

QuantiFERON[®]-TB Gold

(„In-Tube“ metodas = vamzdelyje)

**IFN-Gamma testas gryno kraujo mėginiams
reakcijos į peptidų antigenus matavimui
ESAT-6, CFP-10 ir TB7.7(p.4)**

PAKUOTĖS INFORMACINIS LAPELIS

In Vitro diagnostikos panaudojimui



TURINYS

1. PASKIRTIS	2
2. TESTO TRUMPAS APRAŠYMAS IR PAAIŠKINIMAS	2
Testo principas	3
Testo trukmė	3
3. REAGENTAI IR LAIKYMAS	4
Reikalingos bet nepateiktos medžiagos	4
Sandėliavimas	4
Kraujo paėmimo vamzdeliai	5
Komplekto reagentai	5
Atkurti ir nepanaudoti reagentai	5
4. ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI	6
Atsargumo priemonės	6
Įspėjimai	6
5. MĖGINIO PAĖMIMAS IR NAUDOJIMAS	7
6. VARTOJIMO INSTRUKCIJA	8
1-as žingsnis: kraujo mėginio inkubacija ir plazmos paėmimas	8
2-as žingsnis: Human-IFN- γ -ELISA	9
7. APSKAIČIAVIMAS IR REZULTATŲ INTERPRETACIJA	12
Standarto kreivės sudarymas	12
Testo kokybės patikrinimas	13
Rezultatų interpretacija	14
8. METODO RIBOS	18
9. CHARAKTERISTIKA	18
10. TECHNINĖ INFORMACIJA	20
Neaiškūs rezultatai	20
Sukrešęję plazmos mėginiai	20
ELISA problemų sprendimas	21
Nespecifinės spalvos reakcija	21
Žema standartų OT (optinio tankio) vertė	21
Stiprus fono nusidažymas	22
Netiesinė standarto kreivė ir nukrypimai tarp abiejų dvigubų mėginių	22
11. LITARATŪRA	23
12. TECHNINIS KLIENTŲ APTARNAVIMAS	24
13. TRUMPAS TESTO ATLIKIMO APRAŠYMAS	25

1. PASKIRTIS

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) yra testas *In vitro* diagnostikai, kurį sudaro peptidų kokteilis, simuliuojantis proteinus ESAT-6, CFP-10 ir TB7.7(p4) ir stimuliuoja ląsteles gryname heparinuotame kraujyje. Interferon- γ (IFN- γ) nustatymas ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) metodu tarnauja *In vitro* reakcijų į šiuos peptido antigenus identifikavimui, kurios pasireiškia esant *Mycobacterium tuberculosis* infekcijai.

QuantiFERON®-TB Gold IT yra netiesioginis testas, skirtas *M. tuberculosis* infekcijos (imtinai Aktyvios ligos) nustatymui. Testo rezultatai turėtų būti vertinami, atsižvelgiant į rizikos įvertinimą, rentgeno tyrimus ir kitus medicininius ir diagnostinius tyrimus.

2. TESTO TRUMPAS APRAŠYMAS IR PAAIŠKINIMAS

Tuberkuliozė (TB) yra užkrečiama liga, kurią sukelia infekcija su *M. tuberculosis* komplekso (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) organizmais. Nuo asmenų, kurie serga kvėpavimo takų TB, kaip taisyklė užsikrečiama lašelinės infekcijos keliu. Naujai infekuotiems asmenims savaitių ar mėnesių laikotarpyje gali pasireikšti TB liga, bet pas didžiąją infekuotų asmenų dalį nepasireiškia jokių simptomų. Pas didžiąją dalį išlieka latentinė tuberkuliozės infekcija (LTBI), t.y. neužkrečiama besimptomė liga, kurios aktyvi forma gali pasireikšti tik po mėnesių ar metų. Pagrindinis LTBI nustatymo tikslas yra rūpintis gydymu, kad būtų užkirstas kelias susirgimui TB liga. Dar visai neseniai Tuberkulino odos testas (tuberculin skin test, TST) buvo vienintelis turimas metodas LTBI diagnozavimui. Odos jautrumas tuberkulinui atsiranda praėjus 2 - 10 savaitių po užsikrėtimo. Tačiau kai kuriems infekuotiesiems reakcija į tuberkuliną nepasireiškia, tarp jų, pavyzdžiui, pacientai su dėl kitų ligų sutrikusia imuninės sistemos veikla, bet ir pacientai be tokių sutrikimų. Atvirkščiai, kai kurie asmenys, kurie iš tikrųjų nėra infekuoti *M. tuberculosis*, po skiepavimo su Bacillus Calmette-Guérin (BCG), ir būdami užsikrėtę kitomis nei su *M. tuberculosis* kompleksu mikobakterijomis ar dėl kitų nežinomų faktorių yra jautrūs tuberkulinui ir jiems atlikus Tuberkulino odos testą yra gaunamas teigiamas testo rezultatas.

LTBI reikia skirti nuo tuberkuliozės ligos, kurią yra būtina registruoti ir kuri įprastai apima plaučius ir apatinius kvėpavimo takus, tačiau gali būti paveiktos ir kitos organų sistemos. Tuberkuliozės liga yra diagnozuojama remiantis istorinių, fizinių, radiologinių, histologinių ir Miko bakteriologinių tyrimų rezultatais.

QuantiFERON®-TB Gold IT testas matuoja ląstelių perduotą imunologinį atsakymą (CMI) į peptido antigenus, kurie simuliuoja miko bakterinius proteinus. Šių proteinų (ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4)) trūksta visose BCG atmainose ir didžiojoje miko bakterijų dalyje, išskyrus *M. kansasii*, *M. szulgai* ir *M. marinum*.¹ Asmenų, kurie yra infekuoti *M. tuberculosis* komplekso organizmais, kraujyje yra limfocitų, kurie šiuos ir kitus miko bakterinius antigenus atpažįsta. Šio atpažinimo proceso metu yra gaminamas ir išskiriamas citokinas, IFN- γ . Nustatymas ir po to sekantis IFN- γ kiekybinis įvertinimas sudaro šio testo pagrindą.

QuantiFERON®-TB Gold IT teste panaudoti antigenai yra peptidų kokteilis, kuris simuliuoja proteinus ESAT-6, CFP-10 ir TB7.7(p4). Daugelis atliktų studijų parodė, kad šie peptido antigenai stimuliuoja IFN- γ reakciją *M. tuberculosis* infekuotų asmenų T-ląstelėse, kitaip nei T-ląstelėse neinfekuotų arba BCG vakcinuotų asmenų, nesergančių TB liga arba neturinčių LTBI rizikos.¹⁻³² Tačiau dėl medicininio gydymo arba susirgimų, kurie kenkia imuninei funkcijai, IFN- γ reakcija gali potencialiai sumažėti. Pacientai su tam tikromis kitomis miko bakterinėmis infekcijomis gali taip pat reaguoti į ESAT-6, CFP-10 ir TB7.7(p4), nes genų, užkoduotų šių proteinų, yra ir *M. kansasii*, *M. szulgai* ir *M. marinum*.^{1,23} Todėl QuantiFERON®-TB Gold IT testas yra testas ir LTBI nustatymui, ir *M. tuberculosis* komplekso infekcijos sergantiems pacientams diagnozavimui. Teigiamas testo rezultatas paremia tuberkuliozės ligos diagnozę, tačiau ir kitos miko bakterijos (pvz. *M. kansasii*) gali lemti teigiamą rezultatą. Kad būtų patvirtinta TB ligos diagnozė ar, atitinkamai, kad ji būtų paneigta, yra būtini kiti medicininiai ir diagnostiniai tyrimai.

Testo principas

QuantiFERON®-TB Gold IT sistemoje naudojami specialūs kraujo paėmimo vamzdeliai, kuriais yra paimami gryno kraujo mėginiai. Po to sekanti kraujo mėginių vamzdeliuose inkubacija trunka nuo 16 iki 24 valandų. Po to paimama plazma ir patikrinama, ar joje yra IFN- γ , kuris pagal aplinkybes susidarė reakcijos į peptido antigenus metu.

QuantiFERON®-TB Gold IT testas susideda iš dviejų etapų. Pirmame etape grynas kraujo mėginys supilamas į įvairius QuantiFERON®-TB Gold kraujo paėmimo vamzdelius, tarp kurių yra nulinis kontrolinis vamzdelis, TB antigeno vamzdelis ir neprivalomas mitogeno vamzdelis.

Mitogeno vamzdelis QuantiFERON®-TB Gold IT teste gali būti panaudotas kaip teigiama kontrolė. Tai gali būti ypač pateisinama kai asmens imuninės sistemos situacija nėra aiški. Mitogeno vamzdelis taip pat gali būti panaudotas kaip kontrolinis bandymas teisingai elgsenai su kraujo mėginiu ir teisingai inkubacijai.

Vamzdelis turi būti kuo greičiau ir būtinai per 16 valandų po kraujo paėmimo inkubuotas 37°C temperatūroje. Po 16 - 24 valandų trukusio inkubacijos periodo vamzdeliai centrifuguojami. Tada atskiriama plazma ir ELISA metodo pagalba nustatomas IFN- γ (IE/ml) kiekis.

Testas yra laikomas teigiamas IFN- γ reakcijai į TB antigeno vamzdelį, jeigu ši vertė yra reikšmingai virš nulinės kontrolės (IFN- γ IE/ml) vertės. Panaudojant mitogeno vamzdelį mitogeną stimuliuojantis plazmos mėginys tarnauja kaip IFN- γ pozityvi kontrolė kiekvienam patikrintam mėginiui. Silpna reakcija į mitogeną (< 0,5 IE/ml) vertinama kaip neaiškus rezultatas, kai kraujo mėginys parodo neigiamą reakciją ir į TB antigenus. Toks modelis gali pasitaikyti esant nepakankamam limfocitų skaičiui, esant sumažėjusiam limfocitų aktyvumui dėl netinkamo elgesio su mėginiais, netinkamo mitogeno vamzdelio užpildymo arba maišymo arba tada, kai paciento limfocitai negali gaminti IFN- γ . Nulinis mėginys koreguoja nespecifines fono reakcijas, heterofilinius antikūnių efektus⁷ bei nespecifinį IFN- γ kraujo mėginyje. Nulinio vamzdelio IFN- γ vertė atimama iš TB antigeno vamzdelio ir mitogeno vamzdelio (jeigu panaudotas) IFN- γ vertės.

Testo trukmė

Žemiau rasite informaciją apie apytiksliai nustatytą QuantiFERON®-TB Gold IT testo trukmę, o taip pat apie reikiamą laiką testuojant mėginių paketą:

Kraujo vamzdelio inkubacija prie 37 °C:	16 - 24 valandos
ELISA:	apie 3 valandos vienai ELISA plokštelei
	<ul style="list-style-type: none">• < 1 val. darbo laikas• plus 10 – 15 min. kiekvienai papildomai plokštelei

3. REAGENTAI IR LAIKYMAS

Tuberkuliozės ir kontrolinio antigeno kraujo paėmimo vamzdeliai

Užsakymo Nr. 0590 0301

- | | |
|--|---------------|
| 1. Nulinis kontrolinis vamzdelis (pilkas dangtelis) | 100 vamzdelių |
| 2. TB antigeno vamzdelis (raudonas dangtelis) | 100 vamzdelių |
| 3. Mitogeno kontrolinis vamzdelis (violetinis dangtelis) | 100 vamzdelių |

NURODYMAS: Galima įsigyti ir sekančius vamzdelius:

*100 Nulinių kontrolinių vamzdelių + 100 TB antigeno vamzdelių (Užsakymo Nr. 0590 0201)
100 Mitogeno kontrolinių vamzdelių (Užsakymo Nr. 0593 0201)*

Užsakymo Nr. 05900210: (didelis aukštis) 100 nulinių kontrolinių vamzdelių, 100 TB antigeno vamzdelių

Užsakymo Nr. 05900505: (didelis aukštis) 100 nulinių kontrolinių vamzdelių, 100 TB antigeno ir 100 Mitogeno kontrolinių vamzdelių

Užsakymo Nr. T0593 0502: (didelis aukštis) 100 mitogeno kontrolinių vamzdelių

ELISA sudėtinės dalys

Užsakymo Nr. 0594 0201

- | | |
|--|-------------------|
| 1. Mikrojuostelės | 24 x 8 šulinėliai |
| 2. Žmogaus IFN- γ standartas, liofilizuotas | 1 buteliukas |
| 3. Žalias skiediklis | 1 x 30 ml |
| 4. Konjugatas (100x koncentratas), liofilizuotas | 1 x 0,3 ml |
| 5. Plovimo buferis (20x koncentratas) | 1 x 100 ml |
| 6. Enzimo substrato tirpalas | 1 x 30 ml |
| 7. Enzimo stabdymo tirpalas | 1 x 15 ml |

Reikalingos bet nepateiktos medžiagos

- 37°C inkubatorius; CO₂ nereikalingas.
- Kalibruotos reguliuojamo tūrio pipetės (nuo 10 µl iki 1000 µl) su vienkartiniais švirkštais
- Kalibruota daugiakanalė pipetė tūrio nustatymui (nuo 50 µl iki 100 µl) su vienkartiniais švirkštais
- Mikroplokštelių kratytuvas.
- Dejonizuotas arba destiliuotas vanduo (2 litrai)
- Mikroplokštelių plovimo aparatas (rekomenduojamas automatizuotas)
- Skaitymo įrenginys mikroplokštelėms su 450 nm filtru ir 620 - 650 nm referencijos filtru

Sandėliavimas

Kraujo paėmimo vamzdeliai

- Kraujo paėmimo vamzdelius sandėliuokite 4 - 25°C temperatūroje.
- QuantiFERON®-TB Gold kraujo paėmimo vamzdelių galiojimo laikas yra 15 mėnesių nuo pagaminimo datos (sandėliuojant 4 – 25°C temperatūroje).

Komplekto reagentai

- Komplektą sandėliuokite 2 - 8 °C temperatūroje.
- Enzimo substrato tirpalą visada saugokite nuo tiesioginių saulės spindulių.
- QuantiFERON®-TB Gold IT ELISA komplekto galiojimo laikas yra 3 metai nuo pagaminimo datos (sandėliuojant 2 - 8°C temperatūroje).

Atkurti ir nepanaudoti reagentai

Nurodymus apie komplekto reagentų atkūrimą rasite 6 skyriaus grafoje “Reagentų paruošimas”.

- Atkurtas komplekto standartas, sandėliuojant 2 - 8°C temperatūroje, gali būti laikomas iki trijų mėnesių.
 - *Užrašykite komplekto standarto atkūrimo datą.*
- Nepanaudotas konjugatas (100x) po atkūrimo turi būti vėl sandėliuojamas 2-8°C temperatūroje ir taip pat sunaudotas per tris mėnesius.
 - *Užrašykite konjugato atkūrimo datą.*
- Panaudojimui paruoštas konjugatas turi būti sunaudotas per 6 valandas nuo paruošimo.
- Panaudojimui paruoštą plovimo buferį kambario temperatūroje galima laikyti ilgiausiai dvi savaites.

4. ATSARGUMO PRIEMONĖS IR ĮSPĖJIMAI

Atsargumo priemonės

- Neigiamas QuantiFERON®-TB Gold IT testo rezultatas nepanaikina *M. tuberculosis* infekcijos ar tuberkuliozės ligos egzistavimo tikimybės; klaidingus neigiamus rezultatus gali nulemti infekcijos fazė (pvz., kai kraujo mėginys yra paimtas prieš ląstelinės imuninės reakcijos pasireiškimą), imuninės funkcijos sutrikimai dėl kitų ligų, netinkamas vamzdelių panaudojimas po kraujo paėmimo, neteisingas testo atlikimas arba kiti imunologiniai pakitimai.
- Teigiamas QuantiFERON®-TB Gold IT testo rezultatas neturėtų būti vienintelis pagrindas priimant sprendimą apie *M. tuberculosis* infekcijos egzistavimą; neteisingai atliekant testą gali būti gauti klaidingi teigiami rezultatai.
- Teigiamas QuantiFERON®-TB Gold IT testo rezultatas turi būti patvirtintas atliekant tolesnius medicininius ir diagnostinius tyrimus; tik taip galima nustatyti, ar asmuo serga aktyvia tuberkuliozės forma (pvz., AFB tepinėlis ir kulyūra, bei krūtinės ląstos rentgenograma).
- Nors ESAT-6, CFP-10 ir TB7.7(p4) nėra BCG atmainose ir didžiojoje žinomų netuberkuliozinių miko bakterijų dalyje, tačiau QuantiFERON®-TB Gold IT testo teigiamo rezultato pagrindas gali būti infekcija su *M. kansasii*, *M. szulgai* arba *M. marinum*. Jeigu tokia infekcija įtariama, turi būti atlikti alternatyviniai testai.

Ispėjimai

- **Naudoti tik *in vitro* diagnostikai.**
- **Atsargiai: Enzimo substrato tirpale** yra 3,3',5,5' tetrametilo benzidino, kuris yra pavojingas prarijus, įkvėpus ir per sąlytį su oda. Dirgina odą ir akis. Mutagenas. Naudokite apsauginius akinius, laboratorines pirštines ir elkitės su šiuo tirpalu kaip su potencialia kancerogenine medžiaga.
- **Atsargiai: Enzimo stabdymo tirpale** yra H₂SO₄, kuris yra pavojingas prarijus, įkvėpus ir per sąlytį su akimis ir oda. Naudokite apsauginius akinius, laboratorines pirštines ir darbui laboratorijoje skirtus apsauginius drabužius. Po netyčinio stabdymo tirpalo sąlyčio su oda ar akimis praskalaukite dideliu kiekiu vandens ir kreiptis į gydytoją.
- **Atsargiai: IFN-γ standartas ir konjugato 100x koncentratas** prarijus ar po sąlyčio su oda gali sukelti dirginimą. Naudokite laboratorines pirštines ir darbui laboratorijoje skirtus apsauginius drabužius.
- **Žmogaus kraujo mėginius visada laikykite potencialiai infekuojančiais!** Laikykitės esminių elgsenos su krauju nurodymų.
- Kai kurių reagentų sudėtyje yra **timerosalio**, naudojamo kaip konservavimo priemonė. Timerosalį prarijus, įkvėpus ir per sąlytį su oda gali pasireikšti jo toksinis poveikis.
- **Žaliame skiediklyje** yra normalaus pelės serumo ir kazeino; šios medžiagos gali sukelti alergines reakcijas; vengti kontakto su oda.
- Nukrypimai nuo pakuotės informaciniame lapelyje aprašytos instrukcijos gali įtakoti klaidingus rezultatus. Prieš naudojant prašome atidžiai perskaityti testo instrukciją.
- Komplekto nenaudokite, jeigu vienas ar daugiau reagentų buteliukų prieš naudojimą yra apgadinti arba nesandarūs.
- Nenaudokite šio komplekto sudėtinių dalių kartu su kitų QuantiFERON®-TB Gold IT komplektų siuntų ELISA reagentais.
- Nepanaudotus reagentus ir biologinius mėginius išmeskite laikydamiesi vietinės valdžios ir šalies teisės aktų.
- Pasibaigus naudojimo laikui kraujo paėmimo vamzdelių ir ELISA komplekto sudėtinių dalių naudoti nebegalima.

5. MĖGINIO PAĖMIMAS IR NAUDOJIMAS

Kraujo paėmimas

QuantiFERON®-TB Gold IT testui naudojami šie kraujo paėmimo vamzdeliai:

1. Nulinė kontrolė (pilkas dangtelis su baltu žiedu) (aukščiui iki 810 metrų virš jūros lygio)
2. TB specifiniai antigenai (raudonas dangtelis su baltu žiedu) (aukščiui iki 810 metrų virš jūros lygio)
3. Mitogeno kontrolė - neprivaloma (violetinis dangtelis su baltu žiedu) (aukščiui iki 810 metrų virš jūros lygio)
4. Nulinė kontrolė (pilkas dangtelis su geltonu žiedu) (aukščiui nuo 1020 iki 1875 metrų)
5. TB antigenai (raudonas dangtelis su geltonu žiedu) (aukščiui nuo 1020 iki 1875 metrų)
6. Mitogeno kontrolė - neprivaloma (violetinis dangtelis su geltonu žiedu) (aukščiui nuo 1020 iki 1875 metrų)

Antigenai yra išdžiovinti ant vidinių kraujo paėmimo vamzdelių sienelių, todėl kraujo mėginiai turi būti kruopščiai sumaišyti su vamzdelio turinys. Tada vamzdeliai yra kiek galima greičiau, ne vėliau kaip per 16 valandų nuo kraujo paėmimo, perkelti į inkubatorių (37 °C).

Optimalūs rezultatai yra pasiekiami laikantis šios instrukcijos:

1. Paimkite iš kiekvieno paciento po 1 ml veninio kraujo tiesiai į kiekvieną QuantiFERON®-TB Gold IT kraujo paėmimo vamzdelį.

- Matavimui aukštyje iki 810 metrų virš jūros lygio turėtų būti panaudojami QuantiFERON® standarto kraujo paėmimo vamzdeliai. Aukštyje virš 810 m turėtų būti panaudojami specialūs QuantiFERON® kraujo paėmimo vamzdeliai, skirti dideliems aukščiams.

QuantiFERON® kraujo paėmimo vamzdelius panaudojant kitame nei paminėtame aukštyje arba esant mažiems mėginių kiekiams, kraujas gali būti paimamas ir švirkštu; tada į kiekvieną iš trijų vamzdelių įpilama po 1 ml kraujo. Saugumo sumetimais tam nuimama švirkšto adata; tai darant prašome laikytis įprastų atsargumo priemonių. Nuimkite šių trijų QFT-Gold IT vamzdelių dangtelius ir į kiekvieną vamzdelį įpilkite po 1 ml kraujo (iki juodos žymos ant etiketės šoninio krašto). Tada vėl uždengti dangteliu ir maišyti kaip nurodyta žemiau.

- Kadangi 1 ml vamzdeliai kraują įtraukia palyginti lėtai, kai atrodo, kad yra pasiektas reikiamas užpildymo lygis, prašome vamzdelį palikti ant adatos dar 2-3 sekundes. Tai užtikrins reikiamo kraujo kiekio paėmimą.

Juoda žymė ant vamzdelio šono reiškia 1 ml užpildymo tūrį. QuantiFERON®-TB Gold kraujo paėmimo vamzdeliai yra validuoti tūriui nuo 0,8 ml iki 1,2 ml. Jeigu imant kraują ši indikatorinė linija nepasiekama, siūloma paimti naują kraujo mėginį.

- Kraujo ėmimui panaudojant “drugelio” tipo adatą reikia prieš uždedant QuantiFERON®-TB Gold vamzdelį tuščio vamzdelio pagalba įsitikinti, kad jungiamoji tūbelė yra užpildyta krauju.

2. Sumaišykite vamzdelių turinį, juos **5 sekundes stipriai kratant** (arba 10 kartų sukrečiant). Patikrinkite, ar **visas vidinis vamzdelio paviršius** yra padengtas krauju.

- Būtina kruopščiai išmaišyti, kad vamzdelio turinys pilnai susimaišytų su krauju.
- Kratant gali atsirasti putų. Tai neturi įtakos testui ir nėra pagrindas nerimui.

3. Ant vamzdelių užrašykite pavadinimus.

4. Vamzdeliai turi būti kiek galima greičiau, tačiau vėliausiai po 16 valandų nuo kraujo paėmimo, patalpinti į inkubatorių (37°C). Prieš inkubaciją vamzdelius laikyti kambario temperatūroje (22° C ± 5° C). Kraujo mėginių nelaikyti šaldytuve ar šaldymo kameroje!

6. VARTOJIMO INSTRUKCIJA

1-as žingsnis: kraujo mėginio inkubacija ir plazmos paėmimas

Pateiktos medžiagos

QuantiFERON®-TB Gold IT kraujo paėmimo vamzdeliai (žiūrėkite 3 skyrių).

Reikalingos bet nepateiktos medžiagos

Žiūrėkite 3 skyrių

Procedūra

1. Jeigu kraujo mėginiai po paėmimo nėra iš karto inkubuojami, **vamzdelių turinys prieš pat inkubaciją turi būti pakartotinai sumaišytas ar atitinkamai suplaktas**, kaip nurodyta 5-tame skyriuje.
2. Vamzdelius inkubuokite **VERTIKALIOJE** pozicijoje 37 °C temperatūroje 16 - 24 valandas. CO₂ arba drėkinimas inkubuojant nėra reikalingas.
3. Prieš centrifugavimą kraujo paėmimo vamzdelius temperatūroje nuo 2°C iki 27°C galima laikyti ilgiausiai 3 dienas.
4. Po vamzdelių inkubacijos 37 °C temperatūroje, kad būtų lengviau paimti plazmą, jie yra 5-15 minučių centrifuguojami esant 1500 – 2200 RCF (g). Susidarant kamščiui ląstelės atsiskiria nuo plazmos. Jeigu tai neįvyksta, vamzdeliai turi būti centrifuguojami dar kartą ir didesniu greičiu.
 - Plazmą galima paimti ir be centrifugavimo, tačiau tai reikia daryti labai atsargiai, kad paimant plazmą nebūtų sujudintos ląstelės.
5. Plazmos mėginiai iš kraujo paėmimo vamzdelio gali būti perkelti tiesiai į QuantiFERON®-TB Gold ELISA plokštelę, ypač kai panaudojamas ELISA automatas.
6. Antraip plazmos mėginiai prieš ELISA gali būti arba laikomi tuose pačiuose centrifuguotuose vamzdeliuose, arba jie perkeliama į plazmos laikymo indelius (pvz., >150 µl plazmos į 96-ų šulinėlių formato mikroplokštelės šulinėlius arba į stovelio mikrovamzdelius). Siekiant išvengti saugomų mėginių išliejimo ir išgaravimo, plokštelės reikia uždengti.
 - Plazmos mėginiai 2 – 8 °C temperatūroje gali būti laikomi iki 4-ių savaičių; –20 °C temperatūroje (geriau žemesnėje nei –70°C) galima laikyti dar ilgesnį laiką.

2-as žingsnis: Human-IFN- γ -ELISA

Pateiktos medžiagos

QuantiFERON®-TB Gold ELISA komplektas (žiūr. 3 skyrių).

Reikalingos bet nepateiktos medžiagos

Žiūrėkite 3 skyrių

Procedūra

1. Visi plazmos mėginiai ir reagentai, išskyrus konjugato 100x koncentratą, prieš naudojimą turi pasiekti kambario temperatūrą ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$). Temperatūrų išsilyginimui paskirkite mažiausiai 60 minučių.
2. Nereikalingas juosteles išimkite iš rėmelio, įdėkite jas atgal į folijos įpakavimą ir iki panaudojimo laikykite šaldytuve.
Mažiausiai vieną juostelę paskirkite QuantiFERON®-TB Gold standartams ir paaimkite dar pakankamą juostelių skaičių testuojamiems pacientams (žiūrėkite paveikslėlius 2A ir 2B 2-jų arba 3-jų vamzdelių panaudojimui). Po panaudojimo rėmelį ir dangtelį pasilikite kitam panaudojimui su likusiomis juostelėmis.
3. Atkurkite liofilizuotą komplekto standartą su ant standarto buteliuko etiketės nurodytu dejonizuoto arba destiliuoto vandens kiekiu. Atsargiai maišykite buteliuko turinį (vengiant putų susidarymo) ir įsitikinkite, kad turinys visai ištirpęs. Atkūrus standartą iki nurodyto tūrio, gaunamas tirpalas, kurio koncentracija yra 8,0 IE/ml.

Nurodymas: Atkurto komplekto standarto kiekis yra kiekvienoje partijoje kitoks!

Atkurtą komplekto standartą panaudokite skiedinio serijos 1:4 iš IFN- γ žaliame skiediklyje (ŽS) paruošimui – žiūrėkite 1 pav. S1 (1 standarto) sudėtyje yra 4 IE/ml, S2 (2 standarto) sudėtyje yra 1 IE/ml, S3 (3 standarto) sudėtyje yra 0,25 IE/ml ir S4 (4 standarto) sudėtyje yra 0 IE/ml (tik ŽS). Standartai turėtų būti ištirti mažiausiai du kartus.

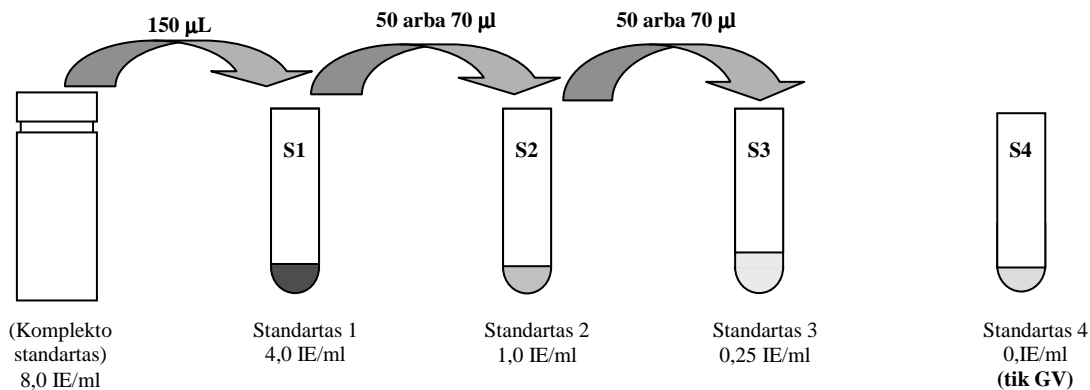
SIŪLOMA PROCEDŪRA DVIGUBAM STANDARTUI

- a. Užrašykite ant 4-ių vamzdelių „S1“, „S2“, „S3“ ir „S4“.
- b. Įpilkite **150 μl** ŽS į S1, S2, S3, S4.
- c. Įpilkite **150 μl** komplekto standarto į S1 ir kruopščiai sumaišykite.
- d. Perkelkite **50 μl** iš S1 į S2 ir kruopščiai sumaišykite.
- e. Perkelkite **50 μl** iš S2 į S3 ir kruopščiai sumaišykite.
- f. **Tik ŽS** tarnauja kaip nulinis standartas (S4).

SIŪLOMA PROCEDŪRA TRIGUBAM STANDARTUI

- a. Užrašykite ant 4-ių vamzdelių „S1“, „S2“, „S3“ ir „S4“.
- b. Įpilkite **150 μl** ŽS į S1.
- c. Įpilkite **210 μl** GV į S2, S3, S4.
- d. Įpilkite **150 μl** komplekto standarto į S1 ir kruopščiai sumaišykite.
- e. Perkelkite **70 μl** iš S1 į S2 ir kruopščiai sumaišykite.
- f. Perkelkite **70 μl** iš S2 į S3 ir kruopščiai sumaišykite.
- g. **Tik ŽS** tarnauja kaip nulinis standartas (S4).

1 PAVEIKSLĖLIS Standarto kreivės sudarymas



- Kiekvienai ELISA sesijai paruoškite naujus komplekto standarto skiedinius.
4. Atkurkite liofilizuotą konjugato 100x koncentratą su 0,3 ml dejonizuoto arba destiliuoto vandens. Atsargiai sumaišykite buteliuko turinį (vengdami putų susidarymo) ir įsitikinkite, kad turinys pilnai ištirpo.

Naudojimui tinkamą konjugatą pagaminsite praskiesdami reikiamą atkurto konjugato 100x koncentrato kiekį žaliame skiediklyje, kaip išdėstyta 1-oje lentelėje (Konjugato paruošimas).

1 LENTELĖ Konjugato paruošimas

JUOSTELIŲ SKAIČIUS	KONJUGATO 100 x KONCENTRATO KIEKIS	ŽALIO SKIEDIKLIO KIEKIS
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

- Kruopščiai, tačiau atsargiai išmaišykite, vengdami putų susidarymo.
 - Nesunaudotą konjugato 100x koncentratą nedelsiant grąžinkite į 2-8 °C temperatūrą.
 - Skiedimui naudokite tik žalią skiediklį.
5. Prieš testą plazmą reikia pamaišyti, kad IFN- γ mėginėlyje vienodai pasiskirstytų.
6. Daugiakanalės pipetės pagalba įpilkite į atitinkamas ELISA duobutes po 50 µl šviežiai naudojimui paruošto konjugato.
7. Daugiakanalės pipetės pagalba įpilkite į atitinkamas duobutes po 50 µl plazmos mėginio (žiūrėkite rekomenduojamą plokštelės panaudojimo planą, paveikslėliai 2A ir 2B). Galiausiai įpilkite po 50 µl į kiekvieną iš standartų nuo 1 iki 4.

2A PAVEIKSLĖLIS Rekomenduojamas plokštelės panaudojimas nuliniam kontrolės ir TB antigeno vamzdeliams (44 testai 1 plokštei)

Eilė	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 (1 standartas), S2 (2 standartas), S3 (3 standartas), S4 (4 standartas).
- 1N (1 mėginys, nulinės kontrolės plazma); 1A (1 mėginys, TB antigeno plazma).

2B PAVEIKSLĖLIS Rekomenduojamas plokštelės panaudojimas nuliniam kontrolės, TB antigeno ir mitogeno vamzdeliams (28 testai 1 plokštei)

Reihe	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 (1 standartas), S2 (2 standartas), S3 (3 standartas), S4 (4 standartas)
- 1N (1 mėginys, nulinės kontrolės plazma); 1A (1 mėginys, TB antigeno plazma); 1M (1 mėginys, mitogeno kontrolės plazma).

- Konjugatą ir plazmos mėginius/standartus 1 minutę kruopščiai maišykite, naudodami mikroplokštelių kratytuvą.
- Kiekvieną plokštelę uždenkite dangteliu ir inkubuokite 120 ± 5 minučių kambario temperatūroje ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Inkubacijos metu plokštelės saugoti nuo tiesioginių saulės spindulių.
- Inkubacijos metu praskieskite 1 dalį plovimo buferio 20x koncentrato su 19 dalių dejonizuoto ar destiliuoto vandens ir kruopščiai išmaišykite. Iš pateikto plovimo buferio 20x koncentrato galima pagaminti 2 litrus naudojimui tinkamo plovimo buferio.

Šulinėlius plaukite mažiausiai 6 kartus su **400 µl** naudojimui tinkamo plovimo buferio. Rekomenduojame pasinaudoti mikroplokštelių plovimo automatu.

- Kruopštus plovimas yra labai svarbu siekiant tikslių testo rezultatų. Kiekvieno plovimo ciklo metu patikrinkite, ar visi šulinėliai yra **iki viršaus užpildyti plovimo buferiu**. Rekomenduotina tarp plovimo ciklų mažiausiai 5 sekundes pamirkyti.
- Į atliekamų skysčių talpyklą turėtų būti įpilta laboratorijose įprastai naudojamos dezinfekcinės priemonės. Taip pat laikykitės Jūsų laboratorijoje galiojančių potencialiai infekuojančios medžiagos nukenksminimo taisyklių.

11. Pastuksenkite plokštelę šulinėliais į apačią ant popierinio rankšluosčio, kad būtų pašalintas likęs plovimo buferis. Tada į kiekvieną šulinėlį įpilkite 100 µl enzimo substrato tirpalo ir maišykite mikroplokštelių kratytuve.
12. Kiekvieną plokštelę uždenkite dangteliu ir inkubuokite ją 30 minučių kambario temperatūroje ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Inkubacijos metu saugokite plokšteles nuo tiesioginių saulės spindulių.
13. Po 30 minučių trukusios inkubacijos į kiekvieną šulinėlį įpilkite po 50 µl enzimo stabdymo tirpalo ir išmaišykite.
 - Enzimo stabdymo tirpalas į šulinėlius turėtų būti įpiltas ta pačia eiles tvarka ir tuo pačiu tempu kaip ir substratas 11-e punkte.
14. Pamatuokite optinį tankį (OT) kiekviename šulinėlyje 5-ių minučių laikotarpyje nuo stabdymo tirpalo įpylimo. Tuo tikslu pasinaudokite skaitymo įrenginiu, skirtu mikroplokštelėms, panaudojant 450 nm filtrą ir nuo 620 nm iki 650 nm referencijos filtrą. OT vertės yra reikalingos apskaičiuojant rezultatus.

7. APSKAIČIAVIMAS IR REZULTATŲ INTERPRETACIJA

Cellestis yra Jums paruošęs QuantiFERON[®]-TB Gold IT analizės programinę įrangą, skirtą neapdorotų duomenų analizei ir rezultatų apskaičiavimui.

Programinės įrangos pagalba atliekama kokybės kontrolės analizė, sudaroma standarto kreivė ir, remiantis žemiau paaiškintu interpretacijos metodu, pateikiamas rezultatas kiekvienam testuotam asmeniui.

Vietoje QuantiFERON[®]-TB Gold IT analizės programinės įrangos panaudojimo, kaip alternatyva, rezultatai gali būti nustatyti ir žemiau paaiškinto metodo pagalba:

Standarto kreivės sudarymas

(kai nėra panaudojama QuantiFERON[®]-TB Gold IT programinė įranga)

Nustatykite komplekto standarto pakartojimų vidutinės OT vertes ant kiekvienos plokštelės.

Sudarykite $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standarto kreivę, pažymėdami vidutinės OT vertės $\log_{(e)}$ (y ašis) ir standarto IFN- γ koncentracijos $\log_{(e)}$ IE/ml (x ašis), į šiuos skaičiavimus neįtraukdami nulinio standarto. Regresijos analizės pagalba apskaičiuokite liniją su labiausiai tinkančia forma standarto kreivei.

Standarto kreivę panaudokite IFN- γ koncentracijos (IE/ml) nustatymui kiekvienam ištestuotam plazmos mėginiui, panaudokite kiekvieno mėginio OT vertę.

Šiems skaičiavimams gali būti panaudoti programinės įrangos paketai, gaunami su mikroplokštelių skaitytuvais, o taip pat standartinės skaičiuoklės arba statistikos programos (pvz., Microsoft Excel). Tokiais programinės įrangos paketais rekomenduojame pasinaudoti darant regresijos analizę, apskaičiuojant standartų variacijos koeficientą (% VK) bei koreliacijos koeficientą (r) standarto kreivei.

Testo kokybės patikrinimas

Testo rezultatų teisingumas priklauso nuo teisingos standarto kreivės sudarymo. Todėl, prieš pradėdant testo rezultatų interpretaciją, turi būti patikrinti iš standartų išvesti rezultatai.

ELSA galioja, kai yra išpildyti visi žemiau išvardinti kriterijai:

- **1 standarto vidutinė OT vertė privalo būti $\geq 0,600$.**
- **1-mo standarto ir 2-o standarto replikuotų OT verčių VK % privalo būti $\leq 15\%$.**
- **3-am standartui ir 4-am standartui replikuotos OT vertės nuo atitinkamų vidutinių verčių turi nukrypti ne daugiau kaip 0,040 OT vienetų.**
- **Iš standartų vidutinių absorbcijos verčių apskaičiuotas koreliacijos koeficientas (r) privalo būti $\geq 0,98$.**

QuantiFERON[®]-TB Gold IT analizės programinės įrangos pagalba apskaičiuojami šie kokybės kontrolės parametrai.

Jeigu šie kriterijai neišpildomi, testas negalioja ir turi būti pakartotas.

- **Nulinio standarto (žalio skiediklio) vidutinė OT vertė turi būti $\leq 0,150$. Jeigu vidutinė OT vertė yra $> 0,150$, rekomenduojama patikrinti plokštelių plovimo procesą.**

Rezultatų interpretacija

QuantiFERON®-TB Gold IT testo rezultatai turi būti interpretuojami pagal šiuos kriterijus:

NURODYMAS: Diagnozei ar atitinkamai tuberkuliozės ligos paneigimui ir LTBI tikimybės nustatymui reikia įvertinti epidemiologinius, istorinius, medicininius ir diagnostinius rezultatus; į juos privaloma atsizvelgti interpretuojant QuantiFERON®-TB Gold IT testo rezultatus.

KAI PANAUDOJAMI NULINĖS KONTROLĖS IR TB ANTIGENO VAMZDELIAI

Nulis [IE/ml]	TB antigenas minus nulis [IE/ml]	QuantiFERON®-TB Gold IT rezultatas	Ataskaita / interpretacija
≤ 8,0	< 0,35	neigiamas	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NĖRA galima
	≥ 0,35 ir < 25% nulinės kontrolės vertės		
	≥ 0,35 ir ≥ 25% nulinės kontrolės vertės	pozityvus ¹	<i>M. tuberculosis</i> infekcija galima
> 8,0 ²	bet koks	neaiškus ³	rezultatai TB antigeno reakcijai neaiškūs

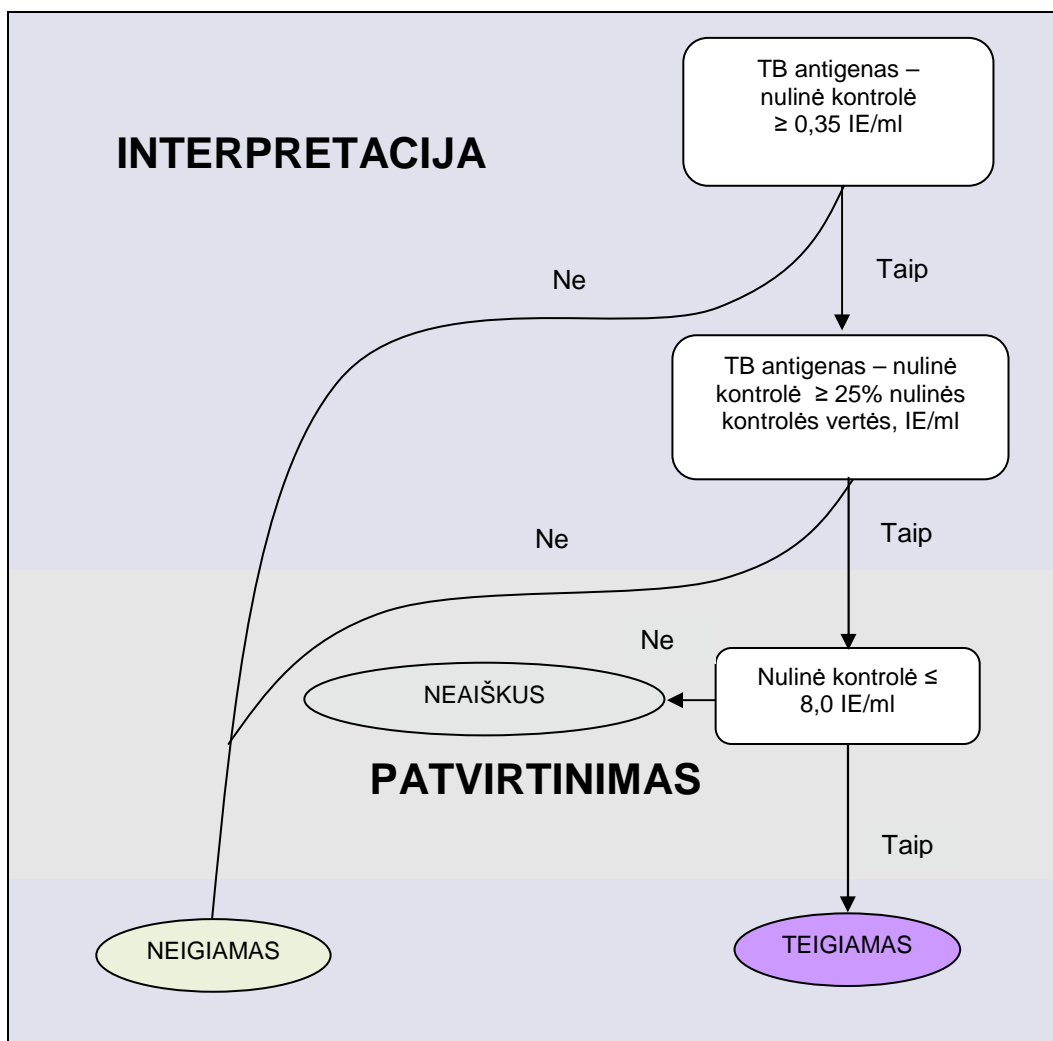
¹ Tais atvejais, kai *M. tuberculosis* infekcija nėra įtariama, pradžioje gauti teigiami testo rezultatai gali būti patvirtinti originalių plazmos mėginių nauju dvigubu QuantiFERON®-TB Gold ELISA testu. Jeigu pakartojus testą pirmam arba antram mėginiui vėl gaunamas teigiamas rezultatas, testo rezultatas turi būti laikomas teigiamu.

² Klinikinių studijų metu mažiau negu 0,25 % asmenų turėjo > 8,0 IE/ml IFN-γ koncentraciją nulinės kontrolės atžvilgiu.

³ Galimų priežasčių ieškokite skyriuje „Problemų sprendimas“.

Pagal pamatuotos koncentracijos IFN-γ dydį negalima daryti išvados apie infekcijos stadiją arba laipsnį, apie imuninio reaktyvumo lygį ar apie aktyvios ligos progresavimo tikimybę.

3 PAVEIKSLĒLIS Tekanti diagrama interpretacijai, kai panaudojami NULINIAI IR TB ANTIGENO VAMZDELIAI



KAI PANAUDOJAMI NULINĖS KONTROLĖS, TB ANTIGENO IR MITOGENO VAMZDELIAI

<u>Nulis</u> [IE/ ml]	<u>TB antigenas minus nulis</u> [IE/ml]	<u>Mitogenas minus nulis</u> [IE/ ml] ¹	QuantiFERON®-Tb Gold IT rezultatas	Ataskaita / interpretacija
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	neigiamas	<i>M. tuberculosis</i> infekcija NĖRA galima
	≥ 0,35 ir < 25% nulinės kontrolės vertės	≥ 0,5		
	≥ 0,35 ir ≥ 25% nulinės kontrolės vertės	bet koks	pozityvus ²	<i>M. tuberculosis</i> infekcija galima
	< 0,35	< 0,5	neaiškūs ³	rezultatai TB antigeno reakcijai neaiškūs
	≥ 0,35 ir < 25% nulinės kontrolės vertės	< 0,5		
> 8,0 ⁴	bet koks	bet koks		

¹ Pozityvios mitogeno kontrolės (ir kartais TB antigeno) reakcija yra dažnai už mikroplokštelių skaitymo aparato matavimo ribų. Tačiau tai neturi įtakos testo rezultatams.

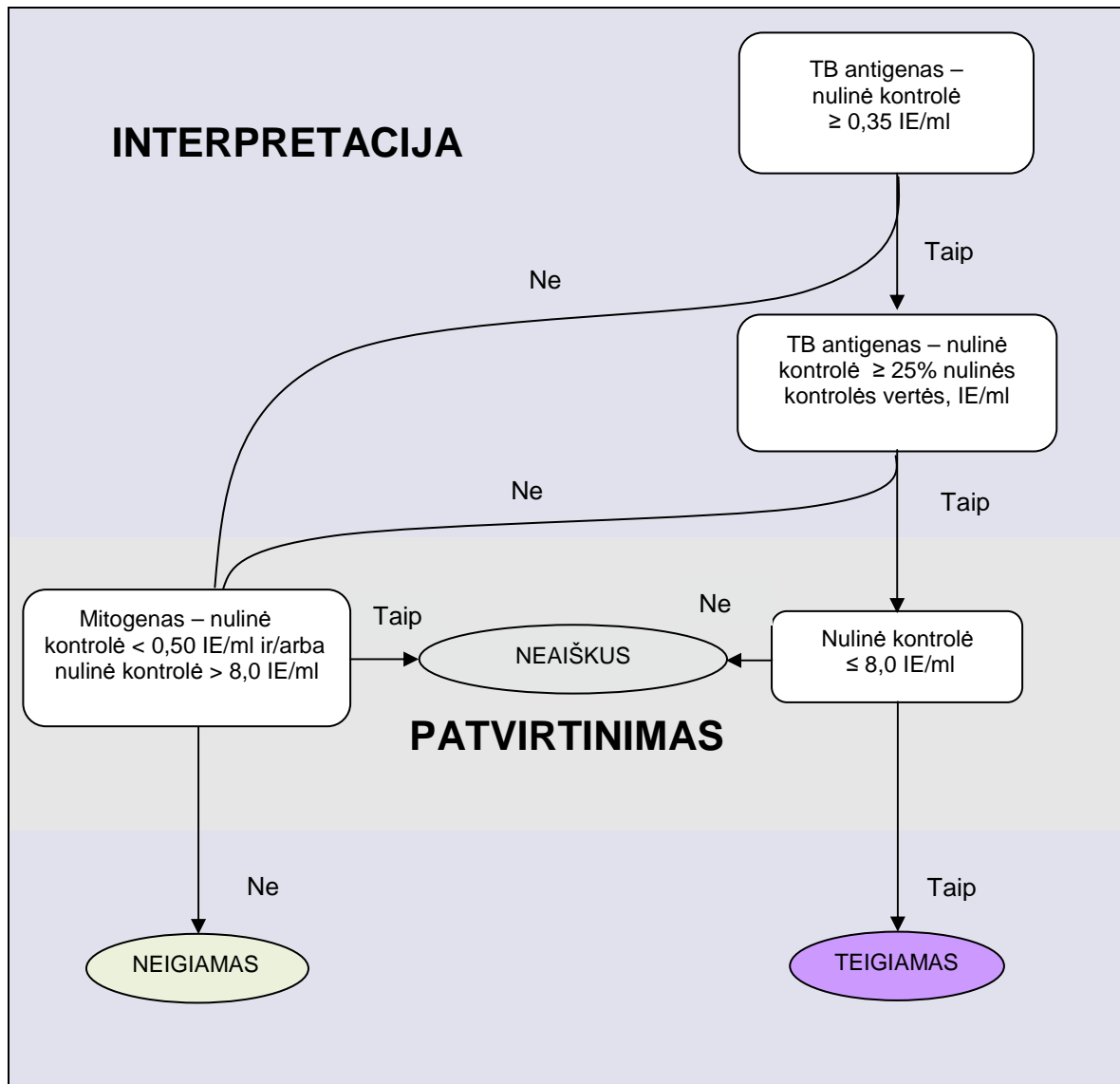
² Tais atvejais, kai *M. tuberculosis* infekcija nėra įtariama, pradžioje gauti teigiami testo rezultatai gali būti patvirtinti originalių plazmos mėginių nauju dvigubu QuantiFERON®-TB Gold ELISA testu. Jeigu pakartojus testą pirmam arba antram mėginiui vėl gaunamas teigiamas rezultatas, testo rezultatas turi būti vertinamas pozityviu.

³ Galimo pagrindo ieškokite skyriuje „Problemų sprendimas“.

⁴ Klinikinių studijų metu mažiau negu 0,25 % asmenų turėjo > 8,0 IE/ml IFN-γ koncentraciją nulinės kontrolės atžvilgiu.

Pagal pamatuotos koncentracijos IFN-γ dydį negalima daryti išvados apie infekcijos stadiją arba laipsnį, apie imuninio reaktyvumo lygį ar apie aktyvios ligos progresavimo tikimybę.

4 PAVEIKSLĒLIS Tekanti diagrama interpretacijai, kai panaudojami NULINĒS KONTROLĒS, TB ANTIGENO IR MITOGENO VAMZDELIAI



8. METODO RIBOS

QuantiFERON®-TB Gold IT testo rezultatai privalo būti įvertinti, atsižvelgiant į kiekvieno atskiro paciento epidemiologinę istoriją, jo dabartinę sveikatos būklę ir kitus diagnostinius tyrimus.

Rezultatai, kurių nulinė vertė yra virš 8 IE/ml, turi būti vertinami kaip “neaiškūs”, nes 25 % padidėjusi TB antigeno reakcija gali būti už bandinio matavimo ribų.

Nepatikimi arba neaiškūs rezultatai gali būti gauti dėl:

- nukrypimų nuo pakuotės informaciniame lapelyje nurodyto metodo
- ypatingai aukštos cirkuliuojančio IFN- γ koncentracijos arba esant heterofilinių antikūnių
- 16-os valandų termino nuo kraujo paėmimo iki inkubacijos 37 °C temperatūroje viršijimo

9. CHARAKTERISTIKA

Klinikinės studijos

Kadangi latentinei tuberkuliozės infekcijai (LTBI) nėra apibrėžto standarto, QuantiFERON®-TB Gold IT testo jautrumas ir tikslumas negali būti praktiškai įvertintas. QuantiFERON®-TB Gold IT tikslumas buvo apytiksliai nustatytas įvertinant klaidingų pozityvių rezultatų pas asmenis su maža tuberkuliozės infekcijos rizika (t.y., be žinomų rizikos faktorių) dalį. Jautrumas buvo apytiksliai nustatytas įvertinant aktyvia patvirtintos kultūros tuberkuliozės forma sergančias pacientų grupes.

Tikslumas

JAV studijų metu, atliekant TOT (tuberculin skin test, TST), QuantiFERON®-TB Gold IT testui, buvo paimti kraujo mėginiai iš 866 savanorių. Demografiniai duomenys ir tuberkuliozės rizikos faktoriai buvo nustatyti testo metu standartinės apklausos pagalba. Iš 432 savanorių, neturinčių žinomų *M. tuberculosis* infekcijos rizikos faktorių, 391 asmeniui buvo gauti QuantiFERON®-TB Gold IT ir TOT rezultatai. Nei vienas iš šių asmenų nebuvo vakcinuotas su BCG. Antra tikslumo studija su QuantiFERON®-TB Gold IT testu buvo atlikta Japonijoje su mažos rizikos savanoriais; 90 % iš šių asmenų buvo vakcinuoti su BCG. Abiejų tikslumo studijų rezultatai yra pateikti 2-oje lentelėje.

2 LENTELĖ QuantiFERON®-TB Gold IT testo tikslumas: Rezultatai asmenims be žinomų *M. tuberculosis* infekcijos rizikos faktorių.

STUDIJA	BCG statusas: % vakcinuoti	Testuotų asmenų skaičius	Neaiškių rezultatų skaičius QFT-G	QFT-G pozityvių / įskaitytų testų skaičius	QFT-G tikslumas (95% CI**)	TOT pozityvių / įskaitytų testų skaičius	TOT* tikslumas (95% CI**)
JAV (nepaskelbta)	0%	391	1	3/390	99,2% (97,6-99,8)	6/391	98,5% (96,5-99,4)
Japonija (nepaskelbta)	~90%	190	4	3/186	98,4% (95-99,6)	--	--
SUMA		581	5/584 (0,9%)	6/576	99,0%	--	--

* TST ribine verte imant 10 mm. Ribine verte imant 15 mm TOT tikslumas yra įvertinamas 99,1%.

** CI = konfid. intervalas

Jautrumas aktyvios tuberkuliozės formai

Siekiant nustatyti testo QuantiFERON®-TB Gold IT jautrumą, buvo testuojami asmenys iš Australijos ir Japonijos, kuriems buvo įtariama TB ir kurių *M. tuberculosis* infekcija po to buvo įrodyta kultūros pagalba. Nors latentinei tuberkuliozės infekcijai (LTBI) nėra jokio apibrėžto standarto, *M. tuberculosis* mikrobiologinė kultūra yra tinkamas pakaitalas, nes sergantys asmenys iš esmės yra infekuoti. Prieš kraujo paėmimą QuantiFERON®-TB Gold IT testui pacientai buvo mažiau nei 8-ias dienas gydomi.

3-oje lentelėje yra pateikti šių dviejų *M. tuberculosis* kultūroms pozityvių pacientų grupių rezultatai. QuantiFERON®-TB Gold IT testo bendras jautrumas aktyviai TB ligos formai buvo 89% (48/54).

3 LENTELĖ QuantiFERON®-TB Gold IT: Asmenys su nustatytos kultūros *M. tuberculosis* infekcija.

STUDIJA	Liga patvirtinta	QFT-Gold pozityvių / įskaitytų testų skaičius	QFT-Gold jautrumas (95% CI*)
Japonijos TB pacientai / Patvirtinimo studija	Kultūra	24/27	89% (72-96%)
Australijos TB pacientai / Patvirtinimo studija	Plaučių	7/10	70% (40-89%)
	Papildomai plaučių	17/17	100% (82-100%)
IŠ VISO		48/54	89% (78-95%)

*CI = konfid. intervalas

LTBI diagnozė

Buvo paskelbta eilė studijų, kurios įrodo QuantiFERON®-TB Gold IT pajėgumą įvairiose LTBI rizikos populiacijose. Svarbiausi parinktų studijų duomenys yra išvardinti 4-oje lentelėje.

4 LENTELĖ Parinktos paskelbtos studijos apie QuantiFERON®-TB Gold IT panaudojimą LTBI rizikos populiacijose

STUDIJA	Testų skaičius	Rezultatai
Med. personalas Indijoje (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Aplinka su labai didele TB dalimi. 40% QFT-Gold IT pozityvių ar atitinkamai 41% TOT pozityvių, kai ribinė vertė 10mm. Didelis sutikimas su TOT, jokio BCG poveikio testams. Abu testai susieti su rizikos faktoriais „amžiumi“ ir „darbo sveikatos apsaugos srityje trukme“.
ŽIV pozityvūs asmenys Danijoje (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	LTBI bendras dominavimas QFT-Gold IT buvo 4,6% (27/590) pas ŽIV pozityvius asmenis. Pozityvūs rezultatai buvo susiję su TB rizikomis. Du pagal QFT-Gold IT pozityvūs pacientai vienerių metų laikotarpyje susirgo aktyvia TB ligos forma. Neaiškūs rezultatai (n=20, 3,4 %) buvo glaudžiai susiję su CD4 skaičiumi <100 / μL
Hospitalizuoti vaikai (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Vaikai, kuriems įtariama TB arba kurie turėjo TB kontaktą, buvo testuojami su QFT-Gold IT ir TOT. 10,5% QFT-Gold IT pozityvių ir atitinkamai 9,5% TOT pozityvių, kai ribinė vertė 10mm. Testų sutapimas iš viso 95,2% ir atitinkamai 100% su BCG nevakcinuotų atveju.
Vokiečiai su TB kontaktais (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Buvo testuojami 15-os įvairių indeksų atvejų artimo kontakto asmenys. 51% buvo BCG vakcinuoti, 27 % gimę užsienyje. 70% BCG vakcinuotų ir 18% nevakcinuotų buvo TOT pozityvūs (5mm) ir 9% ar atitinkamai 11% buvo QFT-Gold IT pozityvūs. QFT-Gold IT buvo susijęs su TB rizika. TOT buvo susijęs tik su BCG vakcinacija.

QuantiFERON®-TB Gold (QuantiFERON®-TB Gold IT testo pirmtako) ir QuantiFERON®-TB Gold IT testų mažiau jautraus skysto antigeno versijos pajėgumas yra aprašytas daugelyje kitų paviešinių. Šios studijos apima ir testo panaudojimą asmenims, kontaktuojantiems su pacientais, sergančiais aktyvia TB^{9,11,19,25}, vaikams^{6-10,25,28}, ŽIV pozityviems asmenims^{2,5,20}, medicininiam personalui^{13,26,32}, asmenims su nuslopintu imunitetu^{3,4,22,23,27,30,31} bei asmenims su TB įtarimu^{7,8,10,18} arba su maža rizika¹⁵.

Galimybė pakartoti ir TOT poveikis vėlesniems QuantiFERON®-TB Gold IT testams

Atliekant JAV specifikacijos studiją, vienas savanorių pogrupis buvo patikrintas praėjus 4 - 5 savaitėms nuo QuantiFERON®-TB Gold IT ir TOT pirminio testo. Todėl 260-iai savanorių QuantiFERON®-TB Gold IT testo ir TOT testo rezultatai buvo nustatyti du kartus; rezultatai sutapo 99,6% (259/260). Prieš tai atliktas TOT testas nepadarė įtakos QuantiFERON®-TB Gold IT rezultatams.

10. TECHNINĖ INFORMACIJA

Neaiškūs rezultatai

Neaiškūs rezultatai pasitaiko retai; juos gali nulemti šie techniniai faktoriai:

- 16-os valandų termino nuo kraujo paėmimo iki inkubacijos 37 °C temperatūroje viršijimas
- Kraujo mėginių laikymas kitoje temperatūroje, negu rekomenduojama (22 ± 5°C)
- Nepakankamas kraujo paėmimo vamzdelių turinio maišymas
- Nepakankamai švariai išplautos ELISA plokštelės

Esant įtarimui, kad paimant kraują arba dirbant su kraujo mėginiais buvo techninių problemų, visas QuantiFERON®-TB Gold IT testas turėtų būti pakartotas su nauju kraujo mėginiu. Stimuliuotų plazmos mėginių ELISA testas gali būti pakartotas, jeigu įtariama, kad buvo nepakankamai švariai išplauta arba kad egzistuoja nukrypimų nuo nustatyto ELISA metodo. Neaiškūs rezultatai, gaunami dėl žemos mitogeno ir aukštos nulinės vertės, testą pakartojus turėtų nepasikeisti, nebent tuo atveju, jeigu ELISA teste buvo padaryta klaida. Apie neaiškius rezultatus taip turėtų būti ir pranešta. Tada pagal aplinkybes gydytojas gali paimti naują kraujo mėginį arba, reikalui esant, atlikti kitus tyrimus.

Sukrešę plazmos mėginiai

Jeigu plazmos mėginius laikant ilgesnį laiką susidaro fibrino krešulių, mėginius reikia centrifuguoti iki nuosėdų susidarymo; tai palengvina plazmos pipetavimą.

ELISA problemų sprendimas

Nespecifinės spalvos reakcija

GALIMAS PAGRINDAS	SPRENDIMAS
Nepakankamai švariai išplautos plokštelės	Plokštelę plauti mažiausiai 6 kartus po 400 µl plovimo buferio į šulinėlį. Priklausomai nuo naudojamo plovimo aparato, gali prireikti daugiau nei 6-ių plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų palikti po 5 sekundes atmirkti.
ELISA šulinėlių kryžminis užsiteršimas	Kruopštus mėginių lašinimas pipete ir maišymas sumažina riziką.
Pasibaigęs komplekto/komplekto sudėtinių dalių galiojimo laikas	Patikrinkite, ar komplekto galiojimo laikas nėra pasibaigęs. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato 100x koncentratas buvo panaudoti 3-jų mėnesių laikotarpyje nuo atkūrimo.
Enzimo substrato tirpalas yra užterštas	Išmeskite substratą, jeigu nusidažo melsvai. Tikrinkite, kad būtų naudojamos švarios reagentų talpos.

Žema standartų OT vertė

GALIMAS PAGRINDAS	SPRENDIMAS
Padaryta klaida paruošiant standarto skiedinį	Komplekto standarto skiedinius paruoškite tiksliai laikydamiesi pakuotės informacinio lapelio nurodymų.
Klaida naudojantis pipete	Patikrinkite, ar pipetės yra kalibruotos ir naudojamos tiksliai pagal gamintojo nurodymus.
Per žema inkubacijos temperatūra	ELISA inkubacija turėtų vykti kambario temperatūroje (17-27°C).
Per trumpas inkubacijos laikas	Plokštelės su konjugatu, standartais ir mėginiais inkubacijos trukmė turėtų būti 120 ± 5 minučių. Enzimo substrato tirpalas ant plokštelės yra inkubuojamas 30 minučių.
Netinkamas plokštelės filtras	Plokštelės rezultatai turėtų būti skaitomi prie 450 nm su 620 - 650 nm referencijos filtru.
Per šalti reagentai	Visi reagentai (neskaitant konjugato 100x koncentrato) prieš pradėdami testą turi būti kambario temperatūros. Ją pasiekti trunka apie 60 minučių.
Pasibaigęs komplekto/komplekto sudėtinių dalių galiojimo laikas	Patikrinkite, ar komplekto galiojimo laikas nėra pasibaigęs. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato 100x koncentratas buvo panaudoti 3-jų mėnesių laikotarpyje nuo atkūrimo.

Stiprus fono nusidažymas

GALIMAS PAGRINDAS	SPRENDIMAS
Nepakankamas plokštelių plovimas	Plokštelę plauti mažiausiai 6 kartus po 400 µl plovimo buferio į šulinėlį. Priklausomai nuo naudojamo plovimo aparato, gali prireikti daugiau nei 6-ių plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų palikti po 5 sekundes atmirkti.
Per aukšta inkubacijos temperatūra	ELISA inkubacija turėtų vykti kambario temperatūroje (17-27°C).
Pasibaigęs komplekto/komplekto sudėtinių dalių galiojimo laikas	Patikrinkite, ar komplekto galiojimo laikas nėra pasibaigęs. Patikrinkite, ar standartas ir konjugato 100x koncentratas buvo panaudoti 3-jų mėnesių laikotarpyje nuo atkūrimo.
Enzimo substrato tirpalas yra užterštas	Išmeskite substratą, jeigu nusidažo melsvai. Tikrinkite, kad būtų naudojamos švarios reagentų talpos.

Netiesinė standarto kreivė ir nukrypimai tarp abiejų dvigubų mėginių

GALIMAS PAGRINDAS	SPRENDIMAS
Nepakankamai švariai išplautos plokštelės	Plokštelę plauti mažiausiai 6 kartus po 400 µl plovimo buferio į šulinėlį. Priklausomai nuo naudojamo plovimo aparato, gali prireikti daugiau nei 6-ių plovimo ciklų. Rekomenduojama tarp plovimo ciklų palikti po 5 sekundes atmirkti.
Padaryta klaida paruošiant standarto skiedinį	Komplekto standarto skiedinius paruoškite tiksliai laikydamiesi pakuotės informacinio lapelio nurodymų.
Nepakankamas maišymas	Kruopščiai sumaišykite reagentus nekartą apverčiant arba lengvai pasukiojant ratu prieš juos pilant į šulinėlius.
Neritmingumas pipetavimo technikoje arba pertraukimas pasirengimo bandymui metu	Mėginių ir standartų pylimas turėtų vykti nenutrūkstamai. Visi reagentai turi būti paruošti panaudojimui prieš pradėdant testą.

Testavimo procedūrą demonstruojantį video ir didžiosios techninių problemų dalies sprendimą rasite CD-ROM'e ties informacija apie produktą ir ties techniniais nurodymais. CD-ROM'ą gausite nemokamai tiesiai iš Cellestis arba per Jūsų tiekėją.

11. LITARATŪRA

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. TRUMPAS TESTO ATLIKIMO APRAŠYMAS

1. ŽINGSNIS: INKUBUOTI KRAUJO MĖGINĮ

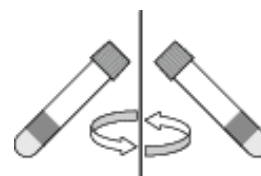
1. Kraujo paėmimo vamzdeliu iš paciento paimti kraujo mėginį ir **5 sekundes energingai purtant** (arba 10 kartų sukrečiant) kruopščiai sumaišyti turinį. **Visa vamzdelio sienelių vidinė pusė** turi būti pasidengusi krauju.



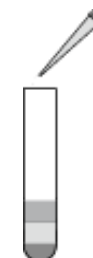
2. Vamzdelius inkubuoti **vertikaliaje** pozicijoje 16–24 valandas 37°C temperatūroje.



3. Po inkubavimo esant 1500 – 2200 g (RCF) vamzdelius 5–15 minučių centrifuguoti, kad plazma atsiskirtų nuo raudonųjų kraujo ląstelių.

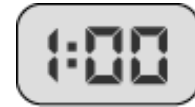


4. Po centrifūgavimo iš kiekvieno vamzdelio paimti plazmos mėginį IFN- γ kvantifikavimui kiekio nustatymui.



2. ŽINGSNIS: IFN- γ ELISA

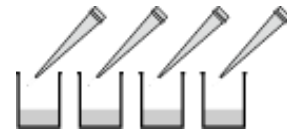
1. ELISA komponentus, neskaitant konjugato 100x koncentrato, palikti mažiausiai 60 minučių išsilyginti su kambario temperatūra.



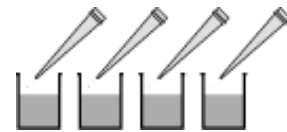
2. Kompletto standartą atkurti su 8.0 IU/mL distiliuoto arba dejonizuoto vandens. Pagaminti keturis (4) standarto skiedinius.



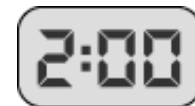
3. Distiliuoto arba dejonizuoto vandens pagalba atkurti liofilizuotą konjugato 100x koncentratą.



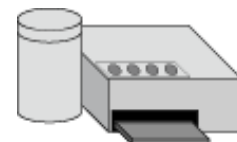
4. Pagaminti darbui reikiamo stiprumo konjugatą su žaliu skiedikliu ir į visus šulinėlius įpilti po 50 μ L.



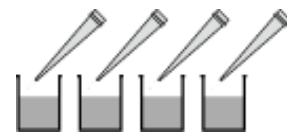
5. Į atitinkamus šulinėlius įpilti po 50 μ L plazmos mėginio ir 50 μ L standartų. Išmaišyti kratytuvu.



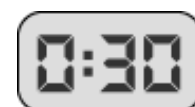
6. 120 minučių inkubuoti kambario temperatūroje.



7. Šulinėlius plauti mažiausiai 6 kartus, panaudojant 400 μ L plovimo buferio kiekvienam šulinėliui.

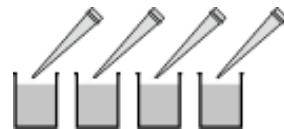


8. Į kiekvieną šulinėlį įpilti po 100 μ L enzimo substrato tirpalo. Išmaišyti kratytuvu.

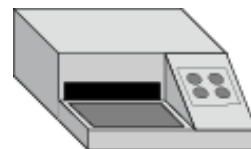


9. 60 minučių inkubuoti kambario temperatūroje.

10 Į visus šulinėlius įpilti po 50 μ L stabdymo tirpalo. Išmaišyti kratytuvu.



11 Matuoti rezultatus prie 450 nm su 620 - 650 nm referencijos filtru.



12 Analizuoti rezultatus.





Pagaminta ģimonēms:

Cellestis Limited (Australija) ir Cellestis GmbH (Europa)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australija
Tel. (Australija) +61 3 9571 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0

El. p.: quantiferon@cellestis.com

Interneto puslapis: www.cellestis.com

Dok. Nr. 05990301C
August 2009

Autorizotas atstovas:

MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover

Germany

