

QuantiFERON[®] - TB **Gold**

**Test IFN-gamma al sângelui integral
cu măsurarea reacțiilor la antigenele peptidice
ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p.4)**

Prospect

Utilizare pentru diagnostic *In Vitro*



CUPRINS

1. SCOPUL UTILIZĂRII	3
2. EXPUNERE SUMARĂ ȘI EXPLICAȚIA TESTULUI	3
Principiile testării	5
Timpul necesar pentru efectuarea testării	5
3. REACTIVII ȘI MODUL DE PĂSTRARE	6
Materiale necesare (neincluse în setul de livrare)	6
Instrucțiuni de păstrare	7
Tuburile de colectare a sângelui	7
Reactivii Kit-ului	7
Reactivii reconstituiți și neutilizați	7
4. AVERTIZĂRI ȘI PRECAUȚII	8
Avertizări	8
Precauții	9
5. COLECTAREA ȘI MANIPULAREA PROBEI	10
6. INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE	11
STADIUL ÎNTĂI – Incubarea sângelui și recoltarea plasmei	11
STADIUL DOI – IFN- γ Uman - ELISA	12
7. CALCULE ȘI INTERPRETAREA TESTULUI	16
Obținerea curbei standard	16
Controlul calității testului	17
Interpretarea rezultatelor	18
8. LIMITĂRI	22
9. CARACTERISTICILE PERFORMANȚEI	22
10. INFORMAȚII TEHNICE	25
Rezultate nedefinite	25
Probele de plasmă coagulată	25
Remediarea erorilor ELISA	26
Dezvoltarea nespecifică a colorației	26
Rezultate de măsurare a densității optice scăzute pentru standarde	26
Background ridicat	27
Curba standard neliniară și variabilitatea duplicatului	27
11. BIBLIOGRAFIE	28
12. SERVICE ȘI SUPTOR TEHNIC	30
13. PROCEDURA DE TESTARE PE SCURT	31
14. MODIFICĂRI SEMNIFICATIVE	36

1. SCOPUL UTILIZĂRII

QuantiFERON[®]-TB Gold In Tube (QFT) este un test pentru diagnostic *in vitro*, care utilizează un cocktail de peptide pentru proteinele ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4) pentru a stimula celulele din întreg sângele heparinizat. Detectarea γ -interferonului (IFN- γ) prin intermediul testului ELISA cu imunosorbent legat de enzime (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) este utilizată pentru identificarea reacțiilor *in vitro* la aceste antigene peptide care sunt asociate cu infecția cu *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT este un test indirect pentru infecția cu *M. tuberculosis* (inclusiv boala) și este destinat utilizării în asociație cu măsurile de evaluare a riscului, radiografiere și alte analize medicale și procedee de diagnosticare.

2. EXPUNERE SUMARĂ ȘI EXPLICAȚIA TESTULUI

Tuberculoza este o boală transmisibilă, cauzată de infecția cu organismele complexe *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), care în mod normal se transmite la noi gazde, prin picături ce conțin nucleii care se ajung în aer de la pacienții cu tuberculoză respiratorie. Un individ recent infectat se poate îmbolnăvi de tuberculoză în decurs de săptămâni până la luni, dar majoritatea indivizilor infectați rămân în stare de infecție latentă. Infecția latentă cu tuberculoză (ILTB), o stare asimptomatică netransmisibilă, persistă la unii indivizi, care pot dezvolta boala de tuberculoză mai târziu, după luni sau ani. Scopul principal al diagnosticării ILTB este de a se lua în considerare tratamentul medical pentru prevenirea tuberculozei. Până nu de mult, testul dermatologic de tuberculină (TDT) a fost singura metodă disponibilă pentru diagnosticarea ILTB. Sensibilitatea cutanată la tuberculină apare de la 2 până la 10 săptămâni după infectare. Oricum, unii indivizi infectați, incluzând pe aceia cu o gamă variată de boli secundare ce împiedică funcțiile imunitare dar, de asemenea, și ceilalți fără această gamă variată de boli secundare, nu răspund la tuberculină. Dimpotrivă, unii indivizi - pentru care este puțin probabil să fie infectați cu *M. tuberculosis* - manifestă sensibilitate la tuberculină și au rezultate TDT pozitive după vaccinarea cu bacil Calmette-Guérin (BCG), infecție cu micobacterii, altele decât complexul *M. tuberculosis*, sau alți factori nedeterminați.

ILTB trebuie deosebită de boala de tuberculoză, o stare care poate fi diagnosticată care, de obicei, implică plămânii și tractul respirator inferior, deși și alte sisteme de organe pot fi, de asemenea, afectate. Boala de tuberculoză este diagnosticată pe baza rezultatelor istorice, fizice, radiologice, histologice și micobacteriologice.

Testul QFT este un test pentru reacțiile celulare imun-mediate (CIM) la antigenele peptidice care stimulează proteinele micobacteriene. Aceste proteine, ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4), sunt absente din toate tulpinile bacteriene BCG și din majoritatea micobacteriilor non-tuberculoză, cu excepția *M. kansasii*, *M. szulgai* și *M. marinum*.¹ Indivizii infectați cu organismele complexului *M. tuberculosis* prezintă în sânge de obicei limfocite, care le recunosc pe acestea și alte antigene micobacteriene. Acest proces de recunoaștere implică generarea și secreția citokinei, IFN- γ . Detectarea și cuantificarea ulterioară a IFN- γ stă la baza acestui test.

Antigenele utilizate în testul QFT sunt un cocktail de peptide ce simulează proteinele ESAT-6, CFP-10 și TB7.7 (p4). Numeroase studii au demonstrat că aceste antigene peptide stimulează reacțiile IFN- γ în celulele T ale indivizilor infectați cu *M. tuberculosis*, dar în general nu la persoanele neinfectate sau la cele vaccinate cu BCG fără boală sau risc de ILTB.¹⁻³⁴ Oricum, tratamentele medicale sau bolile secundare care reduc funcționalitatea imunitară pot reduce potențial reacțiile IFN- γ . Pacienții cu alte anumite infecții micobacteriene pot reacționa de asemenea la ESAT-6, CFP-10 și TB7.7 (p4), deoarece genele care codifică aceste proteine sunt prezente în *M. kansasii*, *M. szulgai* și *M. marinum*.^{1,22} Testul QFT este un test pentru ILTB, cât și un ajutor prețios pentru diagnosticarea infecției complexe cu *M. tuberculosis* la pacienții bolnavi. Un rezultat pozitiv susține diagnosticul de boală de tuberculoză; oricum, infecțiile cu alte micobacterii (de ex., *M. kansasii*) pot de asemenea să determine rezultate pozitive. Pentru confirmarea sau infirmarea ipotezei unei boli de tuberculoză sunt necesare alte metode de analiză medicală și de diagnosticare.

Principiile testării

Sistemul QFT utilizează tuburi specializate de colectare a sângelui, care sunt utilizate pentru colectarea sângelui integral. Incubarea sângelui are loc în tuburi, timp de 16 până la 24 de ore, după care plasma este recoltată și testată pentru prezența IFN- γ , produs ca reacție la antigenele peptide.

Testul QFT este efectuat în două etape. Întâi, sângele integral este colectat în fiecare din tuburile QFT de colectare a sângelui, care includ un tub de control Nil, un tub Antigen TB și un tub Mitogen, opțional.

Tubul Mitogen poate fi utilizat cu testul QFT, ca un control pozitiv. Acesta poate fi în special util în cazul în care există un dubiu referitor la starea imunității individului. Tubul Mitogen servește, de asemenea, ca un control pentru corecta manipulare și incubare a sângelui.

Tuburile trebuie incubate la 37°C cât mai repede posibil, în decurs de 16 ore de la colectare. După o perioadă de incubare de 16 până la 24 de ore, tuburile sunt centrifugate, plasma este îndepărtată, iar cantitatea de IFN- γ (UI/mL) este măsurată cu ajutorul testului ELISA.

Un test este considerat pozitiv la reacția IFN- γ la tubul Antigen TB dacă depășește semnificativ valoarea IFN- γ UI/mL din tubul Nil. Dacă este utilizată, proba de plasmă Mitogen-stimulată servește ca un control pozitiv de IFN- γ pentru fiecare preparat testat. O reacție scăzută la Mitogen (<0,5 UI/mL) indică un rezultat nedeterminat atunci când o probă de sânge are de asemenea o reacție negativă la antigenele TB. Acest model poate apărea cu limfocite insuficiente, datorită activității limfocitare reduse ca urmare a manipulării necorespunzătoare a probei, datorită umplerii/omogenizării incorecte a tubului Mitogen, sau a incapacității limfocitelor pacientului de a produce IFN- γ . Proba Nil ajustează fundalul, efectele anticorpului heterofil, sau IFN- γ nespecific în probele de sânge. Concentrația IFN- γ din tubul Nil este scăzută din concentrația IFN- γ din tubul Antigen TB și tubul Mitogen (dacă este utilizat).

Timpul necesar pentru efectuarea testării

Timpul necesar pentru efectuarea testului QFT este estimat mai jos; timpul testării probelor multiple dacă sunt numărate este, de asemenea, indicat:

Incubarea tuburilor cu sânge la 37°C:	16-24 ore
ELISA:	Aprox. 3 ore pentru o placă ELISA (28 până la 44 indivizi)
	• <1 oră de muncă
	• Se adaugă 10-15 minute pentru fiecare placă suplimentară

3. REACTIVII ȘI MODUL DE PĂSTRARE

Tuburile de colectare a sângelui cu tuberculoză și antigen de control

Număr de catalog: T0590 0301

1. Control Nil (capac gri)	100 x tuburi
2. Antigen TB (capac roșu)	100 x tuburi
3. Control Mitogen (capac mov)	100 x tuburi

NOTĂ: Tuburile sunt disponibile și în alte configurații:

Nr.de catalog T0590-0201: 100 x Control Nil, 100 x tuburi cu Antigen TB.

Nr.de catalog. T0593 0201: 100 x tuburi cu Control Mitogen.

Tuburi pentru înaltă altitudine (a se vedea secțiunea 5)

Nr.de catalog T0590 0501: (Altitudine înaltă) 100 x Control Nil, 100 x tuburi Antigen TB.

Nr.de catalog T0590 0505: (Altitudine înaltă) 100 x Control Nil, 100 x Antigen TB & 100 x tuburi Mitogen.

Nr. De catalog T0593 0501 (Altitudine înaltă) 100 x tuburi Control Mitogen.

Componenete ELISA

Componențe ELISA	Nr. catalog: 0594-0201	Nr. catalog: 0594-0501
	Kit 2 plăci	Material de laborator de referință
Stripuri microplăci acoperite cu anticorpi monoclonali de șoarece anti-human IFN- γ	2 x plăci cu 96 godeuri	20 x plăci cu 96 godeuri
Standard human IFN- γ , liofilizat (conține IFN- γ human recombinant, cazeină bovine, 0.01 % w/v Thimerosal)	1 x flacon (8 IU/mL în stare reconstituită)	10 x flacon (8 IU/mL în stare reconstituită)
Diluant Verde (conține cazeină bovine, ser normal de șoarece, 0.01% w/v Thimerosal)	1 x 30 mL	10 x 30 mL
Concentrat de Conjugat 100X, liofilizat (IFN- γ HRP anti-uman de șoarece, conține 0.01% w/v Thimerosal)	1 x 0.3mL (în stare reconstituită)	10 x 0.3mL (în stare reconstituită)
Concentrat Tampon Apă 20X (pH 7.2, conține 0.01 % w/v Thimerosal)	1 x 100mL	10 x 100mL
Soluție Substrat Enzică (conține H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' Tetrametilbenzidină)	1 x 30mL	10 x 30mL
Soluție de Oprire a Enzimei (conține 0.5M H ₂ SO ₄)	1 x 15mL	10 x 15mL

Materiale necesare (neincluse în setul de livrare)

- Incubator 37°C. CO₂ nu este necesar.
- Pipete calibrate de volum variabil pentru eliberarea a 10 µL până la 1000 µL, cu vârful de unică folosință.
- Pipetă multicanal calibrată, având capacitatea să elibereze 50 µL și 100 µL, cu vârful de unică folosință.
- Omogenizator microplacă.
- Apă deionizată sau distilată - 2L.
- Spălător microplacă (este recomandat spălător automat).
- Cititor microplacă cuplat cu filtrul 450nm și 620nm la filtrul de referință 650nm.

Instrucțiuni de păstrare

Tuburile de colectare a sângelui

- Tuburile de colectarea a sângelui se păstrează la o temperatură cuprinsă între 4°C și 25°C.

Reactivii Kit-ului

- Kit-ul se păstrează la frigider, la o temperatură cuprinsă între 2°C și 8°C.
- A se feri întotdeauna Soluția Substrat Enzimă de lumina solară directă.

Reactivii reconstituiți și neutilizați

Pentru instrucțiuni privind modul de reconstituire a reactivilor, vă rugăm să consultați Secțiunea 6 (pagina 13).

- Kit-ul Standard reconstituit poate fi păstrat până la 3 luni, dacă este păstrat la o temperatură cuprinsă între 2°C și 8°C.

° *Notați data la care Kit-ul Standard a fost reconstituit.*

- Odată reconstituit, Concentratul Conjugat 100X neutilizat trebuie păstrat în continuare la o temperatură cuprinsă între 2°C și 8°C și trebuie, de asemenea, utilizat în decurs de 3 luni.

° *Notați data la care Conjugatul a fost reconstituit.*

- Concentrația de lucru a Conjugatului trebuie utilizată în decurs de 6 ore de la preparare.
- Concentrația de lucru a Apei Tampon poate fi păstrată la temperatura camerei până la 2 săptămâni.

4. AVERTIZĂRI ȘI PRECAUȚII

Avertizări

- Un rezultat negativ al testului QFT nu exclude posibilitatea infecției cu *M. tuberculosis* sau a bolii de tuberculoză: rezultatele fals-negative pot fi datorate stadiului infecției (de ex., proba obținută înainte de apariția reacției imunitare față de celule), condiții comorbide care afectează funcțiile imunitare, incorecta manipulare a tuburilor de colectare a sângelui după venopunctură, efectuarea incorectă a testului, sau alte variabile imunologice.
- Un rezultat pozitiv al testului QFT nu trebuie să reprezinte baza unică și definitivă pentru determinarea infecției cu *M. tuberculosis*. Efectuarea incorectă a testului poate determina răspunsuri fals pozitive.
- Un rezultat pozitiv al testului QFT trebuie urmat de analize medicale ulterioare și o evaluare a diagnosticului pentru boala activă de tuberculoză (de ex., frotiu și cultură AFB, radiografie pulmonară).
- În timp ce ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4) sunt absente din toate tulpinile BCG și din majoritatea micobacteriilor ne-tuberculoase cunoscute, este posibil ca un rezultat pozitiv al testului QFT să poată fi datorat infecției cu *M. kansasii*, *M. szulgai* sau *M. marinum*. Dacă sunt suspectate astfel de infecții, trebuie efectuate teste alternative.

Precauții

- **Test pentru diagnosticare *in vitro*.**
- **Dăunător: Soluția Substrat de Enzimă** conține 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidină, care este dăunătoare prin ingestie, inhalare sau la contactul cu pielea. Iritantă pentru piele și ochi. Mutagenă. Utilizați măsuri de protecție a ochilor, purtați mănuși și manipulați soluția ca un potențial carcinogen.
- **Dăunător: Soluția de Oprire a Enzimei** conține H₂SO₄, care este dăunător prin ingestie, la contactul cu ochii, contactul cu pielea și prin inhalare. Utilizați măsuri de protecție a ochilor, purtați mănuși și utilizați echipamentul de laborator pentru protecție. Dacă soluția de Oprire a Enzimei intră în contact cu pielea sau cu ochii, spălați bine cu apă zona afectată cu apă și apoi consultați medicul.
- **Dăunător: IFN- γ Standard și Concentratul Conjugat 100X** pot produce disconfort dacă sunt ingerate și pot produce iritații ale pielii. Purtați mănuși și utilizați echipamentul de laborator pentru protecție.
- **Manipulați sângele uman ca și cum ar fi potențial infecțios.** Țineți seama de regulile relevante de manipulare a sângelui.
- **Timerosalul** este utilizat ca și conservant în unii reactivi. El poate fi toxic după ingestie, inhalare sau la contactul cu pielea.
- **Diluantul Verde** conține în mod normal ser obținut de la șoareci și cazeină, care poate declanșa reacții alergice; evitați contactul cu pielea.
- Abaterile de la modul de utilizare specificat în Prospect pot determina obținerea de rezultate eronate. Vă rugăm să citiți cu atenție instrucțiunile înainte de utilizarea testului.
- Nu utilizați kit-ul dacă vreunul din flacoanele cu reactivi prezintă semne de deteriorare sau scurgere înainte de utilizarea acestora.
- Nu amestecați sau nu utilizați reactivi ELISA din alte serii de kit-uri QFT.
- Eliminați reactivii neutilizați și probele biologice conform reglementărilor locale naționale și federale.
- Nu utilizați tuburile de colectare a sângelui sau kit-ul ELISA kit după data de expirare.
- Asigurați-vă că echipamentul de laborator cum ar fi spălătorul de microplacă și cititorul de microplacă au fost calibrate și autorizate spre funcționare.

5. COLECTAREA ȘI MANIPULAREA PROBEI

Testul QFT utilizează următoarele tuburi de colectare:

1. Control Nil (Capac gri cu inel alb) (a se utiliza între nivelul mării și 810m)
2. Antigen TB (Capac roșu cu inel alb) (a se utiliza între nivelul mării și 810m)
3. Control Mitogen - opțional (Capac mov cu inel alb) (a se utiliza între nivelul mării și 810m)

4. Control Nil (Capac gri cu inel galben) (a se utiliza între 1020m și 1875m)
5. Antigen TB (Capac roșu cu inel galben) (a se utiliza între 1020m și 1875m)
6. Control Mitogen - opțional (Capac mov cu inel galben) (a se utiliza între 1020m și 1875m)

Antigenele au fost uscate în peretele interior al tuburilor de colectare a sângelui, astfel încât este esențial ca, conținutul tuburilor să fie omogenizat temeinic cu sângele. Tuburile trebuie transferate într-un incubator la 37°C, cât mai repede posibil, maxim 16 ore de la colectare.

Pentru obținerea rezultatelor optime, trebuie respectate următoarele proceduri:

1. Pentru fiecare subiect se colectează 1mL de sânge prin venopunctură, direct în fiecare tub de colectare a sângelui din testul QFT. Colectarea de sânge trebuie efectuată de către un cadru medical specializat.
 - Tuburile standard de colectare a sângelui QFT trebuie utilizate la o altitudine de 810 metri. Tuburile de colectare a QFT de înaltă altitudine (HA) trebuie utilizate la altitudini cuprinse între 1020 și 1875 metri.

Dacă tuburile de colectare a sângelui QFT se vor utiliza în afara acestor domenii de altitudine sau dacă apare un volum redus de extragere a sângelui, sângele poate fi colectat cu ajutorul unei seringi și 1mL poate fi transferat către fiecare dintre cele trei tuburi. Din motive de siguranță, acest lucru se poate executa în cel mai bun mod cu puțință dacă se înlătură acul seringii, se asigură proceduri adecvate de siguranță, se îndepărtează capacele de la cele trei tuburi QFT și dacă se adaugă 1mL de sânge fiecărui tub (până la însemnul negru de pe partea laterală a etichetei tubului). Puneți capacele în mod sigur și amestecați așa cum se descrie mai jos.

- Deoarece din tuburile de 1mL sângele se extrage relativ încet, păstrați tubul în ac timp de 2-3 secunde după ce tubul pare să fie complet umplut, pentru a fi siguri că este extras volumul corect.

Semnul negru pe o parte a tuburilor indică volumul de umplere de 1mL. Tuburile de colectare a sângelui testului QFT au fost validate pentru volume de la 0,8 până la 1,2mL. Dacă nivelul sângelui în oricare tub nu este aproape de linia indicatoare, se recomandă să se obțină o altă probă de sânge.

- Dacă se utilizează un “ac fluture” pentru colectarea sângelui, trebuie utilizat un tub “de purjare”, pentru a asigura că tubul este umplut cu sânge înainte ca tuburile QFT să fie utilizate.

2. Imediat după umplere agitati-le ferm de mai multe ori (10 ori), pentru a fi sigur că **întreaga suprafață interioară a tubului** a fost acoperită cu sânge pentru a dizolva antigenele de pe pereții tubului.
 - Tuburile trebuie să aibe o temeperatură cuprinsă între 17 – 25 °C în momentul umplerii cu sânge.
 - Agitarea prea puternică poate duce la lezarea gelului și la rezultate aberante.
3. Etichetați adecvat tuburile.
4. Tuburile trebuie transferate în incubator la $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ cât mai repede posibil și în decurs de 16 ore de la colectare. Înainte de incubare, mențineți tuburile la temperatura camerei ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Nu păstrați la frigider sau nu congelați probele de sânge.

6. INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Stadiul întâi – Incubarea sângelui și recoltarea plasmei

Materiale furnizate

Tuburile de colectare a sângelui QFT (vezi Secțiunea 3).

Materiale necesare (neincluse în setul de livrare)

Vezi Secțiunea 3.

Procedura

1. Dacă sângele nu este incubat imediat după colectare, **agitarea de 10 ori a tuburilor trebuie repetată imediat înainte de incubare.**
2. Se incubează tuburile **ÎN POZIȚIE VERTICALĂ**, la 37°C, timp de 16 până la 24 ore. Incubatorul nu necesită CO₂ sau umidificare.
3. După incubare la 37°C, tuburile de colectare a sângelui pot fi păstrate între 4°C și 27°C, până la 3 zile înainte de centrifugare.
4. După incubarea tuburilor la 37°C, recoltarea plasmei este facilitată de centrifugarea tuburilor timp de 15 minute la 2000 până la 3000 RCF (g). Dopul de gel va separa celulele de plasmă. Dacă aceasta nu se întâmplă, tuburile trebuie recentrifugate la o viteză mai mare.
 - Este posibil să se recolteze plasma fără centrifugare, însă este necesară o atenție suplimentară pentru îndepărtarea plasmei fără distrugerea celulelor.
5. **După centrifugare, probele de plasmă trebuie recoltate (în ordine logică) astfel încât să nu se amestece prin pipetarea în sus și în jos, înaintea recoltării. Se recomandă manipularea cu mare atenție, astfel încât suprafața gelului să nu se deterioreze.**
 - Probele de plasmă se recoltează în exclusivitate **cu pipeta**
 - Probele de plasmă pot fi încărcate direct din tuburile de colectare a sângelui în placa ELISA a testului QFT, în special dacă sunt utilizate stații de lucru ELISA automate.
 - Probele de plasmă pot fi păstrate până la 28 de zile la o temperatură cuprinsă între 2°C și 8°C sau dacă au fost deja recoltate, sub -20°C pentru perioade extinse..

Stadiul doi - IFN- γ uman ELISA

Materiale furnizate

Kit-ul ELISA QFT (vezi Secțiunea 3).

Materiale necesare (neincluse în setul de livrare)

Vezi Secțiunea 3.

Procedura

1. Toate probele de plasmă și reactivii, cu excepția Concentratului Conjugat 100X, trebuie aduse la temperatura camerei ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) înainte de utilizare. Lasați-le cel puțin 60 de minute pentru echilibrare.
2. Îndepărtați din cadru stripurile care nu sunt necesare, reambalați-le în folia pungiță și reintroduceți-le în frigider pentru păstrare, atât timp cât este necesar.

Alocați cel puțin un strip pentru standardele QFT și suficiente stripuri pentru numărul de subiecți care trebuie testați (vezi Figurile 2A & 2B pentru formatele 2 tuburi și respectiv 3 tuburi). După utilizare, păstrați cadrul și capacul pentru utilizare cu stripurile rămase.

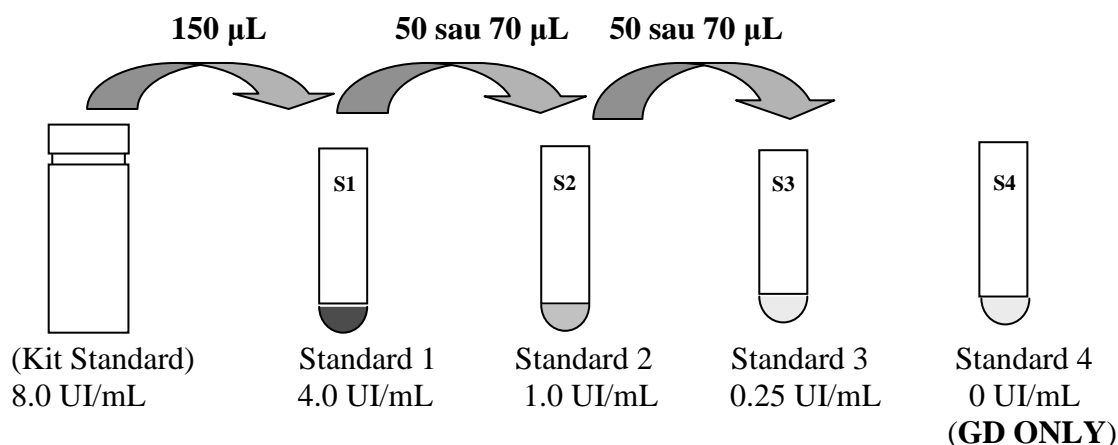
3. Reconstituiți Kit-ul Standard liofilizat cu volumul de apă deionizată sau distilată indicat pe eticheta flaconului Standard. Amestecați ușor pentru minimizarea spumării și asigurarea solubilizării complete. Reconstituirea Standardului la volumul declarat va produce o soluție cu o concentrație de 8,0 UI/mL.

Notă: Volumul de reconstituire a Kit-ului Standard va diferi între serii.

Utilizați Kit-ul Standard reconstituit pentru a obține serii de diluție 1 la 4 de IFN- γ în Diluantul Verde (DV) – vezi Figura 1. S1 (Standard 1) conține 4 UI/mL, S2 (Standard 2) conține 1 UI/mL, S3 (Standard 3) conține 0,25 UI/mL, iar S4 (Standard 4) conține 0 UI/mL (doar DV). Standardele trebuie dozate cel puțin în duplicat.

PROCEDURA RECOMANDATĂ PENTRU STANDARDELE DUPLICAT	PROCEDURA RECOMANDATĂ PENTRU STANDARDELE TRIPLICAT
<p>a. Etichetați 4 tuburi cu “S1”, “S2”, “S3”, “S4”.</p> <p>b. Adăugați 150μL de DV în S1, S2, S3, S4.</p> <p>c. Adăugați 150μL de Kit Standard în S1 și amestecați temeinic.</p> <p>d. Transferați 50μL din S1 în S2 și amestecați temeinic.</p> <p>e. Transferați 50μL din S2 în S3 și amestecați temeinic.</p> <p>f. Doar DV servește ca standard zero (S4).</p>	<p>a. Etichetați 4 tuburi cu “S1”, “S2”, “S3”, “S4”.</p> <p>b. Adăugați 150μL de DV în S1.</p> <p>c. Adăugați 210μL de DV în S2, S3, S4.</p> <p>d. Adăugați 150μL de Kit Standard în S1 și amestecați temeinic.</p> <p>e. Transferați 70μL din S1 în S2 și amestecați temeinic.</p> <p>f. Transferați 70μL din S2 în S3 și amestecați temeinic.</p> <p>g. Doar DV servește ca standard zero (S4).</p>

FIGURA 1. Prepararea Curbei Standard



- Preparați diluții proaspete de Kit Standard pentru fiecare repriză ELISA.

4. Reconstituiți liofilizatul de Concentrat Conjugat 100X cu 0,3mL apă deionizată sau distilată. Amestecați ușor pentru minimizarea spumării și pentru asigurarea solubilizării complete a Conjugatului.

Concentrația de lucru a conjugatului se prepară prin diluarea cantității necesare de Concentrat Conjugat 100X în Diluant Verde, după cum este specificat în Tabelul 1 – Prepararea Conjugatului.

TABELUL 1. Prepararea Conjugatului

NUMĂRUL DE STRIPURI	VOLUMUL DE CONCENTRAT CONJUGAT 100X	VOLUMUL DE DILUANT VERDE
2	10µL	1,0 mL
3	15µL	1,5 mL
4	20µL	2,0 mL
5	25µL	2,5 mL
6	30µL	3,0 mL
7	35µL	3,5 mL
8	40µL	4,0 mL
9	45µL	4,5 mL
10	50µL	5,0 mL
11	55µL	5,5 mL
12	60µL	6,0 mL

- Amestecați bine dar cu atenție, pentru evitarea spumării.
- Reintroduceți orice Concentrat Conjugat 100X neutilizat la o temperatură cuprinsă între 2°C și 8°C, imediat după utilizare.
- Utilizați doar Diluant Verde.

5. Pentru probele de plasmă recoltate din tuburile de colectare a sângelui care au fost congelate sau depozitate mai mult de 24 de ore înaintea efectuării testului, se recomandă amestecarea temeinică înainte de introducerea în placa ELISA.
 - Dacă probele de plasmă se adaugă direct din tuburile QFT centrifugate, trebuie evitată amestecarea plasmelor.
6. Adăugați 50μL de conjugat concentrație de lucru proaspăt preparat în godeurile ELISA necesare, utilizând o pipetă multicanal.
7. Adăugați 50μL din probele de plasmă de testat în godeurile adecvate, utilizând o pipetă multicanal (vezi mai jos formatul recomandat al plăcii – Figurile 2A & 2B). În final, adăugați 50μL în fiecare dintre Standardele de la 1 la 4.

FIGURA 2A. Formatul recomandat al probei pentru tuburile Nil & Antigen TB (44 de teste pentru o placă)

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

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Proba 1. plasmă Control Nil); 1A (Proba 1. plasmă Antigen TB).

FIGURA 2B. Formatul recomandat al probei pentru tuburile Nil, Antigen TB & Mitogen (28 de teste pentru o placă)

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

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
 - 1N (Proba 1. plasmă Control Nil); 1A (Proba 1. plasmă Antigen TB); 1M (Proba 1. plasmă Control Mitogen).
8. Amestecați temeinic conjugatul și probele de plasmă/standarde, utilizând un agitator pentru microplăci, timp de 1 minut.

9. Acoperiți fiecare placă cu capac și incubați la temperatura camerei ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) timp de 120 ± 5 minute.

- Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă în timpul incubării.

10. În timpul incubării, diluați o parte Apă tampon 20X Concentrat cu 19 părți apă deionizată sau distilată și agitați temeinic. S-a furnizat suficientă Apă tampon 20X Concentrat pentru a prepara 2L de apă tampon cu concentrație de lucru .

Spălați godeurile cu **400 μL** de apă tampon cu concentrație de lucru pentru cel puțin 6 cicluri. Este recomandat un spălător automat de plăci.

- Spălarea completă este foarte importantă pentru efectuarea testului. Asigurați-vă că fiecare godeu este **umplut complet** cu apă tampon până la partea superioară a godeului pentru fiecare ciclu de spălare. Este recomandată o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între fiecare ciclu.
- La rezervorul efluent trebuie adăugat dezinfectant standard de laborator, iar pentru decontaminarea materialului potențial infecțios trebuie urmate procedurile stabilite.

11. Loviți ușor plăcile cu fața în jos pe prosopul absorbant pentru a îndepărta apa tampon reziduală. Adăugați 100 μL Soluție Substrat Enzimă în fiecare godeu și amestecați bine, utilizând un agitator pentru microplăci.

12. Acoperiți fiecare placă cu capac și incubați la temperatura camerei ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) timp de 30 minute.

- Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă în timpul incubării.

13. După 30 de minute de incubare, adăugați 50 μL Soluție de Oprire a Enzimei în fiecare godeu și amestecați.

- Soluția de Oprire a Enzimei trebuie adăugată în godeuri în aceeași ordine și aproximativ la aceeași viteză ca și substratul din etapa 11.

14. Măsurați Densitatea Optică (DO) a fiecărui godeu în decurs de 5 minute de la terminarea reacției, utilizând un cititor microplaci cuplat cu un filtru a 450nm și cu un filtru de referință a 620nm până la 650nm. Valorile DO sunt utilizate pentru calcularea rezultatelor.

7. CALCULE ȘI INTERPRETAREA TESTULUI

Software-ul pentru analiza testului QFT utilizat pentru analiza datelor obținute și pentru calcularea rezultatelor este disponibil de la firma Cellestis. (Asigurați-vă că se utilizează cea mai actuală versiune de software.)

Software-ul efectuează evaluarea controlului calității testului, generează curba standard și furnizează rezultatul testului pentru fiecare subiect, așa cum este detaliat în secțiunea Interpretarea rezultatelor.

Ca o alternativă la utilizarea Software-ului pentru analiza testului QFT, rezultatele pot fi determinate conform următoarei metode:

Generarea Curbei Standard

(dacă nu este utilizat Software-ul pentru analiza testului QFT)

Determinați media valorilor DO a replicatelor Kit-ului Standard pe fiecare placă.

Construiți o curbă standard $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$, reprezentând grafic $\log_{(e)}$ mediei DO (Axa y) în funcție de $\log_{(e)}$ concentrației de IFN- γ a standardelor în UI/mL (Axa x), omițând standardul zero din aceste calcule. Calculați linia care se potrivește cel mai bine pentru curba standard, prin analiza regresiei.

Utilizați curba standard pentru determinarea concentrației de IFN- γ (UI/mL) pentru fiecare din probele de plasmă testate, utilizând valoarea DO a fiecărei probe.

Aceste calcule pot fi efectuate utilizând pachetele software disponibile cu cititoarele de microplaci, și programul de lucru tabelar standard sau software-ul statistic (cum este Microsoft Excel). Este recomandat ca aceste pachete să fie utilizate pentru a calcula analiza regresiei, coeficientul de variație (CV%) pentru standarde și coeficientul de corelare (r) al curbei standard.

Controlul calității Testului

Acuratețea rezultatelor testului depinde de generarea unei curbe standard exacte. Din acest motiv, rezultatele deduse din standarde trebuie examinate înainte ca rezultatele probei de testare să poată fi interpretate.

Pentru ca ELISA să fie valid:

- **Valoarea medie a DO pentru Standard 1 trebuie să fie $\geq 0,600$.**
- **CV% pentru valorile DO replicate pentru Standard 1 și Standard 2 trebuie să fie $\leq 15\%$.**
- **Valorile DO replicate pentru Standard 3 și Standard 4 nu trebuie să varieze cu mai mult de 0,040 unități de densitate optică față de media lor.**
- **Coefficientul de corelare (r) calculat din valorile medii ale absorbanței standardelor trebuie să fie $\geq 0,98$.**

Software-ul pentru analiza testului QFT calculează și comunică acești parametri de control al calității.

Dacă criteriile de mai sus nu sunt îndeplinite, analiza este invalidă și trebuie să fie repetată.

- **Valoarea medie a DO pentru Standard Zero (Diluant Verde) trebuie să fie $\leq 0,150$. Dacă valoarea medie a DO este $> 0,150$, procedura de spălare a plăcii trebuie cercetată.**

Interpretarea Rezultatelor

Rezultatele testului QFT sunt interpretate utilizând următoarele criterii:

NOTĂ: Diagnosticarea sau excluderea bolii tuberculoză și evaluarea probabilității ILTB necesită o combinație a rezultatelor analizelor epidemiologice, ale istoricului bolii, analizelor, medicale și procedurilor de diagnosticare, care trebuie luate în considerare atunci când se interpretează rezultatele testului QFT.

DACĂ S-AU UTILIZAT DOAR TUBURILE NIL & ANTIGEN TB

Nil [UI/mL]	Antigen TB minus Nil [UI/mL]	Rezultate QFT	Raport/Interpretare
≤ 8,0	< 0,35	Negativ	Infecția cu <i>M. tuberculosis</i> NU este posibilă
	≥ 0,35 și < 25% din valoarea Nil		Infecția cu <i>M. tuberculosis</i> este posibilă
	≥ 0,35 și ≥ 25% din valoarea Nil	Pozitiv¹	Infecția cu <i>M. tuberculosis</i> este posibilă
> 8,0²	Oricare	Nedeterminat³	Rezultatele sunt nedeterminate pentru reacția la Antigen TB

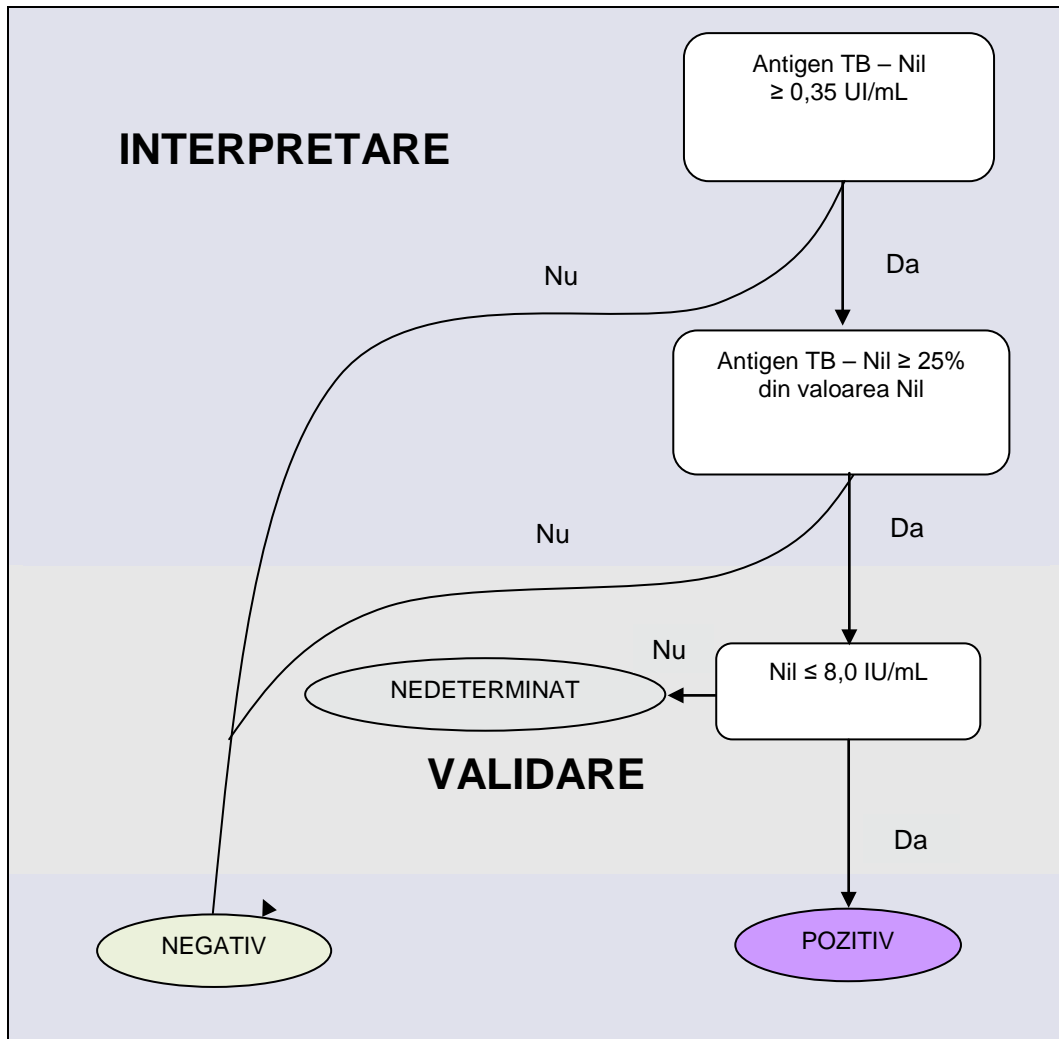
¹ Dacă infecția cu *M. tuberculosis* nu este suspectată, rezultatele inițiale pozitive pot fi confirmate prin retestarea probelor originale de plasmă în duplica în ELISA QFT. Dacă repetarea testării unuia sau a ambelor replicare este pozitivă, individul trebuie considerat că are testul pozitiv.

² În studiile clinice, mai puțin de 0,25% din subiecți au avut concentrații de IFN- γ > 8,0 UI/mL pentru Control Nil.

³ Vezi secțiunea Remedierea erorilor pentru cauzele posibile.

Magnitudinea concentrației măsurate de IFN- γ nu poate fi corelată cu stadiul sau gradul infecției, nivelul reacției imunitare sau probabilitatea evoluției către boala activă.

FIGURA 3. Interpretarea Diagramei de flux CÂND sunt utilizate tuburile NIL & ANTIGEN TB



DACĂ S-AU UTILIZAT TUBURILE NIL, ANTIGEN TB ȘI MITOGEN

Nil [UI/mL]	Antigen TB minus Nil [UI/mL]	Mitogen minus Nil [UI/mL] ¹	Rezultat QFT	Raport/ Interpretare
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativ	Infecția cu <i>M. Tuberculosis</i> NU este probabilă
	≥ 0,35 și < 25% din valoarea Nil	≥ 0,5		
	≥ 0,35 și ≥ 25% din valoarea Nil	Oricare	Pozitiv²	Infecția cu <i>M. Tuberculosis</i> este probabilă
	< 0,35	< 0,5	Nedeterminat³	Rezultatele sunt nedeterminate pentru reacția la Antigen TB
≥ 0,35 și < 25% din valoarea Nil	< 0,5			
> 8,0 ⁴	Oricare	Oricare		

¹ Răspunsurile la controlul Mitogen pozitiv (și ocazional Antigen TB) pot fi adesea în afara domeniului cititorului de microplaci. Aceasta nu influențează rezultatele testului.

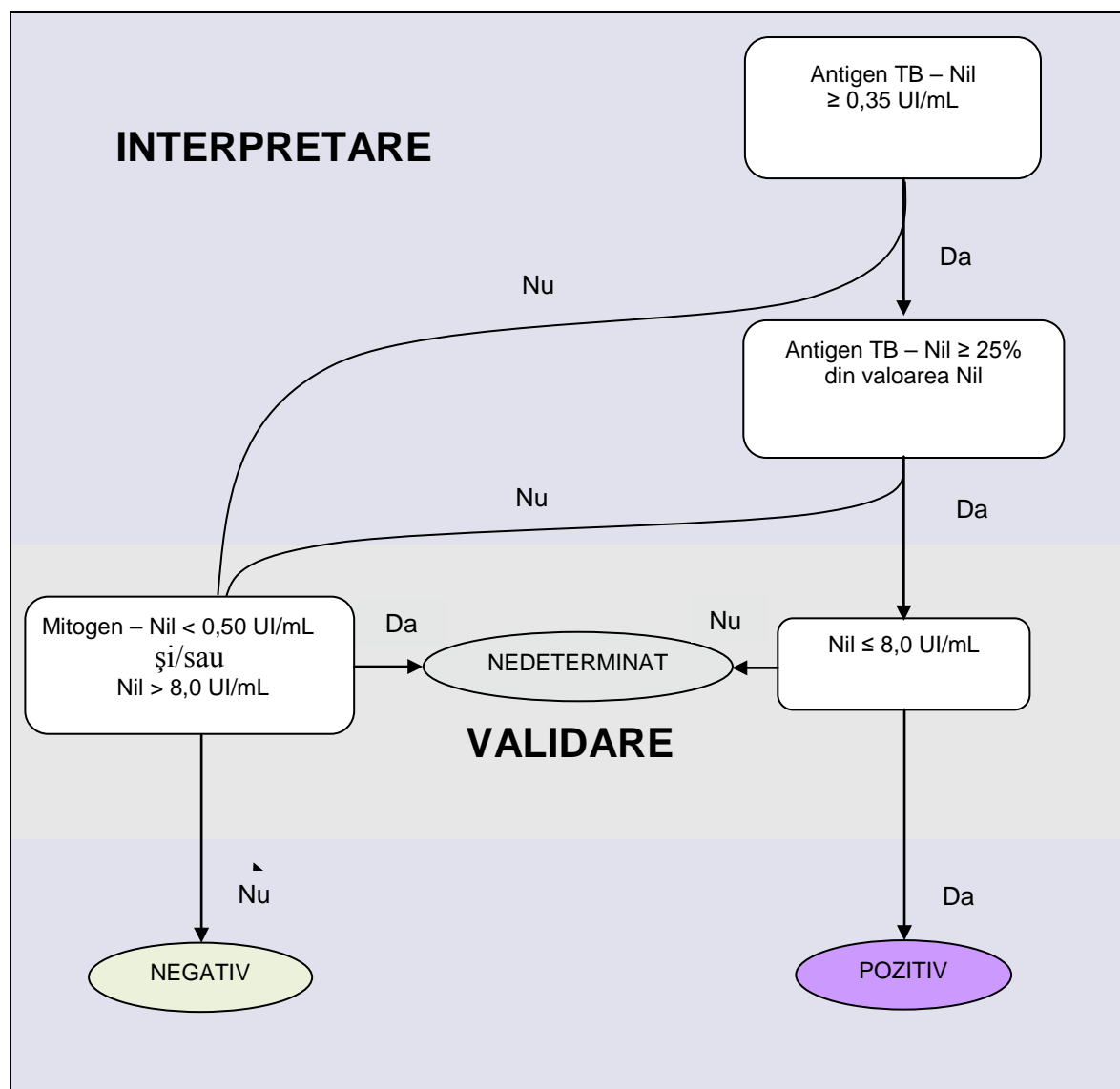
² Dacă infecția cu *M. tuberculosis* nu este suspectată, rezultatele inițiale pozitive pot fi confirmate prin retestarea probelor originale de plasmă în duplicat în ELISA QFT. Dacă repetarea testării unuia sau a ambelor replicate este pozitivă, individul trebuie considerat că are testul pozitiv.

³ Vezi secțiunea Remedierea erorilor pentru cauzele posibile.

⁴ În studiile clinice, mai puțin de 0,25% din subiecți au avut concentrații de IFN-γ > 8,0 UI/mL pentru Control Nil.

Magnitudinea concentrației măsurate de IFN- γ nu poate fi corelată cu stadiul sau gradul infecției, nivelul reacției imunitare sau probabilitatea evoluției către boala activă.

FIGURA 4. Interpretarea Diagramei de flux când sunt utilizate tuburile NIL, ANTIGEN TB & MITOGEN



8. LIMITĂRI

Rezultatele testului QFT trebuie utilizate în combinație cu istoricul epidemiologic al fiecărui individ, starea medicală curentă și alte măsuri de diagnosticare.

Indivizii cu valori Nil mai mari de 8 UI/mL sunt clasificați ca “nedeterminat”, deoarece o reacție mai mare cu 25% la Antigenele TB poate fi în afara domeniului de măsurare al testului.

Rezultatele imprecise sau rezultatele nedeterminate pot apărea datorită:

- Abaterilor de la procedura descrisă în Prospect,
- Nivelurilor excesive de IFN- γ circulant sau prezenței anticorpilor heterofili,
- Mai mult de 16 ore de la scoaterea probelor de sânge de la incubarea la 37°C.

9. CARACTERISTICILE PERFORMANȚEI

Studii clinice

Deoarece nu există un standard definitiv pentru infecția latentă de tuberculoză (ILTb), sensibilitatea și specificitatea estimată pentru testul QFT nu poate fi practic evaluată. Specificitatea testului QFT a fost aproximată prin evaluarea ratelor fals pozitive la persoanele cu risc scăzut (fără factori de risc cunoscuți) pentru infecția cu tuberculoză. Sensibilitatea a fost aproximată prin evaluarea grupurilor de pacienți cu boală TB activă confirmată prin cultură.

Specificitate

Într-un studiu efectuat în SUA care a implicat 866 voluntari, sângele pentru testul QFT a fost recoltat când a fost plasat TST. Informațiile demografice și factorii de risc pentru TB au fost determinați pe baza unui studiu standard efectuat la timpul de testare. Din 432 voluntari fără factori de risc cunoscuți pentru infecția cu *M. tuberculosis*, rezultatele testului QFT și TST au fost disponibile pentru 391. Nici unul nu a fost vaccinat cu BCG. Un al doilea studiu de specificitate a fost efectuat cu QFT la indivizi cu risc scăzut din Japonia, din care aproximativ 90% au fost vaccinați cu BCG. Rezultatele din ambele studii de specificitate sunt prezentate în Tabelul 2.

TABEL 2. Specificitatea QFT: Rezultatele pentru persoanele fără risc raportat pentru infecția cu *M. tuberculosis*.

STUDIUL	Vaccinare BCG %	Total testați	Nr. QFT Nedeterminat	Nr. QFT Pozitiv / Nr. Testelor Valide	Specificitatea QFT (95% IC)	Nr. TST Pozitiv / Nr. Testați	Specificitatea TST* (95% IC)
SUA (nepublicat)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (98-100)	6 / 391	98,5% (97-99)
Japonia ¹⁵	~ 90%	168	6	2 / 162	98,8% (95-100)	-	-
TOTAL		559	7 / 559 (1,3%)	5 / 552	99,1% (98-100)	-	-

*Utilizând o limită a 10mm TST în persoanele nevaccinate cu BCG. Specificitatea TST estimată este 99,1%, dacă se utilizează o limită de 15mm.

Sensibilitatea pentru TB activă

Suspecții TB din SUA, Australia și Japonia la care s-a confirmat ulterior infecția cu *M. tuberculosis* prin cultură, au fost testați pentru evaluarea sensibilității la QFT. Deoarece nu există un test standard definitiv pentru infecția latentă cu tuberculoză (ILT), un surogat adecvat este cultura microbiologică a *M. tuberculosis*, deoarece pacienții bolnavi sunt prin definiție infectați. Pacienții au efectuat tratament mai puțin de 8 zile înainte de colectarea sângelui pentru testul QFT.

Tabelul 3 concentrează rezultatele de la cele trei grupuri de pacienți cu cultură pozitivă de *M. tuberculosis*. Sensibilitatea globală a QFT pentru boala activă TB a fost 89% (157/177).

TABEL 3. QFT: Subiecții cu infecție cu *M. tuberculosis* confirmată prin cultură.

STUDIUL	Nr. QFT Pozitiv / Nr. Testelor Valide	Sensibilitatea QFT (95% IC)
Pacienți TB din Japonia ¹⁵	86 / 92	93% (86-97%)
Pacienți din Australia	24 / 27	89% (70-97%)
Pacienți din SUA	47 / 58	81% (68-90%)
TOTAL	157 / 177	89% (83-93%)

Diagnosticul de ILTB

Un număr de studii care au fost publicate demonstrează performanța QFT la populații variate cu risc de ILTB. În principiu, rezultatele câtorva studii selectate sunt prezentate în Tabelul 4.

TABEL 4. Studii publicate selectate privind QFT la populații cu risc de ILTB.

STUDIUL	Total testați	Rezultate și constatări
Indieni HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Aflare la rate TB foarte mari. 40% QFT pozitivi cf 41% TST pozitivi la 10mm. Mare concordanță cu TST, nici un efect al BCG pe nici un test. Ambele teste legate de factorii de risc de vârstă și perioada de lucru în domeniul personalului din sănătate.
Danezi cu HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	Prevalența globală a ILTB cu QFT a fost 4,6% (27/590) la persoane HIV+. Rezultatele pozitive au fost asociate cu riscurile TB. Doi subiecți pozitivi la QFT au evoluat la TB activă în decurs de un an. Reacțiile nedeterminate (n=20, 3,4%) au fost asociate în mod semnificativ cu un număr CD4 <100 / μ L.
Copii spitalizați (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹⁰	105	Copiii la care TB a fost suspectată sau au avut un istoric de contact TB au fost testați cu QFT și TST. 10,5% QFT pozitivi cf 9,5% TST pozitivi la 10mm. Concordanța între teste a fost 95,2% global și 100% la nevaccinați BCG.
Contacte Germane (Diel <i>et al</i> 2006) ⁹	309	Contactele strânse a 15 cazuri diferite au fost testate. 51% au fost vaccinați BCG, 27% născuți în străinătate. 70% dintre cei vaccinați BCG și 18% dintre cei nevaccinați au fost pozitivi TST (5mm), în timp ce 9% și respectiv 11% au fost pozitivi QFT. QFT a fost asociat cu riscul TB. TST a fost asociat doar cu vaccinarea BCG.

Mult mai multe publicații descriu performanța mai puțin sensibilă a unei versiuni de antigen lichid a QuantiFERON®-TB Gold (predecesor al QFT) și al testului QFT. Aceste studii includ utilizarea testului/testelor la contacte ale cazurilor de TB activă^{9,11,19,25}, copii^{6-10,25,28}, HIV pozitivi^{2,5,20}, personal din domeniul medical^{13,26,32}, subiecți care se afla sub medicație cu imunosupresoare^{3,4,22,23,27,30,31}, precum și suspecți TB^{7,8,10,18} și indivizi cu risc scăzut¹⁵.

Repetabilitatea și efectul TST asupra testării ulterioare cu QFT

Ca parte a studiului de specificitate SUA, un subset de voluntari fost testați din nou între 4 și 5 săptămâni după testul original QFT și TST.

Rezultatele QFT pentru 260 subiecți au fost disponibile la ambele momente de timp, iar concordanța a fost 99.6% (259/260). Un TST anterior nu a indus reacții pozitive la QFT.

10. INFORMAȚII TEHNICE

Rezultate nedeterminate

Rezultatele nedeterminate trebuie să fie neobișnuite și pot fi legate de starea imunitară a individului care este testat, dar pot fi, de asemenea, legate de un număr de factori tehnici:

- Mai mult de 16 ore de la scoaterea sângelui de la incubarea la 37°C,
- Păstrarea sângelui în afara domeniului de temperatură recomandat (22°C ± 5°C),
- Amestecarea insuficientă a tuburilor de colectare a sângelui,
- Spălarea incompletă a plăcii ELISA.

Dacă sunt suspectate probleme tehnice legate de colectarea sau manipularea probelor de sânge, repetați întregul test QFT cu un nou specimen de sânge. Repetarea testării ELISA a plasmelor stimulate poate fi efectuată dacă sunt suspectate spălarea inadecvată sau alte abateri de procedură ale testului ELISA. Testele nedeterminate care rezultă din valori Mitogen scăzute sau valori Nil mărite nu sunt de așteptat să se schimbe la repetare, decât dacă a fost o eroare la testarea ELISA. Rezultatele nedeterminate trebuie raportate ca atare. Medicii pot alege să retraseze un specimen sau să efectueze alte proceduri după cum este adecvat.

Probele de plasmă coagulată

Dacă la păstrarea pe termen îndelungat a probelor de plasmă se formează cheaguri de fibrină, centrifugați probele pentru sedimentarea materialului coagulat și pentru facilitarea pipetării plasmei.

Remedierea erorilor ELISA

Dezvoltarea nespecifică a colorației

CAUZA POSIBILĂ	SOLUȚIA
Spălarea incompletă a plăcii.	Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 μ L/godeu tampon de spălare. Mai mult de 6 cicluri de spălare pot fi necesare, în funcție de lichidul de spălare utilizat. Trebuie utilizat un timp de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.
Contaminarea încrucișată a godeurilor ELISA.	Aveți grijă la pipetarea și amestecarea probei, pentru minimizarea riscului.
Kit-ul / Componentele au expirat.	Asigurați-vă că kit-ul este utilizat până la data de expirare a acestuia. Asigurați-vă că Standardul și Concentratul Conjugat 100X reconstituite sunt utilizate în decurs de trei luni de la data reconstituirii acestora.
Soluția Enzimă Substrat este contaminată.	Aruncați substratul dacă există o colorație albastră. Asigurați-vă că sunt utilizate rezervoarele curate de reactiv.
Amestecarea probelor de plasmă în tuburile de colectare QFT înainte de recoltare	După centrifugare evitați amestecarea probelor de plasmă prin pipetarea în sus și în jos, înaintea recoltării (plasmei din tubul centrifugat). Se recomandă manipularea cu mare atenție, astfel încât suprafața gelului să nu se deterioreze.

Rezultate cu densitate optică scăzută a Standardelor

CAUZA POSIBILĂ	SOLUȚIA
Eroare privind diluarea Standardului.	Asigurați-vă că diluările Kit-ului Standard sunt preparate corect, conform Prospectului.
Eroare de pipetare.	Asigurați-vă că pipetele sunt calibrate și utilizate conform instrucțiunilor producătorului.
Temperatura de incubare este prea scăzută.	Incubarea ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei, între 17°C și 27°C.
Timpul de incubare este prea scurt.	Incubarea plăcii cu conjugat, standardele și probe trebuie să aibă loc 120 \pm 5 minute. Soluția Enzimă Substrat este incubată pe placă timp de 30 minute.
Filtrul cititorului de plăci este incorect utilizat.	Placa trebuie citită la 450 nm, cu un filtru de referință între 620 și 650nm.
Reactivii sunt prea reci.	Toți reactivii, cu excepția Concentratului Conjugat 100X, trebuie aduși la temperatura camerei înainte de începerea testului. Aceasta durează aproximativ o oră.
Kit-ul / Componentele au expirat.	Asigurați-vă că kit-ul este utilizat până la data de expirare. Asigurați-vă că Standardul și Concentratul Conjugat 100X reconstituite sunt utilizate în decurs de trei luni de la data reconstituirii acestora.

Background ridicat

CAUZA POSIBILĂ	SOLUȚIA
Spălarea incompletă a plăcii.	Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400μL/ godeu tampon de spălare. Mai mult de 6 cicluri de spălare pot fi necesare, în funcție de lichidul de spălare utilizat. Trebuie utilizat un timp de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.
Temperatura de incubare prea ridicată.	Incubarea ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei, între 17°C și 27°C.
Kit-ul / Componentele au expirat.	Asigurați-vă că kit-ul este utilizat până la data de expirare. Asigurați-vă că Standardul și Concentratul Conjugat 100X reconstituite sunt utilizate în decurs de trei luni de la data reconstituirii acestora.
Soluția Enzimă Substrat este contaminată.	Aruncați substratul dacă există o colorație albastră. Asigurați-vă că sunt utilizate rezervoarele curate de reactiv.

Curba standard neliniară și variabilitatea duplicatului

CAUZA POSIBILĂ	SOLUȚIA
Spălarea incompletă a plăcii.	Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400μL/ godeu tampon de spălare. Mai mult de 6 cicluri de spălare pot fi necesare, în funcție de lichidul de spălare utilizat. Trebuie utilizat un timp de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.
Eroare privind diluarea Standardului.	Asigurați-vă că diluările Kit-ului Standard sunt preparate corect, conform Prospectului.
Amestecare insuficientă.	Amestecați reactivii temeinic, prin răsturnare sau agitare înainte de adăugarea lor pe placă.
Tehnică de pipetare cu întreruperi sau întreruperea în timpul pregătirii testului.	Adăugarea probei și a standardului trebuie efectuată în mod continuu. Toți reactivii trebuie preparați înainte de începerea testului.

Procedura de testare video și soluția la majoritatea problemelor tehnice pot fi găsite în Informațiile Produsului și Ghidul Tehnic de pe CD-ROM, disponibile gratuit de la Cellestis sau la distribuitorul dvs.

11. BIBLIOGRAFIE

O listă vastă cu referințe privind QFT se găsește sub gnowee™ – în biblioteca QuantiFERON, disponibilă sub adresa www.gnowee.net

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.* 2009. 33;586-93.
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. 62; 389-94.
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.* 2009. 135; 1010-8.
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.* 2009. 198; 33-7.

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-gamma 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. SERVICE ȘI SUPORT TEHNIC

Pentru service și suport tehnic vă rugăm să contactați:

Cellestis International Pty Ltd: **Phone: +61 3 8527 3500**
Fax: +61 3 9568 6623
E-mail: techsupport@cellestis.com

Cellestis GmbH:
(Europa) **Phone: +49 6151 428 59-0**
Fax: +49 6151 428 59-110
Email: techsupport@cellestis.com

Website: www.cellestis.com

Alte țări:

Țara	Număr gratuit
Australia	9001 5776
Austria	0800 8020034
Belgia	0800 75351
Franța	0800911164
Germania	0800 182 7452
Irlanda	1800 550 417
Olanda	0800 022 5340
Noua Zeelandă	0800 44240
Elveția	0800 561 802
Marea Britanie	0800 680 0630

13. PROCEDURA DE TESTARE PE SCURT

STADIUL 1 –INCUBAREA SÂNGELUI

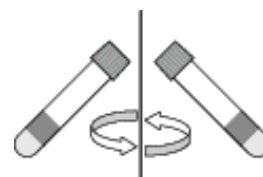
1. Colectați sângele pacientului în tuburile de colectare a sângelui și **amestecați temeinic, prin agitarea tuburilor în sus și în jos (de 10 ori)**, pentru a fi siguri că **întreaga suprafață interioară a tubului** a fost acoperită cu sânge în scopul solubilizării antigenului pe pererții tubului.



2. Incubați tuburile **în poziție verticală** la 37°C timp de 16 - 24 ore.



3. După incubare, centrifugați tuburile timp de 5 până la 15 minute la 2000 - 3000 RCF (g), pentru a separa plasma și hematiile.

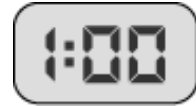


4. După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea în sus și în jos sau amestecarea probelor de plasmă înainte de recoltare. Pe toată durata de lucru, trebuie acordată o atenție sporită, astfel încât materialul de la suprafața gelului să nu se deterioreze.



STADIUL 2 – IFN- γ ELISA

1. Echilibrați componentele ELISA, cu excepția Concentratului Conjugat 100X, la temperatura camerei, pentru cel puțin 60 minute.

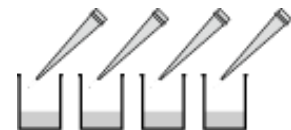


2. Reconstituiți Kit-ul Standard la 8,0 UI/MI, cu apă distilată sau deionizată. Preparați patru (4) diluții standard.

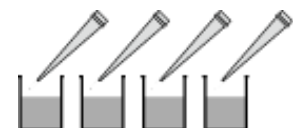


3. Reconstituiți liofilizatul de Concentrat Conjugat 100X cu apă distilată sau deionizată.

4. Preparați conjugatul concentrație de lucru în Diluant Verde și adăugați 50 μ L în toate godeurile.



5. Adăugați 50 μ L din probele de plasmă pentru testare și adăugați 50 μ L de standarde în godeurile adecvate. Amestecați utilizând agitatorul.

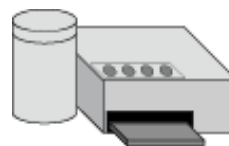


6. Incubați pentru 120 minute la temperatura camerei.

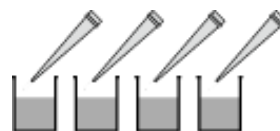


STADIUL 2 – IFN- γ ELISA (Continuare)

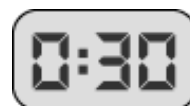
7. Spălați godeurile de cel puțin 6 ori cu 400 μ L/godeu cu apă tampon.



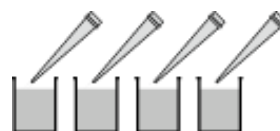
8. Adăugați 100 μ L Soluție Substrat Enzimă în godeuri. Amestecați utilizând agitatorul.



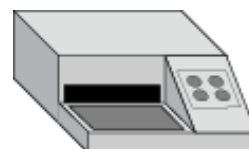
9. Incubați pentru 30 minute la temperatura camerei.



10. Adăugați 50 μ L Soluție de oprire a Enzimei în toate godeurile. Amestecați utilizând agitatorul.



11. Citiți rezultatele la 450 nm cu ajutorul unui filtru de referință de 620-650 nm.



12. Analizați rezultatele.



14. MODIFICĂRI SEMNIFICATIVE

Modificările semnificative din această versiune (05990301G–Iulie 2011) a Prospectului QFT sunt prezentate pe scurt în tabelul de mai jos:

Secțiune	Pagina	Modificări
5. Colectarea și manipularea plasmei	11	Modificare la modul de agitare a tuburilor
6. Instrucțiuni de utilizare	13	Modificare la modul de lucru cu tuburile cu sânge
6. Instrucțiuni de utilizare	15	Modificare la modul de lucru cu probele de plasmă
10. Informații tehnice	28	Adăugire: “Amestecarea probelor de plasmă în tuburile de colectare QFT înainte de recoltare”
12. Serviciul tehnic	32	Adresă nouă de e-mail a serviciului tehnic



Fabricat pentru:
Cellestis Limited (Australia) and Cellestis GmbH (Europa)
Level 1, Office Tower 2, Chadstone Centre
1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia
Phone (Aust) +61 3 8527 3500, (Europe) +49 6151 428 59-0

E-mail: quantiferon@cellestis.com

Website: www.cellestis.com

Doc. No. 05990301G
Iulie 2011

