

QuantiFERON[®]-TB Gold

(Metoda în tub)

**Test IFN-gamma al sângelui total
Măsurarea răspunsurilor la antigenele peptidice ESAT-6,
CFP-10 & TB7.7(p.4)**

Prospect

Utilizare pentru Diagnostic *In Vitro*



CUPRINS

| | |
|--|-----------|
| 1. UTILIZARE INTENȚIONATĂ | 3 |
| 2. REZUMATUL ȘI EXPLICATIA TESTULUI | 3 |
| Principiile dozării | 5 |
| Timpul necesar pentru efectuarea dozării | 5 |
| 3. REACTIVII ȘI MODUL DE PĂSTRARE | 6 |
| Materiale necesare (dar nu furnizate) | 6 |
| Instrucțiuni de păstrare | 7 |
| Tuburile de colectare a sângelui | 7 |
| Reactivii Kit-ului | 7 |
| Reactivii reconstituiți și neutilizați | 7 |
| 4. ATENȚIONĂRI ȘI PRECAUȚII | 8 |
| Atenționări | 8 |
| Precauții | 9 |
| 5. COLECTAREA ȘI MANIPULAREA PROBEI | 10 |
| 6. INSTRUCȚIUNI PENTRU UTILIZARE | 11 |
| STADIUL ÎNTÂI – 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 |
| Probleme de trasare ELISA | 26 |
| Dezvoltarea nespecifică a colorației | 26 |
| Citiri pentru standarde cu densitate optică mică | 26 |
| Background ridicat | 27 |
| Curba standard neliniară și variabilitatea duplicatului | 27 |
| 11. BIBLIOGRAFIE | 28 |
| 12. SERVICII TEHNICE | 30 |
| 13. PROCEDURA DE TESTARE REZUMATĂ | 31 |

1. UTILIZARE INTENȚIONATĂ

QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (IT) este un test pentru diagnostic *in vitro*, care utilizează un cocktail de peptide: ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4) care stimulează celulele din sângele întreg heparinizat. Detecția γ -interferonului (IFN- γ) prin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) este utilizată pentru identificarea răspunsurilor *in vitro* la aceste antigene peptidice care sunt asociate cu infecția cu *Mycobacterium tuberculosis*.

QuantiFERON[®]-TB Gold IT este un test indirect pentru infecția cu *M. tuberculosis* (inclusiv boala) și este destinat utilizării în asociație cu evaluarea riscului, radiografie și alte evaluări medicale și de diagnostic.

2. REZUMATUL 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 împrăștie la noi gazde, prin picături ce conțin nucleii care se împrăștie în aer de la pacienții cu tuberculoză. Un individ nou infectat poate deveni bolnav de tuberculoză în decurs de săptămâni până la luni, dar majoritatea indivizilor infectați rămân în stare de infecție latentă. Infecția latentă de 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 să ia în considerație tratamentul medical pentru prevenirea tuberculozei. Până recent, 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 un interval larg de condiții ce împiedică funcțiile imunitare dar, de asemenea, și ceilalți fără aceste condiții, nu răspund la tuberculină. Dimpotrivă, unii indivizi pentru care este puțin probabil să aibe infecție cu *M. tuberculosis* manifestă sensibilitate la tuberculină și au rezultate TDT pozitive după vaccinarea cu bacil Calmette-Guérin (BCG), infecție cu mycobacteria, alta decât complexul *M. tuberculosis*, sau alți factori nedeterminați.

ILTB trebuie deosebită de boală de tuberculoză, o stare raportabilă care, de obicei, implică plămânii și tractul respirator inferior, deși și alte sisteme de organ pot fi, de asemenea, infectate. Boala de tuberculoză este diagnosticată de rezultate istorice, fizice, radiologice, histologice și micobacteriologice.

Testul QuantiFERON[®]-TB Gold IT este un test pentru răspunsurile 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 sușele BCG și din majoritatea micobacteriilor non-tuberculoză, cu excepția *M. kansasii*, *M. szulgai* și *M. marinum*.¹ Indivizii infectați cu organismele complexului *M. tuberculosis* au de obicei limfocite în sângele lor, care le recunosc pe acestea și alte antigene micobacteriene. Acest proces de recunoaștere implică generarea și secreția citokinei, IFN- γ . Detecția și cuantificarea ulterioară a IFN- γ stă la baza acestui test.

Antigenele utilizate în QuantiFERON®-TB Gold IT sunt un cocktail de peptide ce stimulează proteinele ESAT-6, CFP-10 și TB7.7 (p4). Numeroase studii au demonstrat că aceste antigene peptide stimulează răspunsurile 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 condițiile care reduc funcționalitatea imunitară pot reduce potențial răspunsurile IFN- γ . Pacienții cu alte anumite infecții micobacteriene pot fi de asemenea sensibili 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 QuantiFERON®-TB Gold IT 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. Alte evaluări medicale și de diagnosticare sunt necesare pentru confirmarea sau excluderea bolii de tuberculoză.

Principiile dozării

Sistemul QuantiFERON[®]-TB Gold IT utilizează tuburi de colectare a sângelui specializate, 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 răspuns la antigenele peptide.

Testul QuantiFERON[®]-TB Gold IT este efectuat în două etape. Întâi, sângele întreg este colectat în fiecare din tuburile QuantiFERON[®]-TB Gold 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 QuantiFERON[®]-TB Gold IT, ca un control pozitiv. Acesta poate fi în special util în cazul în care există un dubiu referitor la starea imunitară a 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 maxim la 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) măsurată de testul ELISA.

Un test este considerat pozitiv pentru răspunsul la tubul Antigen TB dacă este semnificativ peste 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 probă testată. Un răspuns scăzut la Mitogen (<0,5 UI/mL) indică un rezultat nedeterminat dacă o probă de sânge are de asemenea răspuns negative la antigenele TB. Acest model poate apare 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 dozării

Timpul necesar pentru efectuarea dozării QuantiFERON[®]-TB Gold IT 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 o oră de muncă |
| | • Se adaugă 10-15 minute pentru fiecare extra placă |

3. REACTIVII ȘI MODUL DE PĂSTRARE

Tuburile de colectare a sângelui Tuberculoză și Control Antigen Număr de Catalog: 0590 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:

No.de catalog 0590-0201: 100 x Control Nil, 100 x tuburi cu Antigene TB.

No.de catalog. 0593 0201: 100 x tuburi cu Control Mitogen.

Tuburi pentru înaltă altitudine (a se vedea secțiunea 5)

No.de catalog 0590 0501: (Altitudine înaltă) 100 x Control Nil, 100 x tuburi Antigen TB.

No.de catalog 0590 0505: (Altitudine înaltă) 100 x Control Nil, 100 x TB Antigen & 100 x Mitogen.

No. De catalog T0593 0501 (Altitudine înaltă) 100 x tuburi Control Mitogen.

Componenete ELISA – Număr de Catalog: 0594 0201

1. Benzi Microplăci 24 x 8 lăcașuri
2. Standard IFN- γ Uman, liofilizat 1 x flacon
3. Diluant Verde 1 x 30mL
4. Conjugat 100X Concentrat, liofilizat 1 x 0.3mL
5. Apă tampon 20X Concentrat 1 x 100mL
6. Soluție Substrat Enzimă 1 x 30mL
7. Soluție de oprire a Enzimei 1 x 15mL

Materiale necesare (dar nu furnizate)

- Incubator 37°C. CO2 nu este necesar.
- Pipete calibrate de volum variabil pentru eliberarea a 10 μ L până la 1000 μ L, cu capetele de unică folosință.
- Pipetă multicanal calibrată capabilă să elibereze 50 μ L și 100 μ L, cu capetele 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 colectare a sângelui se păstrează la 4°C până la 25°C.
- Termenul de valabilitate al tuburilor de colectare a sângelui QuantiFERON[®]-TB Gold este de 15 luni de la data fabricării, dacă sunt păstrate la 4°C până la 25°C.

Reactivii Kit-ului

- Kit-ul se păstrează la frigider, la 2°C până la 8°C.
- A se feri întotdeauna Soluția Substrat Enzimă de lumina solară directă.
- Termenul de valabilitate al kit-ului ELISA QuantiFERON[®]-TB Gold este de 3 ani de la data fabricării, dacă se păstrează la 4°C până la 8°C.

Reactivii reconstituiți și neutilizați

Pentru instrucțiuni privind modul de reconstituire a reactivilor, vă rugăm să vedeți Secțiunea 6 (pagina 11).

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

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

- Odată reconstituit, Concentratul Conjugate 100X neutilizat trebuie în continuare păstrat la 2°C până la 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. ATENȚIONĂRI ȘI PRECAUȚII

Atenționări

- Un rezultat negativ al testului QuantiFERON[®]-TB Gold IT nu exclude posibilitatea infecției cu *M. tuberculosis* sau a bolii de tuberculoză: rezultatele false-negative pot fi datorate stadiului infecției (de ex., proba obținută înainte de apariția răspunsului imunitar celular), condiții co-morbide care afectează funcțiile imunitare, incorecta manipulare a tuburilor de colectare a sângelui după venopunctură, efectuarea incorectă a dozării, sau alte variații imunologice.
- Un rezultat pozitiv al testului QuantiFERON[®]-TB Gold IT nu trebuie să reprezinte singura și definitivă bază pentru determinarea infecției cu *M. tuberculosis*. Efectuarea incorectă a dozării poate determina răspunsuri fals pozitive.
- Un rezultat pozitiv al testului QuantiFERON[®]-TB Gold IT trebuie urmat de o evaluare medicală ulterioară 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 QuantiFERON[®]-TB Gold IT să poată fi datorat infecției cu *M. kansasii*, *M. szulgai* or *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 Opre 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 halatele normale de laborator pentru protecție. Dacă soluția de Opre a Enzimei intră în contact cu pielea sau cu ochii, spălați bine zona afectată cu apă și apoi consultați medicul.
- **Dăunător: Standardul IFN- γ și Concentratul de Conjugat 100X** pot produce discomfort dacă sunt ingerate și pot produce iritații ale pielii. Purtați mănuși și utilizați halatele normale de laborator pentru protecție.
- **Manipulați sângele uman ca și cum ar fi potențial infecțios.** Țineți seama de ghidurile 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 răspunsuri alergice; evitați contactul cu pielea.
- Deviațiile de la modul de utilizare specificat în Prospect pot determina obținerea rezultatelor eronate. Vă rugăm să citiți cu atenție instrucțiunile înainte de utilizarea testului.
- Nu utilizați kit-ul dacă vreunul din flacoanele cu reactiv prezintă semne de deteriorare sau scurgere înainte de utilizarea acestora.
- Nu amestecați sau nu utilizați reactivi ELISA din alte serii de kit-uri QuantiFERON[®]-TB Gold.
- Eliminați reactivii neutilizați și probele biologice conform reglementărilor locale naționale sau federale.
- Nu utilizați tuburile de colectare a sângelui sau kit-ul ELISA kit după data de expirare.

5. COLECTAREA ȘI MANIPULAREA PROBEI

Testul QuantiFERON[®]-TB Gold IT 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 1,020m și 1,875m)
5. Antigen TB (Capac roșu cu inel galben) (a se utiliza între 1,020m și 1,875m)
6. Control Mitogen - opțional (Capac mov cu inel galben) (a se utiliza între 1,020m și 1,875m)

Antigenele au fost uscate în peretele interior al tuburilor de colectare a sângelui, astfel încât este esențial ca, conținutul tuburilor să fie viguros omogenizat su 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 QuantiFERON[®]-TB Gold IT.

- 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 de o parte a tuburilor indică volumul de umplere de 1mL.

Tuburile de colectare a sângelui testului QuantiFERON[®]-TB Gold 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 epurare”, pentru a asigura că tubul este umplut cu sânge înainte ca tuburile QuantiFERON[®]-TB Gold să fie utilizate.

2. Se amestecă prin **agitare puternică în sus și în jos de 10 ori**, pentru a fi sigur că **întreaga suprafață interioară a tubului** a fost acoperită cu sânge.

- Este necesară omogenizarea puternică, pentru a asigura omogenizarea completă a sângelui cu conținuturile tubului.

3. Etichetați adecvat tuburile.

4. Tuburile trebuie transferate în incubator la 37°C cât mai repede posibil și în decurs de 16 ore de la colectare. Nu păstrați la frigider sau nu congelați probele de sânge.

- Dacă sângele nu este incubat imediat după colectare, **agitarea tuburilor trebuie repetată imediat înainte de incubare.**

6. INSTRUCȚIUNI PENTRU UTILIZARE

Stadiul întâi – Incubarea sângelui și recoltarea plasmei

Materiale furnizate

Tuburile de colectare a sângelui QuantiFERON[®]-TB Gold IT (vezi Secțiunea 3).

Materiale necesare (dar nu furnizate)

Vezi Secțiunea 3.

Procedura

1. Dacă sângele nu este incubat imediat după colectare, **agitarea tuburilor trebuie repetată imediat înainte de incubare**, după cum este descris în Secțiunea 5.

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 2°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 mare.

- Este posibil să se recolteze plasma fără centrifugare, oricum, este necesară o precauție suplimentară pentru îndepărtarea plasmei fără distrugerea celulelor.

5. Probele de plasmă pot fi încărcate direct din tuburile de colectare a sângelui în placa ELISA a testului QuantiFERON[®]-TB Gold, în special dacă sunt utilizate stații de lucru ELISA automate.

6. Alternativ, probele de plasmă pot fi păstrate înainte de ELISA, fie în tuburile centrifugate, fie colectate în flacoanele de păstrare a plasmei. De exemplu, se recoltează >150μL în microplăci cu lăcașuri sau în microtuburi în stativ în format cu 96 de lăcașuri și astupate pentru a preveni revărsările și evaporarea în cazul în care probele trebuie să fie păstrate.

- Probele de plasmă pot fi păstrate până la 4 săptămâni la 2°C până la 8°C sau sub -20°C (de preferință la mai puțin decât -70°C) pentru perioade extinse.

Stadiul doi - IFN- γ uman ELISA

Materiale furnizate

Kit-ul ELISA QuantiFERON[®]-TB Gold (vezi Secțiunea 3).

Materiale necesare (dar nu furnizate)

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 benzile care nu sunt necesare din cadru, reambalați-le în folia pungiță și reintroduceți-le în frigider, pentru păstrare până când este necesar.

Alocați cel puțin o bandă pentru standardele QuantiFERON[®]-TB Gold și suficiente benzi pentru numărul de subiecți care trebuie testați (vezi Figurile 2A & 2B pentru formatele 2-tub și respectiv 3-tub). După utilizare, păstrați cadrul și capacul pentru utilizare cu benzile 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.

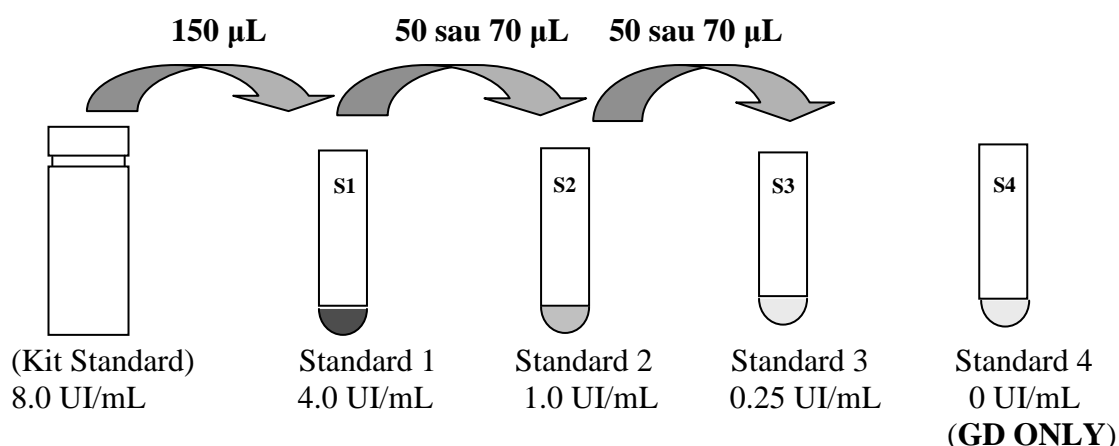
PROCEDURA RECOMANDATĂ PENTRU STANDARDELE DUPLICAT

- Etichetați 4 tuburi cu "S1", "S2", "S3", "S4".
- Adăugați **150 μ L** de DV în S1, S2, S3, S4.
- Adăugați **150 μ L** de Kit Standard în S1 și amestecați viguros.
- Transferați **50 μ L** din S1 în S2 și amestecați viguros.
- Transferați **50 μ L** din S2 în S3 și amestecați viguros.
- Doar DV** servește ca standard zero (S4).

PROCEDURA RECOMANDATĂ PENTRU STANDARDELE TRIPLICAT

- Etichetați 4 tuburi cu "S1", "S2", "S3", "S4".
- Adăugați **150 μ L** de DV în S1.
- Adăugați **210 μ L** de DV în S2, S3, S4.
- Adăugați **150 μ L** de Kit Standard în S1 și amestecați viguros..
- Transferați **70 μ L** din S1 în S2 și amestecați viguros.
- Transferați **70 μ L** din S2 în S3 și amestecați viguros.
- Doar DV** servește ca standard zero (S4).

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 BENZI | 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 2°C până la 8°C, imediat după utilizare.
- Utilizați doar Diluant Verde.

5. Înainte de dozare, plasmă trebuie amestecate, pentru a fi sigur că IFN- γ este distribuit egal în întreaga probă. □

6. Adăugați 50 μ L de conjugat concentrație de lucru proaspăt preparat în lăcașurile necesare de ELISA utilizând o pipetă multicanal.

7. Adăugați 50 μ L din probele de plasmă de testat în lăcașurile adecvate utilizând o pipetă multicanal (vezi mai jos formatul recomandat al plăcii – Figurile 2A & 2B). În final, adăugați 50 μ L 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 conjugatul și probele de plasmă/standarde viguros, utilizând o microplacă agitator, timp de 1 minut.

9. Acoperiți fiecare placă cu capac și incubați la temperatură 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 viguros. S-a furnizat suficientă Apă tampon 20X Concentrat pentru a prepara 2L de Concentrație de lucru apă tampon.

Spălați lăcașurile cu **400μL** of Concentrație de lucru apă tampon pentru cel puțin 6 cicluri. Este recomandată o placă pentru spălare automată.

- Spălarea completă este foarte importantă pentru efectuarea dozării. Asigurați-vă că fiecare lăcaș este **umplut complet** cu apă tampon până la vârful lăcașului 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 100μL Soluție Substrat Enzimă în fiecare lăcaș și amestecați bine, utilizând o microplacă agitoare.

12. Acoperiți fiecare placă cu capac și incubați la temperatură 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 50μL Soluție de Opre a Enzimei în fiecare lăcaș și amestecați.

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

14. Măsurați Densitatea Optică (DO) a fiecărui lăcaș în decurs de 5 minute de la terminarea reacției, utilizând un cititor microplacă 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 QuantiFERON[®]-TB Gold IT, utilizat pentru analiza datelor obținute și pentru calcularea rezultatelor este disponibil de la firma Cellestis.

Software-ul efectuează evaluarea controlului calității dozării, 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 QuantiFERON[®]-TB Gold IT, rezultatele pot fi determinate conform următoarei metode:

Generarea Curbei Standard

(dacă nu este utilizat Software-ul pentru analiza testului QuantiFERON[®]-TB Gold)

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

Construiți o curbă standard $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$, 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 cititorii microplacă, și program de lucru tabelar standard sau software statistic (cum este Microsoft Excel). Este recomandat ca aceste pachete să fie utilizate pentru a calcula analiza regresiei, coeficientul de variație (CV%) pentru standardse și coeficientul de corelare (r) al curbei.

Controlul calității Testului

Acuratețea rezultatelor testului este dependentă de generarea cu acuratețe a unei curbe standard.

Din acest motiv, rezultatele obținute pentru 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 QuantiFERON[®]-TB Gold calculează și raportează acești parametri de control ai calității.

Dacă criteriile de mai sus nu sunt îndeplinite, analiza este invalidată și ea 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 investigată.**

Interpretarea Rezultatelor

Rezultatele testului QuantiFERON[®]-TB Gold IT sunt interpretate utilizând următoarele criterii:

NOTĂ: Diagnosticarea sau or excluderea bolii tuberculoză și evaluarea probabilității ILTB necesită o combinație a rezultatelor epidemiologice, istorice, medicale și de diagnostic care trebuie luate în considerație când se interpretează rezultatele testului QuantiFERON[®]-TB Gold IT.

DACĂ S-AU UTILIZAT DOAR TUBURILE NIL & ANTIGEN TB

| Nil [UI/mL] | Antigen TB minus Nil [UI/mL] | QuantiFERON[®]-TB [UI/mL] | Raport/Interpretare |
|------------------------|---|---|---|
| ≤ 8,0 | < 0,35 | Negativ | Infecția cu <i>M. tuberculosis</i> NU este posibilă |
| | ≥ 0,35 și < 25% din valoarea Nil | | |
| | ≥ 0,35 și ≥ 25% din valoarea Nil | Pozitiv¹ | Infecția cu <i>M. tuberculosis</i> este posibilă |
| > 8,0 ² | Oricare | Nedeterminat³ | Rezultatele sunt nedeterminate pentru răspunsul la Antigen TB |

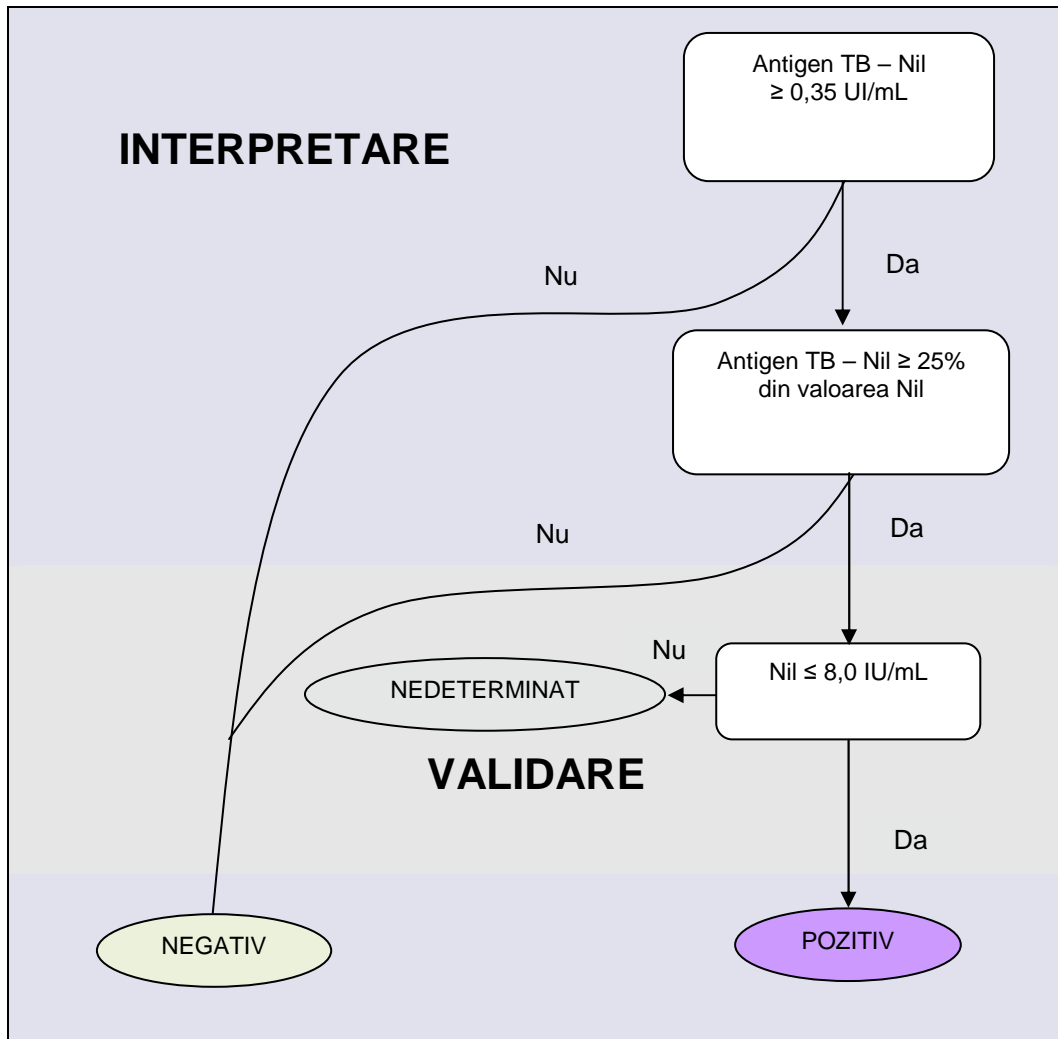
¹ Dacă infecția cu *M. tuberculosis* nu este suspectată, rezultatele inițiale pozitive pot fi confirmate prin retestarea probelor originale de plasmă în duplicate în ELISA QuantiFERON[®]-TB Gold. Dacă repetarea testării unuia sau ambelor replicate este pozitivă, individul trebuie considerat că are testul 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 Probleme de trasare pentru cauzele posibile.

Magnitudinea concentrației măsurate de IFN- γ nu poate fi corelată cu stadiul sau gradul infecției, nivelul răspunsului imunitar sau probabilitatea progresiei 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 | QuantiFERON®-TB [UI/mL] | Raport/ Interpretare |
|------------------------------|---|--|--|---|
| ≤ 8,0 | < 0,35 | ≥ 0,5 | Negativ | Infecția cu <i>M. tuberculosis</i> NU este posibilă |
| | ≥ 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 posibilă |
| | < 0,35 | < 0,5 | Nedeterminat³ | Rezultatele sunt nedeterminate pentru răspunsul 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 microplacă. Aceasta nu are impact asupra rezultatelor testului.

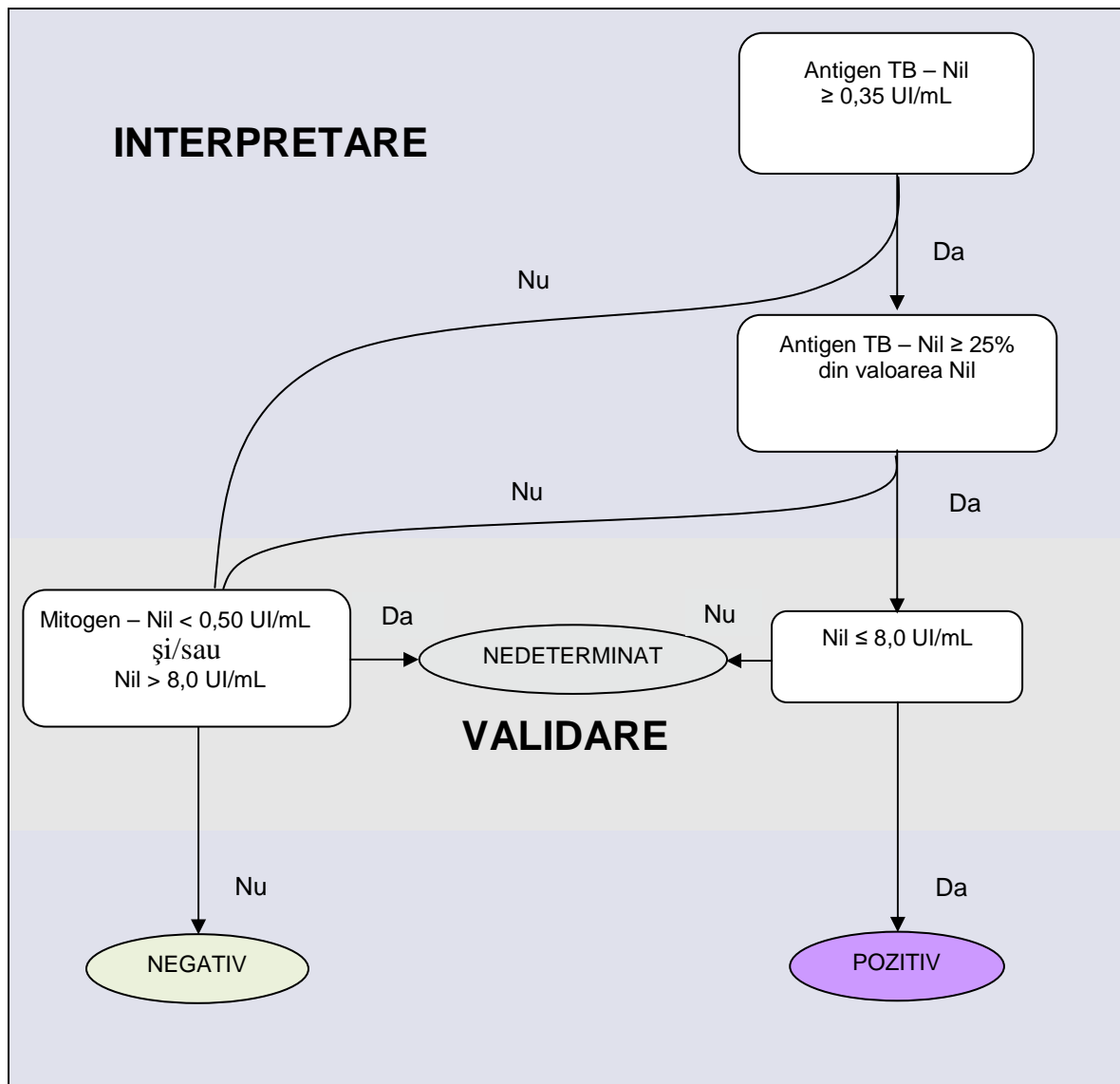
² Dacă infecția cu *M. tuberculosis* nu este suspectată, rezultatele inițiale pozitive pot fi confirmate prin retestarea probelor originale de plasmă în duplicate în ELISA QuantiFERON®-TB Gold. Dacă repetarea testării unuia sau ambelor replicate este pozitivă, individul trebuie considerat că are testul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

³ Vezi secțiunea Probleme de trasare 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 răspunsului imunitar sau probabilitatea progresiei către boala activă.

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



8. LIMITĂRI

Rezultatele testului QuantiFERON[®]-TB Gold IT trebuie utilizate în conjuncție cu istoricul epidemiologic al fiecărui individ, starea medicală curentă și alte evaluări diagnostice.

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

Rezultatele pe care nu te poți baza sau rezultatele nedeterminate pot apare datorită:

- Deviațiile din procedura descrisă în Prospect,
- Nivelele excesive de IFN- γ circulant sau prezența 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 (ILT), sensibilitatea și specificitatea estimată pentru testul QuantiFERON[®]-TB Gold IT nu poate fi practic evaluată. Specificitatea testului QuantiFERON[®]-TB Gold IT a fost aproximată prin evaluarea evaluarea ratelor fals pozitive la persoanele cu risc scăzut (fără factori de risc cunoscuți) pentru infecția de tuberculoză. Sensibilitatea a fost aproximată prin evaluarea grupurilor de pacienți cu cultură confirmată de boală TB activă.

Specificitate

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

TABEL 2. Specificitatea QuantiFERON®-TB Gold IT: Rezultatele pentru persoanele fără risc raportat infecția cu *M. tuberculosis*.

| STUDIUL | Vaccinare BCG % | Total testați | Nr. QFT-G Nedeterminat | Nr. QFT-G Pozitiv / Nr. Testelor Valide | Specificitatea QFT-G (95% IC) | Nr. TST Pozitiv / Nr. Testați | Specificitatea TST* (95% IC) |
|----------------------|-----------------|---------------|------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| SUA (nepublicat) | 0% | 391 | 1 | 3 / 390 | 99,2% (97,6-99,8) | 6 / 391 | 98,5% (96,5-99,4) |
| Japonia (nepublicat) | ~ 90% | 190 | 4 | 3 / 186 | 98,4% (95-99,6) | - | - |
| TOTAL | | 581 | 5 / 584 (0,9%) | 6 / 576 | 99,0% | - | - |

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

Sensibilitatea pentru TB activă

Suspecții TB din Australia și Japonia care au fost ulterior confirmați cu infecție de *M. tuberculosis* prin cultură, au fost testați pentru evaluarea sensibilității la QuantiFERON®-TB Gold IT. Deoarece nu există un test standard definitiv pentru infecția latentă de tuberculoză (ILT), un surrogat adecvat este cultura microbiologică a *M. tuberculosis*, deoarece pacienții cu boală sunt prin definiție infectați. Pacienții au primit tratament mai puțin de 8 zile înainte de colectarea sângelui pentru testul QuantiFERON®-TB Gold IT.

Tabelul 3 rezumă rezultatele de la cele două grupuri de pacienți cu cultură pozitivă de *M. tuberculosis*. Sensibilitatea globală a QuantiFERON®-TB Gold IT pentru boala activă TB a fost 89% (48/54).

TABEL 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Subiecții cu cultură confirmată de infecție cu *M. tuberculosis*.

| STUDIUL | Boală confirmată de | Nr. QFT-Gold Pozitiv / Nr. Testelor Valide | Sensibilitatea QFT-Gold (95% IC) |
|---|---------------------|--|----------------------------------|
| Pacienți TB Japonezi Studiu de validare | Cultură | 24 / 27 | 89% (72-96%) |
| Pacienți TB Australieni Studiu de validare | Pulmonar | 7 / 10 | 70% (40-89%) |
| | Extrapulmonar | 17 / 17 | 100% (82-100%) |
| TOTAL | | 48 / 54 | 89% (78-95%) |

Diagnosticul de ILTB

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

TABEL 4. Studii publicate selectate privind QuantiFERON®-TB Gold IT la populații cu risc de ILTB.

| STUDIUL | Total testați | Rezultate |
|---|---------------|---|
| Indieni HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶ | 726 | Aflare la rate TB foarte mari. 40% QFT-Gold IT 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 profesioniștilor din sănătate. |
| Danezi cu HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵ | 590 | Prevalența globală a ILTB cu QFT-Gold IT a fost 4,6% (27/590) la HIV+ persoane. Rezultatele pozitive au fost asociate cu riscurile TB. Doi subiecți pozitivi la QFT-Gold IT au progresat la TB activă în decurs de un an. Răspunsurile nedeterminate (n=20, 3,4%) au fost semnificativ asociate cu un număr CD4 <100 / μL. |
| Copii spitalizați (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹² | 105 | Copiii la care TB a fost suspectată sau au avut un istoric de contact TB au fost testați cu QFT-Gold IT and TST. 10,5% QFT-Gold IT pozitivi cf 9,5% TST pozitivi la 10mm. Acordul între teste a fost 95,2% global și 100% la nevaccinați BCG. |
| Contacte Germane (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹ | 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-Gold IT. QFT-Gold IT a fost asociat cu riscul TB. TST a fost asociat doar cu vaccinarea BCG. |

Mult mai multe publicații descriu performanța mai puțin senzitivă a unei versiuni de antigen lichid a QuantiFERON®-TB Gold (precursor al QuantiFERON®-TB Gold IT) și a testului QuantiFERON®-TB Gold IT. 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}, profesioniști din domeniul medical^{13,26,32}, deprimați din punct de vedere imunologic^{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 QuantiFERON®-TB Gold IT

Ca parte a studiului de specificitate SUA, un subset de voluntari s-au odihnit între 4 și 5 săptămâni după testul original QuantiFERON®-TB Gold IT și TST.

Rezultatele QuantiFERON®-TB Gold IT pentru 260 recrutați au fost disponibile la ambele puncte de timp, iar acordul a fost 99.6% (259/260). Un TST anterior nu a indus răspunsuri pozitive did la QuantiFERON®-TB Gold IT.

10. INFORMAȚII TEHNICE

Rezultate nedeterminate

Rezultatele nedeterminate vor fi nefrecvente 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 colectarea a sângelui,
- Spălarea incompletă a plăcii ELISA.

Dacă sunt suspectate probleme tehnice legate de colectarea sau manipularea probelor de sânge, repetați întregul test QuantiFERON®-TB Gold IT cu un nou specimen de sânge. Repetarea testării ELISA a plasmelor stimulate poate fi efectuată dacă sunt suspectate spălarea inadecvată sau alte deviații 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. Physicians may choose to redraw a specimen or perform other procedures as appropriate.

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.

Probleme de trasare ELISA

Dezvoltarea nespecifică a colorației

| CAUZA POSIBILĂ | SOLUȚIA |
|--|---|
| Spălarea incompletă a plăcii. | Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400μL/lăcaș 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 lăcașurile 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. |

Citiri pentru standarde cu densitate optică mică

| CAUZA POSIBILĂ | SOLUȚIA |
|--|---|
| Eroare privind diluția Standardului. | Asigurați-vă că diluțiile 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, a standardelor și probelor trebuie să aibă loc 120 ± 5 minute. The Soluția Enzimă Substrat este incubată pe placă timp de 30 minute. |
| Filtrul de citire a plăcii 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 dozării. 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/ lăcaș 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/ lăcaș 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 diluția Standardului. | Asigurați-vă că diluțiile Kit-ului Standard sunt preparate corect, conform Prospectului. |
| Amestecare insuficientă. | Amestecați reactivii complet, prin răsturnare sau agitare înainte de adăugarea lor la placă. |
| Inconsistența tehnicii de pipetare sau întreruperea în timpul pregătirii dozării. | Adăugarea probei și a standardului trebuie efectuată într-o manieră continuă. Toți reactivii trebuie preparați înainte de începerea dozării. |

Procedura de dozare 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 prin distribuitorul dvs.

11. BIBLIOGRAFIE

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. 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.* 2008. [Epub ahead of print].
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2008. [Epub ahead of print].

17. **Kang, Y.A., et al.** Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA*. 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly*. 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol*. 2008. 146; 761-6.
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.

13. PROCEDURA DE TESTARE REZUMATĂ

STADIUL 1 –INCUBAREA SÂNGELUI

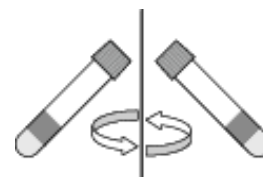
1. Colectați sângele pacientului în tuburile de colectare a sângelui și **amestecați viguros, prin agitarea tuburilor în sus și în jos de 10 ori**, pentru a fi siguri că **întreaga suprafață interioară a tubului** a fost acoperită cu sânge.



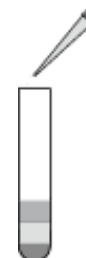
2. Incubați tuburile **în poziție verticală** la 37°C timp de 16 - 24 ore.



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

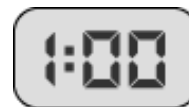


4. După centrifugare, recoltați proba de plasmă din fiecare tub pentru cuantificarea IFN- γ .



STADIUL 2 – IFN- γ ELISA

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

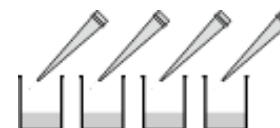


2. Reconstituiți Kit-ul Standard la 8,0 UI/MI, cu apă distilată sau deionizată. Preparați patru (4) diluții standard

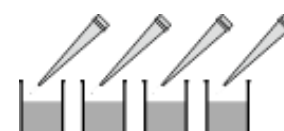


3. Reconstituiți liofilizatul de Concentrat Conjugat 100X cu apă distilată sau deionizată.

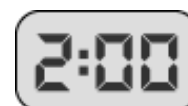
4. Preparați conjugatul concentrație de lucru în Diluant Verde și adăugați 50 μ L în toate lăcașurile.



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

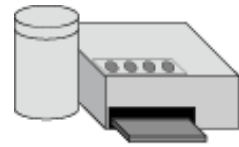


6. Incubați pentru 120 minute la temperatura camerei.

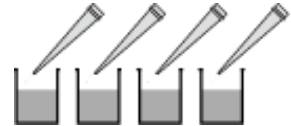


STADIUL 2 – IFN- γ □ ELISA (Continuare)

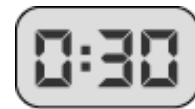
7. Spălați lăcașurile de cel puțin 6 ori cu 400 μ L/pe lăcaș cu apă tampon.



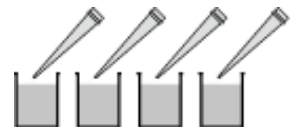
8. Adaugați 100 μ L Soluție Substrat Enzimă în lăcașuri. Amestecați utilizând agitatorul.



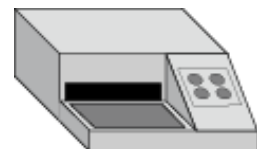
9. Incubați pentru 30 minute la temperatura camerei.



10. Adaugați 50 μ L Soluție de oprire a Enzimei în toate lăcașurile. Amestecați utilizând agitatorul.



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



12. Analiza rezultatelor.





Fabricat pentru:
Cellestis Limited (Australia) and Cellestis GmbH (Europa)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia
Telefon: (Australia) +61 3 9571 3500; (Europe) +49 6151 428 59-0

E-mail: quantiferon@cellestis.com
Website: www.cellestis.com

Doc. No. 05990301C
August 2009

| | |
|----|-----|
| EC | REP |
|----|-----|

CE
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Germany