

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

***(Metoda próbówkowa)***

**Test oparty na pomiarze stężenia IFN-gamma z krwi pełnej,  
powstającego w odpowiedzi na antygeny peptydowe  
ESAT-6, CFP-10 oraz TB7,7(p4)**

**PODRĘCZNIK DIAGNOSTYCZNY**

do testów w warunkach *in vitro*



## INDEKS

1. PRZEZNACZENIE TESTU	2
2. CHARAKTERYSTYKA I WYJAŚNIENIE ZASADY DZIAŁANIA TESTU	2
Zasady przeprowadzania testu	3
Czas potrzebny do przeprowadzenia testu	3
3. ODCZYNNIKI I ICH PRZECHOWYWANIE	4
Potrzebny sprzęt laboratoryjny i materiały (nie dostarczane w zestawie do testu)	4
Instrukcje dotyczące przechowywania	5
Probówki do pobierania krwi	5
Odczynniki zestawu	5
Odtworzone i nie zużyte odczynniki	5
4. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI	6
Ostrzeżenia	6
Środki ostrożności	7
5. POBIERANIE PRÓBEK ORAZ OBCHODZENIE SIĘ Z NIMI	8
6. WYTYCZNE DOTYCZĄCE PRZEPROWADZENIA TESTU	10
ETAP PIERWSZY – Inkubacja krwi i zebranie osocza	10
ETAP DRUGI – test ELISA ludzkiego IFN- $\gamma$	11
7. OBLICZENIA I INTERPRETACJA WYNIKÓW TESTU	14
Wykreślenie krzywej wzorcowej	14
Kontrola jakości testu	15
Interpretacja wyników	16
8. OGRANICZENIA TESTU	20
9. CHARAKTERYSTYKA WIARYGODNOŚCI TESTÓW	20
10. INFORMACJE NATURY TECHNICZNEJ	22
Wyniki nieokreślone	22
Próbki z osoczem, w którym wytrącił się włóknik	22
Rozwiązywanie problemów dotyczących testu ELISA	23
Niespecyficzne pochodzenie barwy	23
Niskie wartości odczytu gęstości optycznej dla wzorców	23
Wysokie tło	24
Nieliniowy przebieg krzywej wzorcowej oraz zmienność w obrębie powtórzeń	24
11. BIBLIOGRAFIA	25
12. POMOC TECHNICZNA	26
13. SKRÓCONY OPIS PROCEDURY TESTOWEJ	27

## 1. PRZEZNACZENIE TESTU

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) jest testem diagnostycznym *in vitro* wykorzystującym koktajl peptydowy naśladujący białka ESAT-6, CFP-10 oraz TB7,7(p4) w celu stymulacji komórek heparynizowanej krwi pełnej. Za pomocą immunoenzymatycznego testu ELISA (ang.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wykrywa się interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), by zidentyfikować w warunkach *in vitro* reakcje z tymi antygenami peptydowymi, które są związane z zakażeniem prątkiem gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*).

QuantiFERON®-TB Gold IT jest testem pośrednim do wykrywania infekcji *M. tuberculosis* (w tym choroby) przeznaczonym do stosowania w połączeniu z oszacowaniem ryzyka, badaniem radiograficznym oraz innymi medycznymi oznaczeniami diagnostycznymi.

## 2. CHARAKTERYSTYKA I WYJAŚNIENIE ZASADY DZIAŁANIA TESTU

Gruźlica jest chorobą zakaźną wywoływaną infekcją bakterii z rodzaju *Mycobacterium*, zwanych tutaj kompleksem *M. tuberculosis*, (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), które zazwyczaj przenoszą się do nowych gospodarzy drogą kropelkową z pacjentów chorych na gruźlicę układu oddechowego. Nowo zakażony osobnik może zachorować na gruźlicę w przeciągu kilku tygodni do kilku miesięcy, lecz większość zakażonych nie choruje. Utajone zakażenie prątkami gruźlicy (LTBI) – niezakaźny bezobjawowy stan – utrzymuje się u niektórych osób. U tych ludzi może rozwinąć się gruźlica w kilka miesięcy lub w kilka lat od wystąpienia infekcji. Głównym celem diagnostyki LTBI jest rozważenie wprowadzenia postępowania terapeutycznego dla zapobiegania rozwojowi gruźlicy. Do niedawna tuberkulinowy test skórny (próba tuberkulinowa - TST) był jedyną dostępną metodą diagnostyki LTBI. Reakcja skórna na tuberkulinę pojawia się w 2 do 10 tygodni od zakażenia. Jednak niektóre zakażone osoby, w tym pacjenci cierpiący na różne choroby upośledzające funkcje układu odpornościowego, ale także osoby bez tych dolegliwości nie wykazują odpowiedzi na tuberkulinę. Przeciwnie, niektórzy ludzie, u których występuje małe prawdopodobieństwo, że są zakażeni *M. tuberculosis* przejawiają wrażliwość na tuberkulinę i mają dodatni wynik próby TST po szczepieniu przeciwko gruźlicy szczepionką BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) czy po przejściu zakażenia mykobakteryjnego wywołanego czynnikiem innym niż bakterie z kompleksu *M. tuberculosis*, w tym czynnikiem bliżej nieokreślonym.

LTBI należy odróżniać od gruźlicy właściwej z towarzyszącymi jej symptomami chorobowymi. Gruźlica to choroba podlegająca zgłoszeniu, która zazwyczaj atakuje płuca oraz dolne drogi oddechowe, choć dotknięte mogą być również inne układy. Gruźlicę rozpoznaje się na podstawie wywiadu oraz wyników badań fizycznych, radiologicznych, histologicznych oraz mykobakteriologicznych.

Test QuantiFERON®-TB Gold IT jest testem mediowanych komórkowo odpowiedzi (skrót ang.: CMI) immunologicznych na antygeny peptydowe naśladujące białka mykobakterii. Białka te, tj. ESAT-6, CFP-10 oraz TB7,7(p4) nie występują u wszystkich szczepów BCG (wywołujących gruźlicę) oraz u większości mykobakterii nie posiadających zdolności do indukowania gruźlicy, z wyjątkiem *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum*.<sup>1</sup> Osoby zakażone mikroorganizmem zaliczanym do tzw. kompleksu *M. tuberculosis* zazwyczaj posiadają we krwi limfocyty (komórki pamięci), które rozpoznają te oraz inne antygeny mykobakteryjne. Ten proces rozpoznawania wiąże się z produkcją i sekrecją cytokiny – IFN- $\gamma$ . Detekcja oraz następujące po niej oznaczenie ilościowe IFN- $\gamma$  stanowią podstawę tego testu.

Antygeny stosowane w teście QuantiFERON®-TB Gold IT tworzą koktajl peptydowy naśladujący białka ESAT-6, CFP-10 i TB7,7(p4). Liczne badania dowiodły, iż te antygeny peptydowe stymulują produkcję i wydzielanie IFN- $\gamma$  przez limfocyty T u pacjentów zakażonych *M. tuberculosis*, lecz w zasadzie nie indukują tej odpowiedzi komórkowej u nie zakażonych osób bądź zaszczepionych szczepionką BCG, które nie chorują lub nie należą do grupy ryzyka zakażonych odmianą latentną – LTBI.<sup>1-32</sup> Należy jednak zauważyć, że leczenie lub choroby upośledzające działanie układu odpornościowego mogą potencjalnie osłabić reakcje biosyntezy IFN- $\gamma$ . Pacjenci z pewnymi innymi zakażeniami mykobakteryjnymi mogą również wykazywać reaktywność względem ESAT-6, CFP-10 oraz TB7,7(p4), gdyż geny kodujące te białka są obecne u *M. kansasii*, *M. szulgai* oraz *M. marinum*.<sup>1,23</sup> Test QuantiFERON®-TB Gold IT jest zarówno testem diagnostycznym dla pacjentów z LTBI, jak i dla pacjentów chorych na gruźlicę, którym służy pomocą w rozpoznawaniu zakażenia tzw. kompleksem *M. tuberculosis*. Pozytywny wynik testu potwierdza diagnozę choroby gruźliczej, jakkolwiek zakażenia innymi gatunkami mykobakterii (np. *M. kansasii*) mogą również prowadzić do otrzymania dodatnich wyników testu. Inne badania lekarskie i testy diagnostyczne są konieczne w celu potwierdzenia lub wykluczenia choroby gruźliczej.

## **Zasady przeprowadzania testu**

System QuantiFERON®-TB Gold IT wykorzystuje specjalne probówki do pobierania krwi pełnej. Inkubacja krwi w probówkach trwa od 16 do 24 godzin. Następnie zbiera się osocze i testuje na obecność IFN- $\gamma$  syntetyzowanego w odpowiedzi na antygeny peptydowe.

Test QuantiFERON®-TB Gold IT przeprowadza się w dwóch etapach. Etap pierwszy: krew pełna pobierana jest do każdej probówki zestawu QuantiFERON®-TB Gold, tj. probówki z próbą ślepą (Nil Control), probówki z „antygenami gruźliczymi” (TB Antigen) i – opcjonalnie – probówki z mitogenem – czynnikiem proliferacyjnym dla komórek (Mitogen).

Probówka z mitogenem może być stosowana w teście QuantiFERON®-TB Gold IT jako kontrola pozytywna. Szczególnie może ona być użyteczna wówczas, gdy istnieje wątpliwość co do stanu układu immunologicznego pacjenta. Probówka z mitogenem może również służyć jako kontrola prawidłowej procedury testowej i ewentualnych pomyłek laboranta (obchodzenie się z krwią, inkubacja).

Probówki zawierające krew należy poddać inkubacji w temperaturze 37°C tak szybko, jak to tylko możliwe, przy czym nie później niż po 16 godzinach od momentu pobrania krwi. Po okresie inkubacji trwającym 16-24 godziny zawartość probówek trzeba zwirować, usunąć osocze i zmierzyć stężenie IFN- $\gamma$  (wyrażone jako IU/ml) przy pomocy testu ELISA.

Wynik testu uważa się za pozytywny na obecność odpowiedzi z udziałem IFN- $\gamma$  na „antygeny gruźlicze”, jeśli wartości otrzymane dla probówki testowej (TB Antigen) są znamienne wyższe aniżeli wartości otrzymane dla kontroli (wartość Nil IFN- $\gamma$  IU/ml). W razie użycia, próbka z osoczem zawierającym mitogen służy jako kontrola pozytywna na obecność IFN- $\gamma$  dla każdego materiału testowego. Słaba reakcja na mitogen (<0,5 IU/ml) wskazuje na nieokreślony wynik testu wówczas, gdy próbka krwi również wykazuje ujemną reakcję na „antygeny gruźlicze”. Zdarzenie to może mieć miejsce przy limfocytopenii, obniżonej aktywności limfocytów spowodowanej niewłaściwym postępowaniem z próbką, nieodpowiednim napełnianiem próbki z mitogenem / nieodpowiednim mieszaniem jej lub niezdolnością limfocytów pacjenta do syntezy i uwalniania IFN- $\gamma$ . Próba ślepa służy jako tło, może wykazać reaktywność obcego antygen<sup>7</sup> lub obecność niespecyficznego IFN- $\gamma$  w próbkach krwi. Wynik stężenia IFN- $\gamma$  w próbce badanej otrzymuje się przez odjęcie wartości dla próbki ślepej od wartości otrzymanej dla próbki z „antygenami gruźliczymi” czy próbki z mitogenem (gdy używa się tej ostatniej).

## **Czas potrzebny do przeprowadzenia testu**

Czas potrzebny do przeprowadzenia testu QuantiFERON®-TB Gold IT został oszacowany i niżej podany; określono także czas badania licznych próbek, gdy konieczne jest testowanie próbek w seriach.

37°C Inkubacja krwi w probówkach: 16 do 24 godzin

Test ELISA: Około 3 godziny na jedną płytkę do testu ELISA  
(28 do 44 osób)

- <1 godzina pracy
- Dolicz 10 do 15 minut na każdą dodatkową płytkę

### 3. ODCZYNNIKI I ICH PRZECHOWYWANIE

#### Probówki do pobierania krwi dla przeprowadzenia testu

##### Numer katalogowy 0590 0301

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Ślepa – kontrola negatywna (szary korek)       | 100 probówek |
| 2. “Antygeny gruźlicze” (czerwony korek)          | 100 probówek |
| 3. Mitogen – kontrola pozytywna (purpurowy korek) | 100 probówek |

*UWAGA: Probówki dostępne są także w innych konfiguracjach:*

*Nr katalogowy 0590 0201: 100 probówek dla ślepej, 100 probówek z “antygenami gruźliczymi”*

*Nr katalogowy 0593 0201: 100 probówek z mitogenem*

##### **Probówki do testów na dużych wysokościach nad poziomem morza – High Altitude (HA) (odnośnik do punktu 5)**

*Nr katalogowy 0590 0501: (duża wysokość n.p.m.) 100 probówek dla ślepej, 100 probówek z “antygenami gruźliczymi”.*

*Nr katalogowy 0590 0505: (duża wysokość n.p.m.) 100 probówek dla ślepej, 100 probówek z “antygenami gruźliczymi” oraz 100 probówek z mitogenem.*

*Nr katalogowy T0593 0501 (duża wysokość n.p.m.) 100 probówek z mitogenem.*

#### Materiały i sprzęt laboratoryjny do testu ELISA

##### Numer katalogowy 0594 0201

- |  |                   |
|--|-------------------|
| 1. Paski mikroplastyki   | 24 x 8 studzienek |
| 2. Ludzki liofilizowany IFN- $\gamma$ jako wzorzec                         | 1 x fiolka        |
| 3. “Zielony rozcieńczalnik” (ang.: Green Diluent)                          | 1 x 30ml          |
| 4. Liofilizowany koniugat, stężony 100x (przeciwciała sprzężone z enzymem) | 1 x 0,3ml         |
| 5. Bufor do przepłukiwania, stężony 20x                                    | 1 x 100ml         |
| 6. Roztwór substratu dla enzymu  | 1 x 30ml          |
| 7. Roztwór zatrzymujący aktywność enzymu                                   | 1 x 15ml          |

#### Potrzebny sprzęt laboratoryjny i materiały (nie dostarczane w zestawie do testu)

- Inkubator utrzymujący temperaturę 37°C; funkcja dozowania CO<sub>2</sub> nie jest wymagana.
- Wykalibrowane pipety z funkcją ustawiania przenoszonej objętości w zakresie od 10 $\mu$ l do 1000 $\mu$ l wraz z jednorazowymi końcówkami.
- Wykalibrowana pipeta wielokanałowa z możliwym ustawianiem przenoszonej objętości na poziomie 50 $\mu$ l lub 100 $\mu$ l wraz z jednorazowymi końcówkami.
- Wyrząsarka do mikroplastyk.
- Woda dejonizowana (destylowana) – 2l.
- Płuczka mikroplastyk (zaleca się stosowanie płuczki automatycznej).
- Czytnik mikroplastyk wyposażony w filtr dla światła o  $\lambda = 450$  nm oraz w filtr referencyjny dla światła o  $\lambda = 620$ -650 nm.

## **Instrukcje dotyczące przechowywania**

### *Probówki do pobierania krwi*

- Probówki do pobierania krwi przechowywać w temperaturze od 4°C do 25°C.
- Okres ważności probówek do pobierania krwi zestawu QuantiFERON®-TB Gold wynosi 15 miesięcy od daty produkcji pod warunkiem, że są one przechowywane w temperaturze od 4°C do 25°C.

### *Odczynniki zestawu*

- Odczynniki zestawu przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C.
- Zawsze chronić roztwór substratu dla enzymu przed bezpośrednim wpływem światła słonecznego.
- Okres ważności zestawu do testu ELISA QuantiFERON®-TB Gold IT wynosi 3 lata od daty produkcji pod warunkiem, że odczynniki są przechowywane w temperaturze od 2°C do 8°C.

### *Odtworzone i nie zużyte odczynniki*

Instrukcje dotyczące odtwarzania odczynników znajdują się w rozdziale 6 (strona 11).

- Odtworzony wzorzec wyjściowy można przechowywać najwyżej przez 3 miesiące, jeśli zapewni się temperaturę od 2°C do 8°C.
  - *Odnótuj datę odtworzenia wzorca wyjściowego.*
- Po odtworzeniu nie zużyty koniugat (stężony 100x) koniecznie trzeba ponownie przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C i można go używać jeszcze przez 3 miesiące.
  - *Odnótuj datę odtworzenia koniugatu.*
- „Koniugat o aktywności roboczej” należy zużyć w ciągu 6 godzin od momentu przygotowania.
- „Bufor do przepłukiwania o aktywności roboczej” można przechowywać w temperaturze pokojowej najdłużej przez 2 tygodnie.

## 4. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

### Ostrzeżenia

- Ujemny wynik testu QuantiFERON®-TB Gold IT nie wyklucza możliwości zakażenia *M. tuberculosis* lub wystąpienia gruźlicy: fałszywie ujemne wyniki testów mogą być spowodowane fazą infekcji (np. próbka mogła być pobrana przed indukcją odpowiedzi komórkowej układu odporności), innymi chorobami wpływającymi na funkcjonalność układu immunologicznego, niewłaściwymi procedurami diagnostycznymi związanymi z materiałem badawczym i probówkami do pobierania krwi po nakłuciu żyły, nieprawidłowym wykonaniem testu lub innymi czynnikami o podłożu immunologicznym.
- Dodatni wynik testu QuantiFERON®-TB Gold IT nie powinien stanowić jedynego lub rozstrzygającego czynnika dla postawienia diagnozy: zakażenie *M. tuberculosis*. Nieprawidłowe wykonanie testu może dać wynik fałszywie dodatni.
- Po otrzymaniu dodatniego wyniku testu QuantiFERON®-TB Gold IT należy przedsięwziąć dalsze kroki w zakresie oceny medycznej i diagnostyki laboratoryjnej w celu weryfikacji rozpoznania gruźlicy u pacjenta (np. rozmaz na kwasooporność bakterii, hodowla bakteryjna, badanie rentgenograficzne klatki piersiowej).
- Podczas gdy białka ESAT-6, CFP-10 oraz TB7,7(p4) nie występują u wszystkich szczepów BCG oraz u większości znanych mykobakterii nie wywołujących gruźlicy, możliwe jest, że dodatni wynik testu QuantiFERON®-TB Gold IT może być wywołany zakażeniem *M. kansasii*, *M. szulgai* lub *M. marinum*. Jeśli istnieje podejrzenie takiego zakażenia, należy przeprowadzić testy alternatywne.

## Środki ostrożności

- Dla zastosowania diagnostycznego w warunkach *in vitro*.
- **Szkodliwy roztwór substratu dla enzymu** zawiera 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynam (TMB), która jest szkodliwa w razie połknięcia, wdychania oparów lub wejścia w kontakt ze skórą. Jest substancją drażniącą oczy i skórę oraz mutagenem. Należy stosować gogle ochronne, rękawiczki oraz środki ostrożności jak przy postępowaniu z potencjalnym czynnikiem rakotwórczym.
- **Szkodliwy roztwór zatrzymujący aktywność enzymu** zawiera H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – kwas szkodliwy w razie połknięcia, wdychania oparów, wejścia w kontakt z oczami lub skórą. Należy stosować gogle ochronne, rękawiczki oraz ochronny ubiór laboratoryjny. Jeżeli roztwór zatrzymujący wszedłby w kontakt ze skórą lub oczami, miejsca kontaktu należy przepłukać obfitą ilością wody oraz wezwać lekarza.
- **Szkodliwy wzorzec IFN-γ oraz koniugat 100 x stężony** mogą wywoływać nieprzyjemne doznania w razie połknięcia lub działać drażniąco na skórę. Należy stosować rękawiczki oraz ochronny ubiór laboratoryjny.
- **Należy postępować z krwią ludzką tak, jakby była potencjalnym źródłem zakażenia.** Należy stosować się do wytycznych dotyczących postępowania z krwią.
- **Thimerosal** dodawany jest jako środek konserwujący do niektórych odczynników. Może być toksyczny (zawiera blisko 50% etylortęci) w razie połknięcia, wdychania oparów lub wejścia w kontakt ze skórą.
- **“Zielony rozcieńczalnik”** zawiera surowicę zdrowej myszy oraz białko mleka kazeinę, które mogą wywoływać odczyny alergiczne. Należy unikać kontaktu ze skórą.
- Niestosowanie się do wytycznych podręcznika diagnostycznego może spowodować otrzymanie błędnych wyników. Przed przeprowadzeniem testu należy wnikliwie przeczytać instrukcje.
- Nie używać danego zestawu, gdy przed użyciem którakolwiek butelka z odczynnikami posiada cechy uszkodzenia lub wycieku płynu.
- Nie mieszać odczynników do testu ELISA z odczynnikami innej partii zestawu QuantiFERON®-TB Gold, a także nie używać odczynników z więcej niż jednego zestawu dla przeprowadzenia danego testu.
- Wyrzucić nie zużyte odczynniki oraz próbki biologiczne w zgodzie z przepisami lokalnymi, państwowymi i unijnymi.
- Nie stosować próbek do pobierania krwi ani żadnego z elementów zestawu do testu ELISA po upływie terminu ważności.

## 5. POBIERANIE PRÓBEK ORAZ OBCHODZENIE SIĘ Z NIMI

Test QuantiFERON®-TB Gold IT wykorzystuje następujące próbki do pobierania materiału:

1. Ślepa – kontrola negatywna (szary korek z białym pierścieniem) (do stosowania na wysokości pomiędzy 0 a 810 metrów n.p.m.)
2. “Antygeny gruźlicze” – próba badana (czerwony korek z białym pierścieniem) (do stosowania na wysokości pomiędzy 0 a 810 metrów n.p.m.)
3. Mitogen – kontrola pozytywna – opcja (purpurowy korek z białym pierścieniem) (do stosowania na wysokości pomiędzy 0 a 810 metrów n.p.m.)
4. Ślepa – kontrola negatywna (szary korek z białym pierścieniem) (do stosowania na wysokości pomiędzy 1020 a 1875 metrów n.p.m.)
5. “Antygeny gruźlicze” – próba badana (czerwony korek z żółtym pierścieniem) (do stosowania na wysokości pomiędzy 1020 a 1875 metrów n.p.m.)
6. Mitogen – kontrola pozytywna – opcja (purpurowy korek z żółtym pierścieniem) (do stosowania na wysokości pomiędzy 1020 a 1875 metrów n.p.m.)

Antygeny po wysuszeniu (sublimacyjnym) osadziły się na wewnętrznych ściankach próbek do pobierania krwi, stąd istotne jest, aby zawartość próbek dokładnie wymieszać z krwią. Probówki z materiałem badanym jak najszybciej – najpóźniej w 16 godzin od momentu pobrania krwi – powinny zostać przeniesione do inkubatora (bloku grzejnego z termostatem), w którym została ustalona stała temperatura 37°C.

Dla uzyskania optymalnych efektów należy postępować zgodnie z niżej wymienionymi wytycznymi:

1. Od każdej badanej osoby pobierz po 1 ml krwi przez wkłucie żyłne bezpośrednio do każdej próbki do pobierania krwi QuantiFERON®-TB Gold IT (2 lub 3 x 1 ml / pacjenta).
  - Standardowe próbki do pobierania krwi Standard QuantiFERON® powinny być stosowane na wysokościach do 810 metrów n.p.m. Probówki do pobierania krwi i testów na dużych wysokościach n.p.m. High Altitude (HA) QuantiFERON® powinny być stosowane na wysokościach powyżej 1020 metrów n.p.m.

*W razie stosowania próbek do pobierania krwi QuantiFERON® poza podanymi wyżej zakresami wysokości nad poziomem morza lub gdy zdarzy się pobranie (zbyt) małej ilości krwi, krew można pobierać przy pomocy strzykawki i przenosić po 1 ml do każdej z trzech próbek. Ze względów bezpieczeństwa najlepiej wykonać tę czynność zdjawszy igłę ze strzykawki, przestrzegając przy tym odpowiednich procedur bezpieczeństwa, oraz usunąwszy korki z trzech próbek QFT-Gold IT, dodając po 1 ml krwi do każdej z nich (dopełniając do czarnej kreski z boku etykiety próbki). Bezpiecznie zatkać korkami próbki i wymieszać ich zawartość według poniższego opisu.*

- Ponieważ próbki na 1 ml stosunkowo wolno dają się wypełnić krwią, gdy uznasz, że próbka prawdopodobnie wypełniła się krwią, kontynuuj wypełnianie się próbki jeszcze przez 2-3 sekundy, aby upewnić się, że pobrana została właściwa objętość.

*Czarna linia z boku próbki wyznacza wypełnienie do objętości 1 ml. Probówki do pobierania krwi QuantiFERON®-TB Gold zostały skalibrowane na objętość od 0,8 do 1,2 ml. Jeśli poziom wypełnienia krwią w którejkolwiek próbce nie jest zbliżony do linii kalibracji, zaleca się pobranie innej próbki krwi.*

- Jeżeli do pobierania krwi stosujesz igłę typu “motylek”, najpierw użyj “próbki testową”, aby – zanim użyjesz próbki QuantiFERON®-TB Gold – upewnić się, że rurka wypełniła się krwią.
2. Wymieszaj zawartość każdej próbki, **energicznie wytrząsając próbkę w górę i w dół przez 5 sekund** (lub 10 razy), aby upewnić się, że **cała jej wewnętrzna powierzchnia** została pokryta krwią.

- Dokładne mieszanie jest wymagane dla zapewnienia całkowitego przejścia zawartości na powierzchni ścianek probówki do krwi.
  - Można spodziewać się pienienia się krwi podczas procesu wytrząsania, jakkolwiek fakt ten nie ma wpływu na wynik testu i nie powinien zaprzęcać głowy diagnoście laboratoryjnemu.
3. Odpowiednio opisz probówki (etykiety).
    - Upewnij się, że po usunięciu korka każdą probówkę (Ślepa, “Antygeny gruźlicze”, Mitogen) będzie można zidentyfikować dzięki widniejącej na niej etykiecie (naklejce) lub za pomocą innych sposobów.
  4. Probówki z materiałem badanym jak najszybciej – najpóźniej w 16 godzin od momentu pobrania krwi – muszą zostać przeniesione do inkubatora, w którym została ustalona temperatura 37°C. Przed inkubacją przechowuj probówki w temperaturze pokojowej (22°C ± 5°C). Nie wolno zamrażać próbek krwi ani przechowywać ich w lodówce.

## 6. WYTYCZNE DOTYCZĄCE PRZEPROWADZENIA TESTU

### Etap pierwszy – inkubacja krwi i zebranie osocza

#### Dostarczane materiały

Probówki do pobierania krwi QuantiFERON®-TB Gold IT (patrz rozdział 3).

#### Potrzebny sprzęt laboratoryjny i materiały (lecz nie dostarczane w zestawie)

Patrz rozdział 3.

#### Procedura testowa

1. Jeżeli zaraz po pobraniu krwi nie zostanie poddana inkubacji, należy **przeprowadzić powtórne wymieszanie zawartości probówek tuż przed poddaniem probówek inkubacji**, jak opisano to w rozdziale 5.
2. Inkubować probówki **WYLOTEM KU GÓRZE** w temperaturze 37°C przez 16 do 24 godzin. Inkubator nie wymaga regulacji nasycenia CO<sub>2</sub> lub ustawienia poziomu wilgotności.
3. Po zakończeniu inkubacji w temperaturze 37°C probówki do pobierania krwi można trzymać w temperaturze pomiędzy 2°C a 27°C przez okres do 3 dni przed ich zwirowaniem.
4. Po zakończeniu inkubacji probówek w temperaturze 37°C zebranie osocza jest ułatwione dzięki zwirowaniu zawartości probówek przez 15 minut przy prędkości 2000 do 3000 RCF (g) (RCF – względna siła wirowania). Czop żelowy oddzieli komórki od osocza. Jeśli to nie nastąpi, zawartość probówek należy ponownie zwirować przy wyższej prędkości obrotowej.
  - Możliwe jest zebranie osocza bez zwirowania materiału badanego, jednak wymagana jest wówczas większa ostrożność, by pobrać osocze bez komórek, tzn. nie zaburzając faz rozdziału.
5. Próbkę osocza można bezpośrednio przenieść z probówek do pobierania krwi na płytkę do testu ELISA QuantiFERON®-TB Gold, szczególnie wtedy, gdy używa się automatycznych stacji roboczych do testu ELISA.
6. Alternatywnie próbki osocza można przechowywać przed przeprowadzeniem testu ELISA albo w zwirowanych probówkach, albo w pojemnikach do przechowywania osocza. Przykładowo jeżeli masz zamiar przechowywać próbki, pobierz >150µl osocza i wprowadź je do studzienek mikroplątki (lub mikroprobówek (typu *Eppendorf*) umieszczonych w statywie) w układzie 96 studzienek i przykryj szczelnie, aby zapobiec wylaniu się oraz odparowaniu materiału do badań.
  - Próbkę osocza można przechowywać przez maksymalnie 4 tygodnie w temperaturze 2°C do 8°C lub przez dłuższy czas w temperaturze poniżej -20°C (najlepiej poniżej -70°C).

## Etap drugi – test ELISA ludzkiego IFN- $\gamma$

### Dostarczane materiały

Zestaw odczynników i akcesoriów do testu ELISA QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT (patrz rozdział 3).

### Potrzebny sprzęt laboratoryjny i materiały (lecz nie dostarczane w zestawie)

Patrz rozdział 3.

### Procedura testowa

1. Wszystkie próbki osocza i wszystkie odczynniki, z wyjątkiem koniugatu stężonego 100x, przed użyciem powinny być przeniesione do temperatury pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Pozostaw próbki w tych warunkach przez przynajmniej 60 minut dla uzyskania stabilizacji temperaturowej.
2. Usuń z ramki paski, które nie są potrzebne, ponownie szczelnie przykryj je folią i przenieś z powrotem do lodówki, trzymając je tam aż do momentu, gdy będą potrzebne.

Przynajmniej jeden pasek przeznacz na wzorec QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold, a odpowiednią ilość pasków na próbki, w zależności od liczby testowanych pacjentów (patrz rycina 2A dla metody dwuprobówkowej i 2B dla metody trójprobówkowej). Po wykorzystaniu zachowaj ramkę i wieczko do użycia z pozostałymi paskami.

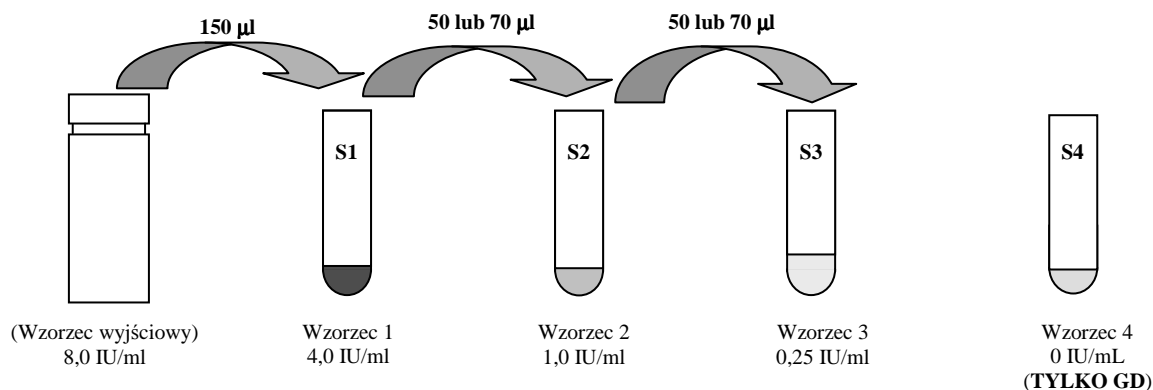
3. Odtwórz liofilizowany wzorec z dostarczonego zestawu testowego przy pomocy destylowanej (dejonizowanej) wody o objętości wskazanej na etykiecie fiolki zawierającej ten wzorec. Łagodnie mieszaj składniki, by zminimalizować tworzenie się piany i zapewnić całkowite rozpuszczenie wzorca. Odtworzenie wzorca w określonej objętości wody da w efekcie roztwór o stężeniu 8,0 IU/ml (IU – jednostki międzynarodowe określające aktywność substancji, nie wskazujące na jej ilość lub masę).

**Uwaga: Objętość odtworzenia wzorca z dostarczanego zestawu będzie różna dla różnych serii prób.**

Użyj odtworzony wzorec (wzorec wyjściowy) w celu uzyskania czterech kolejnych rozcieńczeń IFN- $\gamma$  w stosunku objętościowym 1 część IFN- $\gamma$  w 3 częściach „zielonego rozcieńczalnika” (GD) – patrz rycina 1. S1 (wzorec 1; ang.: S – standard) zawiera 4 IU/ml IFN- $\gamma$ , S2 (wzorec 2) zawiera 1 IU/ml IFN- $\gamma$ , S3 (wzorec 3) zawiera 0,25 IU/ml IFN- $\gamma$ , a S4 (wzorec 4) zawiera 0 IU/ml IFN- $\gamma$  (sam GD). Wzorce powinny być testowane przynajmniej w jednym powtórzeniu.

ZALECANA PROCEDURA DLA WZORCÓW TESTOWANYCH W JEDNYM POWTÓRZENIU	ZALECANA PROCEDURA DLA WZORCÓW TESTOWANYCH W DWÓCH POWTÓRZENIACH
<ol style="list-style-type: none"><li>a. Opisz 4 probówki “S1”, “S2”, “S3”, “S4”.</li><li>b. Dodaj <b>150<math>\mu</math>l</b> GD do S1, S2, S3, S4.</li><li>c. Dodaj <b>150<math>\mu</math>l</b> wzorca wyjściowego do S1 i dokładnie wymieszaj składniki.</li><li>d. Przenieś <b>50<math>\mu</math>l</b> roztworu z S1 do S2 i dokładnie wymieszaj składniki.</li><li>e. Przenieś <b>50<math>\mu</math>l</b> roztworu z S2 do S3 i dokładnie wymieszaj składniki.</li><li>f. <b>Sam GD</b> służy jako ślepa dla wzorca (S4).</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>a. Opisz 4 probówki “S1”, “S2”, “S3”, “S4”.</li><li>b. Dodaj <b>150<math>\mu</math>l</b> GD do S1.</li><li>c. Dodaj <b>210<math>\mu</math>l</b> GD do S2, S3, S4.</li><li>d. Dodaj <b>150<math>\mu</math>l</b> wzorca wyjściowego do S1 i dokładnie wymieszaj składniki.</li><li>e. Przenieś <b>70<math>\mu</math>l</b> roztworu z S1 do S2 i dokładnie wymieszaj składniki.</li><li>f. Przenieś <b>70<math>\mu</math>l</b> roztworu z S2 do S3 i dokładnie wymieszaj składniki.</li><li>g. <b>Sam GD</b> służy jako ślepa dla wzorca (S4).</li></ol>

### RYCINA 1. Sporządzenie krzywej wzorcowej.



- Sporządź świeże rozcieńczenia wzorca wyjściowego dla każdej sesji testu ELISA.
4. Odtwórz liofilizowany koniugat 100x stężony w 0,3 ml wody dejonizowanej (destylowanej). Łagodnie mieszaj składniki, by zminimalizować tworzenie się piany i zapewnić całkowite rozpuszczenie się koniugatu.

“Koniugat o aktywności roboczej” przygotowuje się przez rozcieńczenie wymaganej ilości odtworzonego koniugatu 100x stężonego w “zielonym rozcieńczalniku” według przepisu z tabeli 1 – Sporządzenie koniugatu.

**TABELA 1. Sporządzenie koniugatu.**

LICZBA PASKÓW	OBJĘTOŚĆ KONIUGATU 100x STĘŻONEGO	OBJĘTOŚĆ “ZIEŁONEGO ROZCIEŃCZALNIKA”
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

- Dokładnie mieszaj ze sobą składniki, lecz tak, by uniknąć tworzenia się piany.
  - Zaraz po użyciu przenieś z powrotem cały nie zużyty koniugat 100x stężony do miejsca o temperaturze 2°C do 8°C.
  - Używaj wyłącznie “zielonego rozcieńczalnika”.
5. Przed wykonaniem testu próbki osocza powinny zostać poddane mieszaniu, by upewnić się, że IFN- $\gamma$  został rozprowadzony równomiernie w całej ich objętości.
6. Używając pipety wielokanałowej dodaj po 50µl świeżo sporządzonego “koniugatu o aktywności roboczej” do odpowiednich studzienek mikropłytki do testu ELISA.

7. Używając pipety wielokanałowej dodaj po 50µl testowanych próbek osocza do odpowiednich studzienek mikropłytki (patrz poniżej: zalecane rozmieszczenie na płytce – ryciny 2A i 2B). Na koniec wprowadź po 50µl każdego z wzorców: S1-S4.

**RYCINA 2A. Zalecane rozmieszczenie próbek dla próbek ze ślepą oraz próbek z “antygenami gruźliczymi” (44 testy na płytce).**

	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 (wzorzec 1), S2 (wzorzec 2), S3 (wzorzec 3), S4 (wzorzec 4).
- 1N (próbka nr 1: osocze próby ślepej); 1A (próbka nr 1: osocze z “antygenami gruźliczymi”).

**RYCINA 2B. Zalecane rozmieszczenie próbek dla próbek ze ślepą, próbek z “antygenami gruźliczymi” oraz próbek z mitogenem (28 testów na płytce).**

	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 (wzorzec 1), S2 (wzorzec 2), S3 (wzorzec 3), S4 (wzorzec 4).
  - 1N (próbka nr 1: osocze próby ślepej); 1A (próbka nr 1: osocze z “antygenami gruźliczymi”); 1M (próbka nr 1: osocze z mitogenem – kontrola).
8. Dokładnie zmieszaj koniugat z próbkami osocza/wzorcami przy pomocy wytrząsarki do mikropłytek przez 1 minutę.
9. Przykryj każdą płytkę wieczkiem i inkubuj w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) przez  $120 \pm 5$  minut.
- Podczas inkubacji płytki nie powinny być wystawione na bezpośrednie działanie światła słonecznego.
10. Podczas inkubacji rozcieńcz jedną część objętościową buforu do przepłukiwania 20x stężonego przy pomocy 19 części objętościowych dejonizowanej (destylowanej) wody i zmieszaj dokładnie składniki. Wystarczająca ilość buforu do przepłukiwania 20x stężonego została dostarczona w celu sporządzenia 2 litrów „buforu do przepłukiwania o aktywności roboczej”.

Przynajmniej sześciokrotnie (minimum 6 cykli) przepłucz studzienki 400µl „buforu do przepłukiwania o aktywności roboczej”. Zaleca się stosowanie automatycznej płuczki płytek.

- Dokładne przepłukanie jest bardzo ważne dla prawidłowego wykonania testu. Upewnij się, że każda studzienka została **całkowicie wypełniona** buforem do przepłukiwania aż po sam jej szczyt w każdym cyklu płukania. Zalecany czas nasiąkania wynosi minimum 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami płukania.

- Należy dodać standardowy laboratoryjny środek dezynfekujący do zbiornika na ścieki laboratoryjne oraz wdrożyć procedury dotyczące odkażenia materiału potencjalnie zakaźnego.
11. Usuń resztki buforu do przepłukiwania uderzając górną stroną płytek o ręcznik chłonący cieczę (wyrzepanie mikrokropelek na ręcznik położony na gładkim blacie). Dodaj 100µl roztworu substratu dla enzymu do każdej studzienki i wymieszaj dokładnie zawartość przy pomocy wytrząsarki do mikropłytek.
  12. Przykryj każdą płytkę wieczkiem i inkubuj w temperaturze pokojowej ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) przez 30 minut.
    - Podczas inkubacji płytki nie powinny być wystawione na bezpośrednie działanie światła słonecznego.
  13. Po przeprowadzeniu trzydziestominutowej inkubacji do każdej studzienki dodaj po 50µl roztworu zatrzymującego aktywność enzymu i dokładnie wymieszaj składniki.
    - Roztwór zatrzymujący aktywność enzymu należy dodać do studzienek w tej samej kolejności oraz mniej więcej w tym samym tempie, co substrat z punktu 11.
  14. Przy pomocy czytnika mikropłytek wyposażonego w filtr 450nm oraz filtr referencyjny 620-650nm zmierz gęstość optyczną (OD) każdej studzienki w ciągu 5 minut od momentu zatrzymania reakcji enzymatycznej. Wartości OD służą do obliczeń w celu uzyskania końcowych wyników.

## 7. OBLICZENIA I INTERPRETACJA WYNIKÓW TESTU

Oprogramowanie do analizy QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT stosowane do przetwarzania danych pierwotnych i obliczania końcowych wyników można nabyć w firmie Cellestis.

Oprogramowanie przeprowadza ocenę Kontroli Jakości testu, generuje krzywą wzorcową i podaje wynik testu dla każdego pacjenta, jak zostało to szczegółowo opisane w podrozdziale *Interpretacja wyników*.

Alternatywą dla oprogramowania do analizy QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT jest wyliczenie wyników według poniższej metody.

### Wykreślenie krzywej wzorcowej

*(jeśli nie używa się oprogramowania do analizy QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT)*

Oblicz średnie wartości OD dla powtórzeń kolejnych rozcieńczeń wzorców z każdej płytki.

Wykreśl krzywą wzorcową  $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$  przez naniesienie na wykres wyników logarytmowania o podstawie  $e$  ( $\log_{(e)}$ , gdzie  $e \approx 2,72$ ) średnich wartości OD (oś  $y$ ) w funkcji  $\log_{(e)}$  ze stężeń wzorców IFN- $\gamma$  wyrażonych jako IU/ml (oś  $X$ ), bez uwzględniania w tych obliczeniach wyników ślepej dla wzorca (S4). Za pomocą metody regresji liniowej wyznacz linię najlepszego dopasowania wykresu do otrzymanych z obliczeń punktów doświadczalnych. Linia ta będzie Twoją krzywą wzorcową.

Użyj krzywej wzorcowej do określenia stężeń IFN- $\gamma$  (IU/ml) dla każdej testowej próbki osocza przez ekstrapolację wartości OD każdej próbki badanej.

Obliczenia te można wykonać z pomocą pakietów oprogramowania otrzymywanych przy okazji zakupu czytników mikropłytek oraz za pomocą standardowych arkuszy kalkulacyjnych lub narzędzi informatycznych do analizy statystycznej (jak np. Microsoft Excel). Zalecane jest, aby używać tych pakietów oprogramowania w celu przeprowadzenia analizy metodą regresji, obliczenia współczynnika zmienności (%CV) dla wzorców oraz współczynnika korelacji ( $r$ ) krzywej wzorcowej.

## **Kontrola jakości testu**

Dokładność otrzymanych wyników zależy od starannego wykreślenia krzywej wzorcowej. Stąd wiarygodność wyników uzyskanych na podstawie wzorców koniecznie trzeba sprawdzić przed rozpoczęciem interpretacji wyników dla próbek badanych.

Aby test ELISA uznać za wiarygodny konieczne jest:

- Średnia wartość OD wzorca 1 musi wynosić  $\geq 0,600$ .
- Współczynniki zmienności (%CV) dla wartości powtórzeń wzorca 1 i wzorca 2 muszą wynosić  $\leq 15\%$ .
- Wartości OD powtórzeń dla wzorca 3 i wzorca 4 nie mogą różnić się o ponad 0,040 jednostki gęstości optycznej od ich średnich.
- Współczynnik korelacji (r) wyliczony ze średnich wartości absorbancji wzorców musi wynosić  $\geq 0,98$ .

Oprogramowanie do analizy QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Analysis Software umożliwia obliczenie tych parametrów kontroli jakości i wyświetlenie raportu.

Jeżeli powyższe kryteria nie są spełnione, test należy uznać za nieważny i powtórzyć go.

- Średnia wartość OD ślepej dla wzorca (“zielony rozcieńczalnik”) powinna wynosić  $\leq 0,150$ . Jeśli średnia wartość OD wynosi  $> 0,150$ , należy zweryfikować procedurę płukania płytki.

## Interpretacja wyników

Wyniki testu QuantiFERON®-TB Gold IT interpretowane są z uwzględnieniem następujących kryteriów:

**UWAGA:** Rozpoznanie lub wykluczenie gruźlicy oraz ocena prawdopodobieństwa wystąpienia LTBI wymaga całościowego spojrzenia na wyniki badań epidemiologicznych, lekarskich, diagnostycznych oraz wywiadu z pacjentem, które należy mieć na względzie przy interpretacji wyników testu QuantiFERON®-TB Gold IT.

**GDY UŻYWA SIĘ TYLKO PROBÓWEK Z PRÓBĄ ŚLEPĄ ORAZ PROBÓWEK Z PRÓBĄ BADANĄ (“ANTYGENAMI GRUŹLICZYMI”).**

ŚLEPA [IU/ml]	Próba badan minus ślepa [IU/ml]	QuantiFERON®-TB Wynik	Raport/Interpretacja
≤ 8,0	< 0,35	<b>Ujemny</b>	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> MAŁO prawdopodobne
	≥ 0,35 i < 25% wartości ślepej		
	≥ 0,35 i ≥ 25% wartości ślepej	<b>Dodatni<sup>1</sup></b>	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> prawdopodobne
> 8,0 <sup>2</sup>	Każdy wynik	<b>Nieokreślony<sup>3</sup></b>	Wyniki nieokreślone ze względu na reaktywność “antygenów gruźliczych”

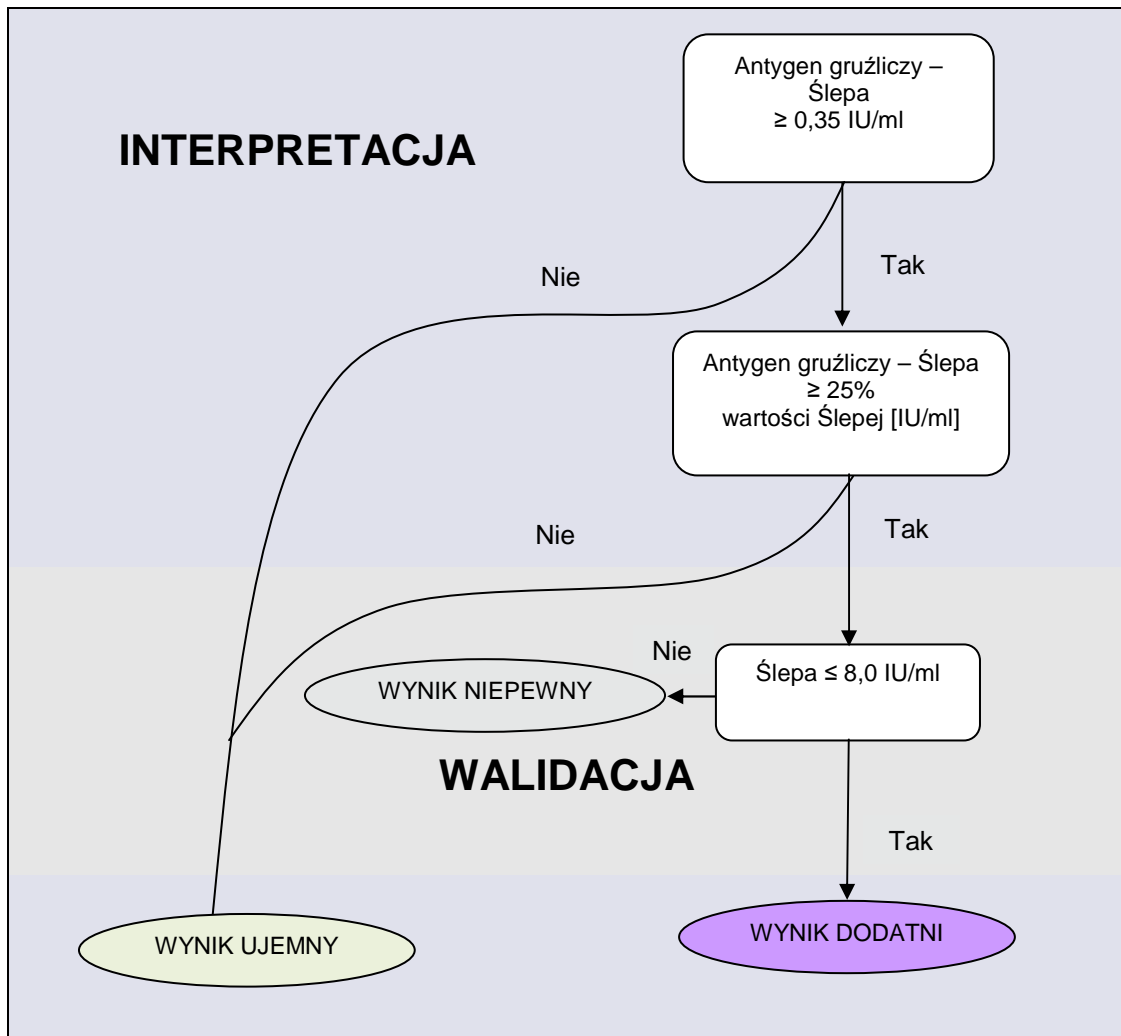
<sup>1</sup> Gdy nie podejrzewa się zakażenia *M. tuberculosis*, wstępne otrzymanie dodatnich wyników testu można potwierdzić/wykluczyć przez powtórne zbadanie tych samych próbek osocza w jednym powtórzeniu za pomocą testu ELISA QuantiFERON®-TB Gold. Gdy powtórny test dla jednej lub obydwu próbek w powtórzeniu daje wynik dodatni, wynik pacjenta należy ostatecznie uznać za dodatni.

<sup>2</sup> W badaniach klinicznych mniej niż 0,25% pacjentów wykazywało stężenie IFN-γ dla próby ślepej wynoszącej > 8,0 IU/ml.

<sup>3</sup> Dla znalezienia ewentualnych przyczyn patrz rozdział *Wykrywanie i eliminowanie problemów*.

Wielkość zmierzonego poziomu IFN-γ nie może być skorelowana z etapem lub stopniem zaawansowania choroby, stopniem odpowiedzi układu odpornościowego czy prawdopodobieństwem (uaktywnienia się zarazków i) rozwoju choroby.

**RYCINA 3.** Interpretacja wyników przedstawiona w formie sieci przepływu, gdy do testu wykorzystywane są próbki ze ŚLEPĄ i próbki z „ANTYGENAMI GRUŻLICZYMI”.



**GDY UŻYWA SIĘ PROBÓWEK Z PRÓBĄ ŚLEPĄ, PROBÓWEK Z PRÓBĄ BADANĄ (“ANTYGENAMI GRUŻLICZYMI”) ORAZ PROBÓWEK Z MITOGENEM.**

Ślepa [IU/ml]	Próba badana minus ślepa [IU/ml]	Mitogen minus ślepa [IU/ml] <sup>1</sup>	QuantiFERON®-TB Wynik	Raport/Interpretacja
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	<b>Ujemny</b>	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> MAŁO prawdopodobne
	≥ 0,35 i < 25% wartości ślepej	≥ 0,5		
	≥ 0,35 i ≥ 25% wartości ślepej	Każdy wynik	<b>Dodatni</b> <sup>2</sup>	Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> prawdopodobne
	< 0,35	< 0,5	<b>Nieokreślony</b> <sup>3</sup>	Wyniki nieokreślone ze względu na reaktywność “antygenów gruźliczych”
≥ 0,35 i < 25% wartości ślepej	< 0,5			
> 8,0 <sup>4</sup>	Każdy wynik	Każdy wynik		

<sup>1</sup> Wyniki odpowiedzi na kontrolę pozytywną zawierającą mitogen (a czasami też na próbkę badaną z “antygenami gruźliczymi”) mogą dość często znajdować się poza zakresem odczytu czytnika mikroplitek. Nie ma to wpływu na wyniki testu.

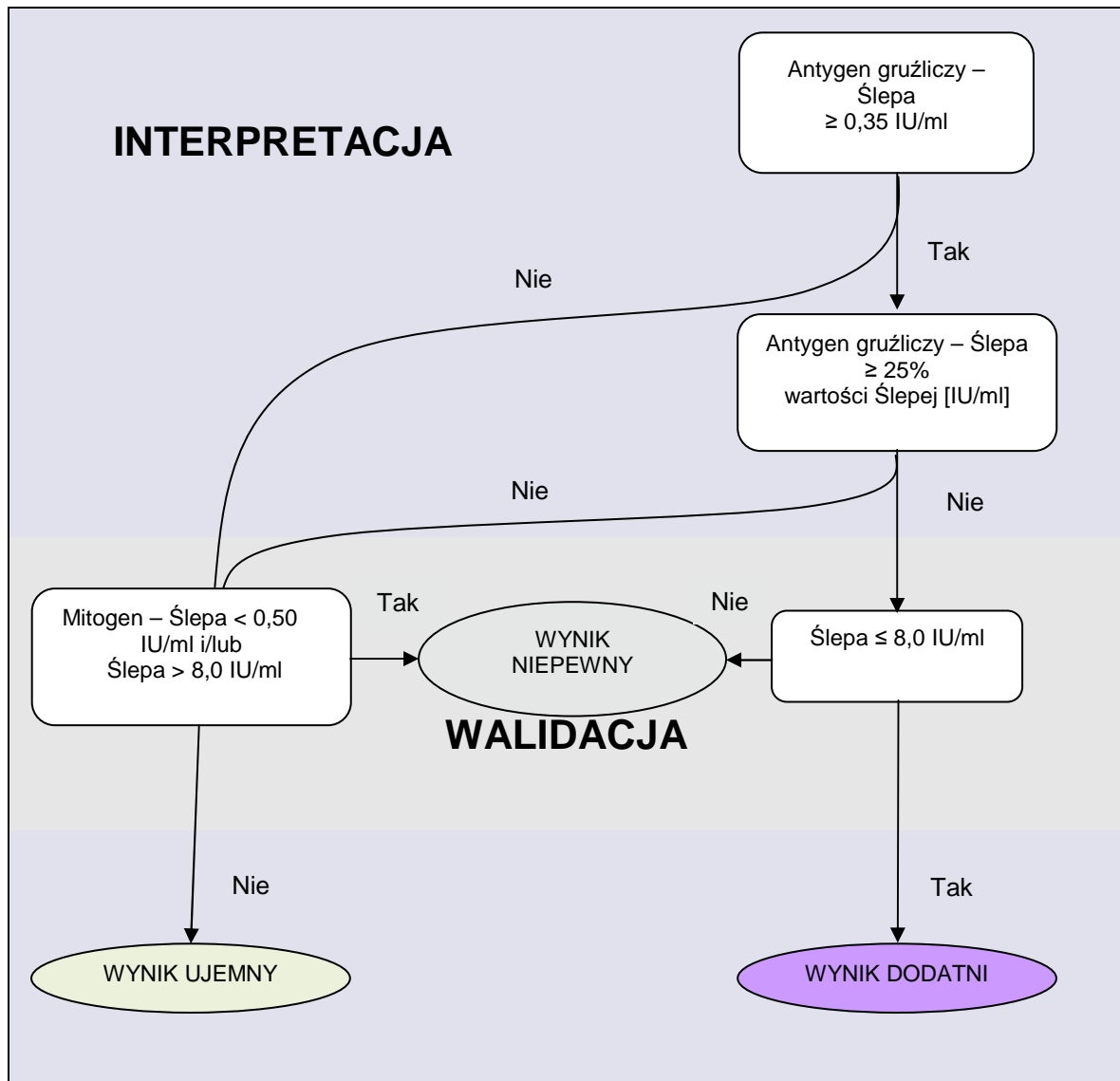
<sup>2</sup> **Gdy nie podejrzewa się zakażenia *M. tuberculosis***, wstępne otrzymanie dodatnich wyników testu można potwierdzić/wykluczyć przez powtórne zbadanie tych samych próbek osocza w jednym powtórzeniu za pomocą testu ELISA QuantiFERON®-TB Gold. Gdy powtórny test dla jednej lub obydwu próbek w powtórzeniu daje wynik dodatni, wynik pacjenta należy ostatecznie uznać za dodatni.

<sup>3</sup> Dla znalezienia ewentualnych przyczyn patrz rozdział *Wykrywanie i eliminowanie problemów*.

<sup>4</sup> W badaniach klinicznych mniej niż 0,25% pacjentów wykazywało stężenie IFN-γ dla próby ślepej wynoszącej > 8,0 IU/ml.

Wielkość zmierzonego poziomu IFN-γ nie może być skorelowana z etapem lub stopniem zaawansowania choroby, stopniem odpowiedzi układu odpornościowego czy prawdopodobieństwem (uaktywnienia się zarazków i) rozwoju choroby.

**RYCINA 4. Interpretacja wyników przedstawiona w formie sieci przepływu, gdy do testu wykorzystywane są próbki ze ŚLEPĄ, próbki z „ANTYGENAMI GRUŻLICZYMI” oraz próbki z MITOGENEM.**



## 8. OGRANICZENIA TESTU

Wyniki testu QuantiFERON®-TB Gold IT powinny być interpretowane w ujęciu całościowym, tj. w zestawieniu z: wywiadem epidemiologicznym z każdym pacjentem, obecnym stanem zdrowia oraz innymi ocenami diagnostycznymi.

Osobom o wartościach wyników dla ślepych wynoszących ponad 8 IU/ml jest przypisywany „wynik testu nieokreślony”, ponieważ reaktywność wyższa o 25% w odpowiedzi na „antygeny gruźlicze” może leżeć poza zakresem pomiarowym testu.

Wystąpienie niewiarygodnych lub nieokreślonych wyników testu może być spowodowane:

- nieprzestrzeganiem instrukcji zawartych w niniejszym podręczniku diagnostycznym,
- obecnością nadmiernych stężeń krążącego we krwi IFN- $\gamma$  lub obecnością obcych przeciwciał,
- czasem dłuższym niż 16 godzin pomiędzy momentem pobrania krwi a rozpoczęciem inkubacji w 37°C.

## 9. CHARAKTERYSTYKA WIARYGODNOŚCI TESTÓW

### Badania kliniczne

Jako że nie istnieje definiowalny wzorec dla utajonego zakażenia prątkami gruźlicy (LTBI), oceny czułości i specyficzności testu QuantiFERON®-TB Gold IT praktycznie nie można wówczas przeprowadzić. Specyficzność testu QuantiFERON®-TB Gold IT została oszacowana w przybliżeniu na podstawie oceny częstości fałszywie dodatnich wyników u osób o niskim ryzyku (braku znanych czynników ryzyka) zapadalności na zakażenie prątkiem gruźlicy. Czułość została oszacowana w przybliżeniu na podstawie oceny grup pacjentów, u których występowanie aktywnej postaci gruźlicy zostało potwierdzone przez posiew.

#### Specyficzność

W badaniu amerykańskim z udziałem 866 ochotników krew pobierano do testu QuantiFERON®-TB Gold IT (QFT-G) przy okazji wykonywania próby tuberkulinowej (TST). W czasie przeprowadzania testu przy pomocy standardowej ankiety uzyskano od pacjentów informacje demograficzne (wiek, płeć itp.) oraz określono czynniki ryzyka wystąpienia u nich gruźlicy. Z 432 ochotników bez znanych czynników ryzyka zakażenia *M. tuberculosis* wyniki testu QuantiFERON®-TB Gold IT oraz TST otrzymano dla 391. Żaden z tych pacjentów nie był nigdy wcześniej szczepiony szczepionką BCG. Drugie badanie specyficzności testu QuantiFERON®-TB Gold IT przeprowadzono w Japonii na pacjentach o niskim ryzyku zakażenia prątkiem gruźlicy, z których około 90% było wcześniej szczepionych szczepionką BCG. Wyniki obydwu badań specyficzności przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2. Specyficzność testu QuantiFERON®-TB Gold IT: wyniki dla osób, u których nie stwierdzono wystąpienia ryzyka zakażenia *M. tuberculosis*.**

BADANIE	% zaszczepionych szczepionką BCG	Całkowita liczba badanych	Liczba wyników nieokreślonych QFT-G	Liczba wyników dodatnich QFT-G / Liczba ważnych testów	Specyficzność QFT-G (95% przedział ufności)	Liczba wyników dodatnich TST / Liczba badanych	Specyficzność TST* (95% przedział ufności)
USA (dane niepublikowane)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (97,6-99,8)	6 / 391	98,5% (96,5-99,4)
Japonia (dane niepublikowane)	~90%	190	4	3 / 186	98,4% (95-99,6)	-	-
<b>SUMA</b>		<b>581</b>	<b>5/584 (0,9%)</b>	<b>6 / 576</b>	<b>99,0%</b>	-	-

\*Biorąc za kryterium przynależności 10mm średnicę zaczerwienienia na skórze dla próby TST. Dla średnicy 15mm ocena specyficzności wynosi 99,1% (silniejsza odpowiedź układu immunologicznego organizmu na podskórne wstrzyknięcie tuberkuliny przy zakażeniach prątkiem gruźlicy).

### Czułość wykrywania aktywnej postaci gruźlicy

Pacjenci z Australii i Japonii, u których podejrzewano gruźlicę, a następnie posiew potwierdził zakażenie *M. tuberculosis*, byli badani w celu oceny czułości testu QuantiFERON®-TB Gold IT. Podczas gdy nie istnieje niepodważalny standardowy test dla stwierdzenia utajonego zakażenia prątkami gruźlicy (LTBI), odpowiednim substytutem jest posiew mikrobiologiczny *M. tuberculosis*, gdyż pacjenci chorzy są z definicji zakażeni. Przed pobraniem krwi do testu QuantiFERON®-TB Gold IT pacjenci zostali poddani leczeniu przez okres krótszy niż 8 dni.

Tabela 3 zawiera zestawienie wyników badań dla dwóch grup pacjentów o dodatnim posiewie *M. tuberculosis*. Całkowita czułość testu QuantiFERON®-TB Gold IT dla wykrycia aktywnej postaci gruźlicy wynosiła 89% (48/54).

**Tabela 3. Test QuantiFERON®-TB Gold IT: pacjenci z zakażeniem *M. tuberculosis* potwierdzonym testem mikrobiologicznym (przez posiew bakteryjny).**

BADANIE		Choroba potwierdzona przez	Liczba wyników dodatnich QFT-G / Liczba ważnych testów	Czułość QFT-G (95% CI)
Badanie wiarygodności testów wśród Japończyków chorych na gruźlicę		Posiew	24 / 27	89% (72-96%)
Badanie wiarygodności testów wśród Australijczyków chorych na gruźlicę	Płucnych	Posiew	7 / 10	70% (40-89%)
	Pozapłucnych		17 / 17	100% (82-100%)
SUMA			48 / 54	89% (78-95%)

### Diagnoza LTBI

Opublikowano wiele badań na temat wiarygodności testu QuantiFERON®-TB Gold IT w różnych populacjach narażonych na ryzyko wystąpienia LTBI. Ważniejsze wyniki wybranych badań przedstawiono w tabeli 4.

**Tabela 4. Wybrane opublikowane badania dotyczące testu QuantiFERON®-TB Gold IT w populacjach zagrożonych wystąpieniem LTBI.**

BADANIE	Całkowita liczba badanych	Wyniki badań
Hinduscy pracownicy służby zdrowia (Pai i wsp. 2005) <sup>26</sup>	726	Ustalenie bardzo wysokiej częstości występowania gruźlicy. 40% QFT-Gold IT-pozytywnych i około 41% TST-pozytywnych przy 10mm. Wysoka zgodność z testem TST, brak wpływu szczepienia BCG na którąkolwiek z grup. Obydwa testy poruszały temat czynników ryzyka związanych z wiekiem oraz okresem pracy w służbie zdrowia.
HIV u Duńczyków (Brock i wsp. 2006) <sup>5</sup>	590	Całkowita częstość występowania LTBI badana testem QFT-Gold IT wynosiła 4,6% (27/590) u osób HIV <sup>+</sup> . Wyniki dodatnie były związane z ryzykiem wystąpienia gruźlicy. Dwoch pacjentów QFT-Gold IT-pozytywnych rozwinęło aktywną postać gruźlicy w przeciągu jednego roku. Odpowiedzi nieokreślone (n = 20; 3,4%) były statystycznie istotnie skorelowane z liczebnością antygenów CD4 <100 / μl.
Hospitalizowane dzieci Dogra i wsp. 2006) <sup>12</sup>	105	Dzieci, u których podejrzewano gruźlicę lub które w przeszłości miały kontakt z gruźlicą były badane testami QFT-Gold IT oraz TST. 10,5% z wynikiem dodatnim w teście QFT-Gold IT, a około 9,5% z wynikiem dodatnim w teście TST przy 10mm. Ogólna zgodność pomiędzy testami wynosiła 95,2%, natomiast 100% w grupie nie szczepionych BCG.
Kontakty wśród Niemców (Diel i wsp. 2006) <sup>11</sup>	309	Testowano bliski kontakt 15 różnych osób, u których podejrzewano chorobę. 51% było szczepionych szczepionką BCG, 27% urodzonych za granicą. 70% szczepionych szczepionką BCG oraz 18% nie szczepionych było TST-pozytywnych (5mm), podczas gdy odpowiednio 9% i 11% było QFT-Gold IT-pozytywnych. QFT-Gold IT był związany z ryzykiem wystąpienia gruźlicy. TST był związany tylko ze szczepieniem BCG.

Istnieje o wiele więcej publikacji na temat wiarygodności mniej czułej wersji testu QuantiFERON®-TB Gold, opartej na antygenie w postaci ciekłej (prekursor dla testu QuantiFERON®-TB Gold IT) oraz wiarygodności samego testu QuantiFERON®-TB Gold IT. Badania te poruszają temat stosowania testu(testów) w związku z przypadkami czynnej gruźlicy<sup>9,11, 19, 25</sup>, stosowania testów u dzieci<sup>6-10, 25, 28</sup>, stosowania testów u nosicieli wirusa HIV<sup>2, 5, 20</sup>, u pracowników służby zdrowia<sup>13, 26, 32</sup>, u osób z immunosupresją<sup>3, 4, 22, 23, 27, 30, 31</sup>, a także u osób z podejrzeniem gruźlicy<sup>7, 8, 10, 18</sup> oraz u ludzi z niskim ryzykiem zachorowalności na tę chorobę<sup>15</sup>.

Powtarzalność oraz wpływ TST na późniejsze przeprowadzanie testu QuantiFERON®-TB Gold

W ramach badania specyficzności testu na populacji amerykańskiej wyodrębniono podgrupę ochotników testowanych pomiędzy 4 a 5 tygodniem od przeprowadzenia na nich pierwszego testu QuantiFERON®-TB Gold IT oraz testu TST. Wyniki dla testu QuantiFERON®-TB Gold IT na podstawie próby 260 badanych były otrzymywane w obydwu wyżej wymienionych momentach, a poziom zgodności pomiędzy nimi wynosił 99,6% (259/260). Wcześniejsze przeprowadzenie próby tuberkulinowej (TST) nie miało wpływu na otrzymywanie dodatnich wyników testu QuantiFERON®-TB Gold IT.

## 10. INFORMACJE NATURY TECHNICZNEJ

### Wyniki nieokreślone

Wyniki nieokreślone powinny zdarzać się dość rzadko i mogą być spowodowane stanem układu immunologicznego badanego pacjenta, ale także mogą być związane z wieloma czynnikami natury technicznej:

- czasem dłuższym niż 16 godzin pomiędzy momentem pobrania krwi a rozpoczęciem inkubacji w 37°C,
- przechowywaniem krwi poza zalecanym zakresem temperatur (22°C ± 5°C),
- zbyt słabym wymieszaniem zawartości probówek do pobierania krwi,
- niedokładnym przepłukaniem płytki do testu ELISA.

Jeśli podejrzewasz, że kwestie natury technicznej przeszkodziły we właściwym pobraniu próbek krwi lub w odpowiednim obchodzeniu się z nimi, powtórz cały test QuantiFERON®-TB Gold IT z użyciem nowej próbki krwi. Można powtórnie przeprowadzić test ELISA stymulowanego osocza, gdy podejrzewa się nieodpowiednie przepłukiwanie studzienek lub inne odchylenia od procedury testowej. Nie należy oczekiwać, że nieokreślone wyniki testu, które są wyrażone jako niskie wartości aktywności IFN-γ dla próbek z miogieniem lub wysokie wartości tej aktywności dla ślepych, uległy by zmianie w przypadku powtórnego przeprowadzenia testu, chyba że wystąpił błąd w teście ELISA. Wyniki nieokreślone należy po prostu przyjąć do wiadomości i przekazać informacje lekarzowi. Lekarz może zdecydować o ponownym pobraniu próbki krwi pacjenta lub – w razie konieczności – o podjęciu innych kroków zaradczych.

### Próbki z osoczem, z którego wyträcił się włóknik

Gdyby po dłuższym czasie przechowywania próbek z osoczem doszło do wytrącenia się włóknika, zwiń próbki, aby zsedymentować skrzepły materiał i ułatwić pipetowanie osocza.

## Rozwiązywanie problemów dotyczących testu ELISA

### Niespecyficzne pochodzenie barwy

MOŻLIWA PRZYCZYNA	ROZWIĄZANIE
Niedokładne przepłukanie płytki.	Co najmniej 6 razy przepłucz płytkę przy pomocy buforu do przepłukiwania o objętości 400µl / studzienkę. W zależności od używanej płuczki może okazać się konieczne ponad 6 cykli płukania. Powinien być zastosowany czas nasiąkania wynoszący minimum 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami płukania.
Krzyżowe zanieczyszczenie studzienek w teście ELISA.	Aby zminimalizować ryzyko, ostrożnie pipetuj i mieszaj próbkę.
Termin ważności zestawu / składników wygasł.	Upewnij się, że korzystasz z zestawu przed terminem wygaśnięcia jego ważności. Zadbaj o to, aby odtworzony wzorzec oraz koniugat 100x stężony były używane w okresie do trzech miesięcy od daty odtworzenia.
Roztwór substratu dla enzymu jest zanieczyszczony.	Wyrzuć substrat, jeśli pojawia się niebieskie zabarwienie. Zadbaj o to, aby stosowane były czyste pojemniki na odczynniki.

### Niskie wartości odczytu gęstości optycznej dla wzorców

MOŻLIWA PRZYCZYNA	ROZWIĄZANIE
Błędne rozcieńczenie wzorca.	Zadbaj o to, aby rozcieńczenia wzorca były prawidłowo sporządzone, zgodnie z instrukcjami z tego podręcznika diagnostycznego.
Błąd pipetowania.	Zadbaj o to, aby pipety były wykalibrowane i używane zgodnie z instrukcjami producenta.
Zbyt niska temperatura inkubacji.	Inkubacja mikropłytek w teście ELISA powinna być przeprowadzana w temperaturze pokojowej: od 17°C do 27°C.
Zbyt krótki czas inkubacji.	Inkubacja płytki z koniugatem, wzorcami i próbkami powinna trwać 120 ± 5 minut. Roztwór substratu dla enzymu należy inkubować na płytce przez 30 minut.
Zastosowano nieodpowiedni filtr czytnika płytek.	Płytkę trzeba odczytać przy filtrze o długości fali 450nm i filtrze odniesienia o długości fali z zakresu 620-650nm.
Odczynniki są zbyt zimne.	Wszystkie odczynniki, z wyjątkiem koniugatu 100x stężonego, przed rozpoczęciem testu należy przechowywać w temperaturze pokojowej. Zajmuje to około jedną godzinę.
Termin ważności zestawu / składników wygasł.	Upewnij się, że korzystasz z zestawu przed terminem wygaśnięcia jego ważności. Zadbaj o to, aby odtworzony wzorzec oraz koniugat 100x stężony były używane w okresie do trzech miesięcy od daty odtworzenia.

Wysokie tło

MOŻLIWA PRZYCZYNA	ROZWIĄZANIE
Niedokładne przepłukanie płytki.	Co najmniej 6 razy przepłucz płytkę przy pomocy buforu do przepłukiwania o objętości 400µl / studzienkę. W zależności od używanej płuczki może okazać się konieczne ponad 6 cykli płukania. Powinien być zastosowany czas nasiąkania wynoszący minimum 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami płukania.
Zbyt wysoka temperatura inkubacji.	Inkubacja mikropłytek w teście ELISA powinna być przeprowadzana w temperaturze pokojowej: od 17°C do 27°C.
Termin ważności zestawu / składników wygasł.	Upewnij się, że korzystasz z zestawu przed terminem wygaśnięcia jego ważności. Zadbaj o to, aby odtworzony wzorzec oraz koniugat 100x sężony były używane w okresie do trzech miesięcy od daty odtworzenia.
Roztwór substratu dla enzymu jest zanieczyszczony.	Wyrzuć substrat, jeśli pojawia się niebieskie zabarwienie. Zadbaj o to, aby stosowane były czyste pojemniki na odczynniki.

Nieliniowy przebieg krzywej wzorcowej oraz zmienność w obrębie powtórzeń

MOŻLIWA PRZYCZYNA	ROZWIĄZANIE
Niedokładne przepłukanie płytki.	Co najmniej 6 razy przepłucz płytkę przy pomocy buforu do przepłukiwania o objętości 400µl / studzienkę. W zależności od używanej płuczki może okazać się konieczne ponad 6 cykli płukania. Powinien być zastosowany czas nasiąkania wynoszący minimum 5 sekund pomiędzy kolejnymi cyklami płukania.
Błędne rozcieńczenie wzorca.	Zadbaj o to, aby rozcieńczenia wzorca były prawidłowo sporządzone, zgodnie z instrukcjami z tego podręcznika diagnostycznego.
Za słabe wymieszanie składników.	Wymieszaj dokładnie odczynniki przez kilkukrotne odwracanie buteleczki / probówki z odczynnikiem lub łagodne wytrząsanie (przy pomocy urządzenia typu <i>vortex</i> ) przed wprowadzeniem ich na płytkę.
Niekonsekwentna technika pipetowania lub przerwa podczas przeprowadzania testu.	Wprowadzanie próbki i wzorca powinno odbywać się w sposób ciągły. Wszystkie odczynniki należy przygotować przed rozpoczęciem testu.

Film wideo z opisem procedury testowej oraz rozwiązania większości problemów natury technicznej można znaleźć na płycie CD zatytułowanej *Product Information and Technical Guide* (Informacje dotyczące produktu i przewodnik techniczny), która jest dostępna bezpłatnie bezpośrednio u producenta (w firmie Cellestis) lub przez dystrybutorów.

## 11. BIBLIOGRAFIA

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

1. **Andersen, P., et al.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. **Balcells, M.E., et al.** A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis.* 2008. 12; 645-52.
3. **Bartalesi, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2008. [Epub ahead of print].
4. **Bocchino, M., et al.** Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008. 27; 907-13.
5. **Brock, I., et al.** Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res.* 2006. 7; 56.
6. **Chun, J.K., et al.** The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008. [Epub ahead of print].
7. **Connell, T.G., et al.** A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. **Detjen, A.K., et al.** Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007. 45; 322-8.
9. **Diel, R., et al.** Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2008. [Epub ahead of print].
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- $\gamma$  assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2008. [Epub ahead of print].
17. **Kang, Y.A., et al.** Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA.* 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.
22. **Manuel, O., et al.** Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007. 7; 2797-801.

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

## 12. POMOC TECHNICZNA

Dla uzyskania pomocy technicznej prosimy o kontakt z:

Cellestis International Pty Ltd:      Telefon: +61 3 9571 3500  
Faks: +61 3 9571 3544  
E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)  
Witryna internetowa: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Cellestis GmbH:                      Telefon: +49 6151 428 59 - 0  
(Europa)                                Faks: +49 6151 428 59 - 110  
E-mail: [europe@cellestis.com](mailto:europe@cellestis.com)

## 13. SKRÓCONY OPIS PROCEDURY TESTOWEJ

### ETAP 1 – INKUBACJA KRWI

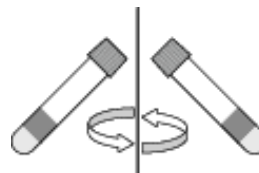
1. Pobierz krew pacjentów do probówek do pobierania krwi i wymieszaj zawartość probówek, **energicznie wytrząsając probówki w górę i w dół przez 5 sekund (lub 10 razy)**, aby upewnić się, że **cała ich wewnętrzna powierzchnia** została pokryta krwią.



2. Inkubuj probówki **wylotem ku górze** w temperaturze 37°C przez 16 do 24 godzin.



3. Po zakończeniu inkubacji zwirowuj zawartość probówek przez 5 do 15 minut przy prędkości 2000 do 3000 RCF (g) (RCF – względna siła wirowania).



4. Po zwirowaniu materiału z każdej probówki zbierz próbkę osocza w celu określenia zawartości IFN- $\gamma$ .



## ETAP 2 – TEST ELISA NA WYKRYCIE IFN- $\gamma$

1. Zrównoważ składniki testu ELISA, z wyjątkiem koniugatu 100x stężonego, przenosząc je do temperatury pokojowej na co najmniej 60 minut.

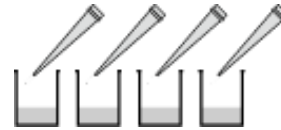


2. Odtwórz wzorzec z dostarczonego zestawu przy użyciu destylowanej (dejonizowanej) wody tak, by uzyskać wyjściowe stężenie wzorca wynoszące 8,0 IU/ml. Sporządź cztery rozcieńczenia wzorca (S1-S4).

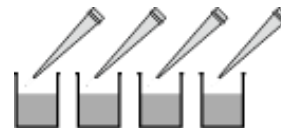


3. Odtwórz liofilizowany koniugat 100x stężony za pomocą destylowanej (dejonizowanej) wody.

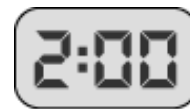
4. Sporządź „koniugat o aktywności roboczej” w „zielonym rozcieńczalniku” i dodaj po 50 $\mu$ l tak sporządzonego roztworu do każdej ze studzienek.



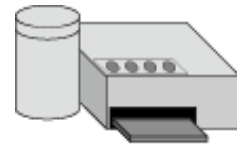
5. Dodaj po 50 $\mu$ l próbek badanego osocza oraz po 50 $\mu$ l wzorca do odpowiednich studzienek. Wymieszaj zawartość studzienek za pomocą wytrząsarki.



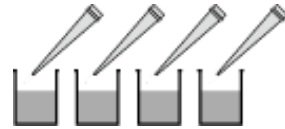
6. Inkubuj mikropłytki z wprowadzonym materiałem przez 120 minut w temperaturze pokojowej.



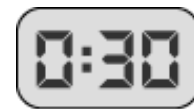
7. Przynajmniej 6 razy przepłucz studzienki buforem do przepłukiwania w ilości 400 $\mu$ l / studzienkę.



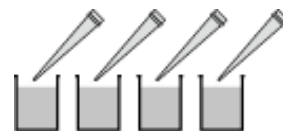
8. Dodaj do studzienek po 100 $\mu$ l roztworu substratu dla enzymu. Wymieszaj zawartość studzienek za pomocą wytrząsarki.



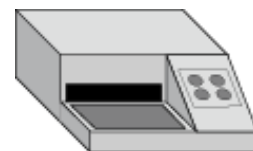
9. Inkubuj mikropłytki z wprowadzonym materiałem przez 30 minut w temperaturze pokojowej.



10. Do każdej studzienki dodaj po 50 $\mu$ l roztworu do zatrzymania aktywności enzymu. Wymieszaj zawartość studzienek za pomocą wytrząsarki.



11. Odczytaj wyniki przy 450nm dla filtra odniesienia 620-650nm.



12. Przeprowadź analizę wyników.





Wyprodukowano dla:  
Cellestis Limited (Australia) oraz Cellestis GmbH (Europa)  
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia  
Telefon: +61 3 9571 3500 (Australia), +49 6151 428 59-0 (Europa)  
E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)  
Witryna internetowa: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Nr dokumentu: 05990301C  
August 2009



EC	REP
----	-----

MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover  
Germany