. Oldja be a liofilizált, 100x tömény konjugátumot desztillált vagy ionmentes vízzel.

4. Készítse el a zöld hígító oldattal a konjugátumot és mérjen be 50 μ l-t minden mélyedésbe.



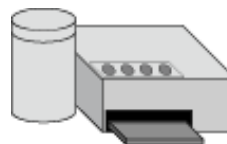
5. Mérjen be 50 μ l plazmamintát és 50 μ l standardot a megfelelő mélyedésekbe. Rázóval keverje meg.



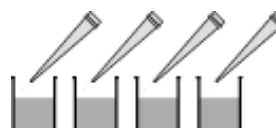
6. Inkubálja 120 percig szobahőmérsékleten.



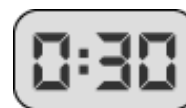
7. Mossa ki a bemélyedéseket legalább 6 x 400 μ l mosó pufferrel mintahelyenként.



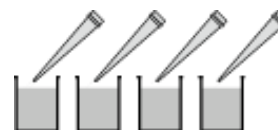
8. Adjon 100 μ l enzim szubsztrát oldatot minden bemélyedésbe. Rázóval keverje meg.



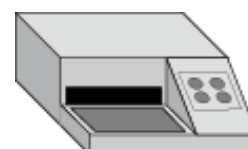
9. Inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.



10. Adjon 50 μ l stop reagenst minden bemélyedésbe. Rázóval keverje meg.



11. Olvassa le az eredményeket 450 nm-en a 620-650 nm-ig terjedő referenciaszűrő alkalmazásával.



12. Értékelje ki az eredményeket.





Készült a:

Cellestis Limited (Ausztrália) és Cellestis GmbH (Európa)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Ausztrália
számára.

Tel. (Ausztrália) +61 3 9571 3500, (Európa) +49 6151 428 59-0

E-mail: quantiferon@cellestis.com

Weboldal: www.cellestis.com

Dok.-sz. 05990301C

2009. August

EC	REP
----	-----

Felhatalmazott képviselő:

MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover

Germany

