

QuantiFERON[®]-TB **Gold**

(Metoda z epruvetami)

**Test IFN-Gamma
za merjenje reakcij polne krvi na peptidne antigene
ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p.4)**

NAVODILO ZA UPORABO

za *In Vitro*-diagnostiko



VSEBINA

| | |
|---|----|
| 1. NAMEN UPORABE | 2 |
| 2. POVZETEK IN RAZLAGA TESTA | 2 |
| Princip testa | 3 |
| Poraba časa | 3 |
| 3. REAGENTI IN SHRANJEVANJE | 4 |
| Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo | 5 |
| Skladiščenje | 5 |
| Epruvete za odvzem krvi | 5 |
| Komplet reagentov | 5 |
| Rekonstruirani in odvečni reagenti | 5 |
| 4. PREVIDNOSTNI UKREPI IN OPOZORILA | 6 |
| Previdnostni ukrepi | 6 |
| Opozorila | 6 |
| 5. ODVZEM VZORCEV IN ROKOVANJE | 7 |
| 6. NAVODILO ZA UPORABO | 9 |
| 1. faza: inkubacija krvnega testa in odvzem plazme | 9 |
| 2. faza: humani IFN- γ -ELISA | 10 |
| 7. IZRAČUNAVANJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV | 13 |
| Izdelava standardne krivulje | 13 |
| Kontrola kakovosti | 14 |
| Interpretacija rezultatov | 15 |
| 8. MEJE POSTOPKA | 19 |
| 9. ZNAČILNOSTI | 19 |
| 10. TEHNIČNE INFORMACIJE | 21 |
| Neodločni rezultati | 21 |
| Strjeni vzorci plazme | 21 |
| ELISA-odstranitev težav | 22 |
| Nespecifična barvna reakcija | 22 |
| Nizka OD - vrednost standarda | 22 |
| Močna obarvanost ozadja | 23 |
| Nelinearna standardna krivulja in odstopanja med obema dvojnima testoma | 23 |
| 11. BIBLIOGRAFIJA | 24 |
| 12. TEHNIČNA SERVISNA SLUŽBA | 25 |
| 13. TESTNI POSTOPEK (SKRAJŠANA OBLIKA) | 26 |

1. NAMEN UPORABE

QuantiFERON®-TB Gold v tubi (IT) je test za *In-vitro*-diagnostiko in vsebuje koktejl peptidov, ki simulira proteine ESAT-6, CFP-10 in B7.7(p4) in stimulira celice v heparinizirani polni krvi. Dokazovanje interferona- γ (IFN- γ) s pomočjo metode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) služi za prepoznavanje *In-vitro* reakcij na peptidne antigene, ki so prisotni pri okužbi z bakterijo *Mycobacterium tuberculosis*.

QuantiFERON®-TB Gold IT je indirektni test za dokazovanje okužbe z *M. tuberculosis* (vključno z aktivno obolenostjo). Testni rezultati se morajo obravnavati v povezavi z oceno tveganja in skupaj z rentgenskimi preglede ter drugimi medicinskimi in diagnostičnimi preiskavami.

2. POVZETEK IN RAZLAGA TESTA

Tuberkuloza (Tb) je nalezljiva bolezen, ki jo povzroča okužba z organizmi kompleksa *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). Prenos okužbe od oseb, ki imajo Tb dihalnih poti, praviloma poteka kapljično. Pri na novo okuženih pacientih lahko obolenje s Tb nastopi čez več tednov ali mesecev, vendar večina okuženih nima nobenih težav. Pri nekaterih persistira latentna okužba s tuberkulozo (LTBI), nenalezljivo, nesimptomatično boleznijo, ki lahko izbruhne šele po mesecih ali letih. Glavni smoter prepoznavanja LTBI je terapija, ki prepreči izbruh Tb. Do pred kratkim je bil kožni test s tuberkulinom (tuberculin skin test, TST) edina metoda, ki je bila na voljo za diagnosticiranje LTBI. Občutljivost kože na tuberkulin nastane 2 do 10 tednov po okužbi. Vendar pa nekatere okužene osebe na tuberkulin ne reagirajo. Med njimi so na primer pacienti z motenimi imunskimi reakcijami zaradi drugih bolezni, pa tudi pacienti brez takih motenj. V nasprotju s tem pa nekatere osebe, ki z veliko verjetnostjo niso okužene z *M. tuberculosis*, po cepljenju z bakterijo Bacillus Calmette-Guérin (BCG), po okužbi z drugimi mikobakterijami, kakršen je *M. tuberculosis*-kompleks ali pa zaradi drugih, neznanih vzrokov izkazujejo občutljivost na tuberkulin, kar ima za posledico pozitiven rezultat testiranja kože s tuberkulinom.

LTBI je treba razlikovati od obolenosti za Tb, katero je obvezno prijaviti pristojnim oblastem in ki praviloma napade pljuča in spodnje dihalne poti, lahko pa so prizadeti tudi drugi organski sistemi. Tb se diagnosticira na podlagi rezultatov anamnestičnih, fizičnih, radioloških, histoloških in mikobakterioloških preiskav.

Test QuantiFERON®-TB Gold IT meri imunske celične reakcije (CMI) na peptidne antigene, ki simulirajo mikobakteriološke proteine. Ti proteini (ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p4)) manjkajo v vseh BCG-sevih in v večini netuberkuloznih mikoloških bakterijah, z izjemo *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum*.¹ V krvi oseb, ki so okužene z organizmi kompleksa *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), so navadno prisotni limfociti, ki prepoznajo te in ostale mikobakteriološke antigene. Pri tem procesu prepoznavanja se producira in sprošča citokin IFN- γ . Ugotavljanje le-tega, kateremu sledi kvantificiranje IFN- γ , je podlaga za ta test.

Antigeni, uporabljeni v testu QuantiFERON®-TB Gold IT so koktejl peptidov, ki simulira proteine ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p4). Številne študije so pokazale, da ti peptidni antigeni simulirajo reakcijo IFN- γ v T-celicah oseb, okuženih z *M. tuberculosis*, ne pa tudi T-celic neokuženih oseb ali oseb, ki so bile cepljene z BCG ter nimajo niti Tb niti pri njih ne obstaja tveganje za LTBI.¹⁻³² Reakcija IFN- γ pa se lahko z medicinsko terapijo ali zaradi bolezni, ki ogrožajo imunsko funkcijo, potencialno zmanjša. Pacienti z drugimi okužbami z določenimi mikobakterijami lahko prav tako reagirajo na ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4), saj so geni, ki kodirajo te proteine, prisotni tudi v *M. kansasii*, *M. szulgai* in *M. marinum*.^{1,23} Test QuantiFERON®-TB Gold IT je zaradi tega dragocena pomoč pri diagnozi okužbe s kompleksom *M. tuberculosis* pri obolelih pacientih. Pozitivni rezultat testa podpira diagnozo obolenosti za Tb, vendar ga lahko izzovejo tudi druge mikobakterije (na primer *M. kansasii*). Za potrditev oziroma izključitev Tb so zato potrebne dodatne medicinske in diagnostične preiskave.

Princip testa

Sistem QuantiFERON®-TB Gold IT vsebuje specialne epruvete za odvzem krvi, v katere se odvzamejo vzorci polne krvi. Inkubacija vzorcev krvi v epruveti, ki sledi odvzemu, traja 16 do 24 ur. Po tem času se odvzame plazma, ki se pregleda glede na prisotnost IFN- γ , ki se tvori pri reakciji na peptidne antigene.

Test QuantiFERON®-TB Gold IT je sestavljen iz dveh faz. V 1. fazi se odvzame polna kri v različne epruvete za odvzem krvi QuantiFERON®-TB Gold. Sem sodijo epruveta nične kontrole, epruveta antigena Tb in opsijska epruveta mitogena.

Epruveta mitogena se lahko pri testu QuantiFERON®-TB Gold IT uporablja kot pozitivna kontrola. Prikaz le-te je možen, kadar je pacientov imunski status vprašljiv. Epruveta mitogena pa se lahko uporablja tudi kot kontrola pravilnega ravnanja z vzorcem krvi in pravilne inkubacije.

Epruveto je treba čim prej, obvezno pa v 16 urah po odvzemu krvi inkubirati pri temperaturi 37°C. Po 16- oziroma 24-urnem inkubacijskem času se epruvete centrifugirajo. Nato se odvzame plazma in s pomočjo metode ELISA ugotovi količina IFN- γ (v IE/ml).

Test velja za pozitivnega pri reakciji IFN- γ na Tb-antigeno epruveto takrat, če se ta vrednost nahaja znatno nad vrednostjo nične kontrole (IFN- γ in IE/ml). Pri uporabi epruvete z mitogenom služi mitogensko simulirani vzorec plazme kot pozitivna kontrola IFN- γ za vsak testirani vzorec. Mejna reakcija na mitogen (< 0,5 IE/ml) velja kot neodločni rezultat, če vzorec krvi izkazuje tudi negativno reakcijo na Tb-antigene. Takšen vzorec lahko nastane pri nezadostnem številu levkocitov, zmanjšani aktivnosti levkocitov zaradi nestrokovnega ravnanja z vzorcem, nestrokovnega polnjenja ali mešanja epruvete mitogena ali pa takrat, ko pacientovi limfociti niso sposobni proizvajati IFN- γ . Nični vzorec obsega korekcijo nespecifičnih zakulisnih reakcij, heterofilnih učinkov⁷ ter nespecifične IFN- γ v vzorcu krvi. Vrednost IFN- γ v nični epruveti se odšteje od vrednosti IFN- γ v epruveti Tb-antigena in epruvete mitogena (če se uporablja).

Trajanje testa

V nadaljevanju besedila so navedeni podatki o ocenjenem trajanju testa QuantiFERON®-TB Gold IT in o času, ki je potreben pri testiranju več vzorcev v modusu Batch.

Inkubacija epruvet z vzorci pri 37 °C: 16 - 24 ur

ELISA: pribl. 3 ure za eno ploščo ELISA

- < 1 ura dela
- plus 10 – 15 min. za dodatno ploščo

3. REAGENTI IN SHRANJEVANJE

Tuberkuloza in epruvete za določanje kontrolnega antigena v krvi

Kataloška številka 0590 0301

- | | |
|---|-------------|
| 1. Epruveta za nično kontrolo (siv pokrovček) | 100 epruvet |
| 2. Epruveta za Tb-antigen (rdeč pokrovček) | 100 epruvet |
| 3. Epruveta za kontrolo mitogena (vijoličast pokrovček) | 100 epruvet |

OPOZORILO: Možen je tudi naslednji način naročanja epruvet:

*100 epruvet za nično kontrolo + 100 epruvet za Tb-antigen (kat. številka 0590 0201)
100 epruvet za kontrolo mitogena (kat. številka 0593 0201)*

Kat. številka 0590 0201: (za velike nadmorske višine) 100 epruvet za nično kontrolo, 100 epruvet za Tb-antigen

Kat. številka 0590 0505: (za velike nadmorske višine) 100 epruvet za nično kontrolo, 100 epruvet za Tb-antigen in 100 epruvet za kontrolo mitogena

Kat. številka T0593 0501: (za velike nadmorske višine) 100 epruvet za kontrolo mitogena

Sestavni deli kompleta ELISA

Kat. številka 0594 0201

- | | |
|--|----------------|
| 1. Mikro trakovi | 24 x 8 vdolbin |
| 2. Humani IFN- γ -Standard, liofiliziran | 1 steklenička |
| 3. Zelena raztopina za redčenje | 1 x 30 ml |
| 4. Koncentrat konjugata (stokrat koncentriran), liofiliziran | 1 x 0,3 ml |
| 5. Pralni pufer (dvajsetkrat koncentriran) | 1 x 100 ml |
| 6. Raztopina encimskega substrata | 1 x 30 ml |
| 7. Raztopina za blokiranje encimov | 1 x 15 ml |

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

- Inkubator 37 °, CO₂ ni potreben.
- Kalibrirane pipete z variabilnim volumnom (10 µl do 1000 µl) in s konicami za enkratno uporabo
- Kalibrirane večkanalne pipete za oddajanje 50 µl in 100 µl in s konicami za enkratno uporabo
- Vibrator za mikro plošče
- Deionizirana ali destilirana voda (2 litra)
- Pralni aparat za mikro plošče (prednost ima avtomatski)
- Čitalnik za mikro plošče s filtrom 450-nm in referenčnim filtrom 620 do 650 nm

Skladiščenje

Epruvete za odvzem vzorcev krvi

- Epruvete za odvzem krvi skladiščite pri 4 - 25 °C.
- Rok trajanja epruвет za odvzem krvi QuantiFERON[®]-TB Gold znaša 15 mesecev od datuma izdelave (skladiščenje pri 4 – 25 °C).

Sestavni deli kompleta ELISA

- Komplet skladiščite pri 2 – 8 °C.
- Raztopina encimskega substrata naj bo vedno zavarovana pred direktnimi sončnimi žarki.
- Rok trajanja kompleta QuantiFERON[®]-TB Gold IT ELISA znaša 3 leta od datuma izdelave (skladiščenje pri 2 - 8°C).

Rekonstruirani in odvečni reagenti

Navodila za rekonstruiranje kompleta reagentov so navedena v poglavju 6 pod naslovom "Priprava reagentov".

- Rok trajanja rekonstruiranega standardnega kompleta znaša tri mesece pri temperaturi skladiščenja med 2 in 8 °C.
 - Zabeležite si datum rekonstruiranja kompleta reagentov.
- Po rekonstruiranju je treba odvečni koncentrat (100x) spet skladiščiti pri 2-8°C in ga porabiti v treh mesecih.
 - Zabeležite si datum rekonstruiranja konjugata.
- Konjugat, pripravljen za uporabo, je treba porabiti v 6 urah po pripravi.
- Rok uporabe pralnih puferjev, pripravljenih za uporabo in shranjenih pri sobni temperaturi, je največ dva tedna.

4. PREVIDNOSTNI UKREPI IN OPOZORILA

Previdnostni ukrepi

- Negativni rezultat testa QuantiFERON®-TB Gold IT ne izključuje okužbe z *M. tuberculosis* ali obolenja s Tb; navidezno negativne rezultate lahko pogojujejo faza okužbe (na primer če je bil vzorec krvi odvzet pred razvojem celične imunske reakcije), motena imunska funkcija zaradi drugih bolezni, nestrokovno ravnanje z epruvetami po odvzemu krvi, nepravilna izvedba testa ali druge imunološke različice.
- Pozitivni rezultat testa QuantiFERON®-TB Gold IT naj ne bo edina podlaga za oceno okužbe z *M. tuberculosis*; napačna izvedba testa lahko ima za posledico nepravilne pozitivne rezultate.
- Pozitivni rezultat testa QuantiFERON®-TB Gold IT mora biti preverjen še z drugimi medicinskimi in diagnostičnimi preiskavami; le tako je možno zagotovo ugotoviti aktivno obolenje s Tb (na primer odvzem in kultura izpljunka in rentgenske preiskave toraksa).
- ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p4) sicer nista prisotna v BCG-sevih in v večini znanih netuberkuloznih mikobakterijah, vendar si lahko pozitivni rezultat testa QuantiFERON®-TB Gold IT razlagamo tudi z okužbo z *M. kansasii*, *M. szulgai* ali *M. marinum*. Če obstaja sum na take okužbe, je treba uporabiti alternativne testne metode.

Opozorila

- **Samo za diagnostično uporabo *in vitro*.**
- **Previdno: Raztopina encimskega substrata** vsebuje tetrametilni bencidin 3,3',5,5', ki je v primeru zaužitja, vdihavanja in pri stiku s kožo nevaren. Draži kožo in oči. Učinkuje mutagensko. Nosite zaščitna očala in laboratorijske rokavice ter ravnajte z raztopino tako, kot da je potencialno karcinogena.
- **Previdno: Raztopina ki blokira encime**, vsebuje H₂SO₄, ki je v primeru zaužitja, vdihavanja in pri stiku z očmi in kožo nevaren. Nosite zaščitna očala, laboratorijske rokavice in laboratorijsko zaščitno obleko. Pri nenamernem stiku z očmi ali kožo spirajte prizadeto mesto z veliko vode in poiščite zdravnika.
- **Previdno: IFN- γ Standard in 100-krat koncentrirani koncentrat konjugata** lahko v primeru zaužitja povzročita težave, pri stiku s kožo pa draženje. Nosite laboratorijske zaščitne rokavice in zaščitno obleko.
- **Vzorci človeške krvi vedno obravnavajte kot potencialno okužene!** Pri ravnanju s krvjo upoštevajte veljavne smernice.
- Nekateri reagenti vsebujejo konzervans **timerosal**. Timerosal lahko v primeru zaužitja, vdihavanja in stika s kožo deluje toksično.
- **Zelena raztopina za redčenje** vsebuje normalni mišji serum in kazein. Ti dve substanci lahko izzoveta alergične reakcije. Izogibajte se stika s kožo.
- Odstopanja od postopka in navodil, ki so opisana v navodilu, lahko privedejo do napačnih rezultatov. Prosimo, da pred postopkom natančno preberete navodilo za izvedbo testa.
- Kompleta ne uporabljajte, če so bile pred uporabo steklenice z reagentom - ena ali več - poškodovane ali netesne.
- S sestavnimi deli tega paketa ne uporabljajte reagentov ELISA drugih nabojev QuantiFERON®-TB Gold IT.
- Reagente in biološke vzorce, ki jih ne potrebujete več, odložite v skladu z lokalnimi in nacionalnimi predpisi.
- Po preteku roka uporabnosti se epruvete za odvzem krvi in sestavni deli kompleta ELISA ne smejo več uporabljati.

5. ODVZEM VZORCEV IN RAVNANJE Z NJIMI

Odvzem krvi

Test QuantiFERON®-TB Gold IT obsega naslednje epruvete za vzorce krvi:

1. Nična kontrola (siv pokrovček z belim obročkom, za uporabo na nadmorski višini med 0 in 810 m)
2. Specifični antigeni Tb (rdeč pokrovček z belim obročkom) za uporabo na nadmorski višini nad 810 m)
3. Kontrola mitogena - opsijsko (vijoličast pokrovček z belim obročkom) za uporabo na nadmorskih višinah do 810 m
4. Nična kontrola (siv pokrovček z rumenim obročkom) (za uporabo na nadmorskih višinah med 1.020 in 1.875 m)
5. Tb antigen (rdeč pokrovček z rumenim obročkom) (za uporabo na nadmorskih višinah med 1.020 in 1.875 m)
6. Kontrola mitogena - opsijsko (vijoličast pokrovček z rumenim obročkom) (za uporabo na nadmorskih višinah med 1.020 in 1.875 m)

Antigeni se v posušeni obliki nahajajo v oblogi notranje stene epruvete za odvzem krvi. Vzorci krvi se morajo zaradi tega dobro premešati z vsebino epruvete. Epruvete je treba nato čim prej, najkasneje pa 16 ur po odvzemu krvi, prenesti v inkubator (37°C).

Optimalni rezultati bodo doseženi ob upoštevanju naslednjih navodil:

1. Vsakemu pacientu odzemeti po 1 ml venozne krvi v vsako epruveto QuantiFERON®-TB Gold IT.

- Do nadmorske višine 810 m uporabljajte epruvete za odvzem krvi QuantiFERON® Standard. Na nadmorskih višinah od 810 m naprej pa specialne epruvete za odvzem krvi QuantiFERON®, ki se uporabljajo na velikih nadmorskih višinah.

Pri uporabi epruвет za odvzem krvi QuantiFERON® izven navedenih nadmorskih višin oziroma pri majhnem volumnu vzorca lahko kri odzamate tudi s pomočjo brizgalke; takem primeru je treba vsako od treh epruвет napolniti z 1 ml krvi. Iz varnostnih razlogov je najbolje, če pri tem odstranite injekcijsko iglo.; prosimo, da pri tem upoštevate običajne previdnostne ukrepe. Odstranite pokrovček na treh epruветah QFT-Gold IT in vsako epruveto napolnite z 1 ml krvi (do črne oznake na stranskem robu etikete). Nato ponovno namestite pokrovček in premešajte, kot je opisano spodaj.

- Glede na dejstvo, da se epruvete za odvzem 1 ml relativno počasi polnijo s krvjo, pustite epruveto po navideznem doseganju nivoja še 2-3 sekunde na igli. To bo zagotovilo odvzem potrebne količine krvi.

Črna oznaka ob strani epruветe je črta polnjenja 1 ml. Epruvete za odvzem krvi QuantiFERON®-TB Gold so testirane za volumen od 0,8 do 1,2 ml. Če pri odvzemu krvi ta indikatorska črta ni dosežena, priporočamo nov odvzem krvi..

- Pri uporabi metuljčkov za odvzem krvi je treba s pomočjo prazne epruветe poskrbeti za to, da bo pred namestitvijo epruвет QuantiFERON®-TB Gold zagotovljena napolnjenost cevnega spoja.
2. Epruvete premešajte s **5-sekundnim močnim tresenjem** (ali jih 10x pretresite). Prepričajte se, če je **vsota notranja stena epruветe prekrita s krvjo**.

- Skrbno mešanje je pomembno zato, da se vsebina epruvete dobro zmeša z vzorcem krvi.
 - Pri stresanju se lahko vsebina začne nekoliko peniti. To ne ovira testiranja in ni vzrok za vznemirjenje.
3. Epruvete opremite z napisi.
 4. Epruvete morajo biti čim hitreje, najkasneje pa 16 ur po odvzemu krvi, prenesene v inkubator (37°C) Pred inkubacijo shranjujte epruvete na sobni temperaturi ((22°C ± 5°C).
Vzorcev krvi ne shranjujte v hladilniku ali zamrzovalniku.

6. NAVODILO ZA UPORABO

1. faza: Inkubacija vzorca krvi in odvzem plazme

Oprema, vključena v dobavo

Epruvete za vzorce krvi FERON[®]-TB Gold IT (glejte poglavje 3).

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

Glejte poglavje 3.

Postopek

1. Če vzorci krvi ne bodo takoj po odvzemu inkubirani, je treba **epruvete neposredno pred inkubiranjem ponovno premešati oziroma pretresti**, tako kot je opisano v poglavju 5.
2. Epruvete inkubirajte v **STOJEČEM POLOŽAJU** 16 do 24 ur pri 37 °C. CO₂ ali vlaženje pri tem nista potrebna.
3. Epruvete za odvzem krvi se lahko pred centrifugiranjem shranjujejo do 3 dni pri temperaturi 2 - 27°C.
4. Po inkubiranju epruвет pri 37°C se zaradi lažjega odvzema plazme opravi centrifugiranje, ki traja 5 – 15 minut pri 1500 – 2200g (RCF). Zaradi tvorjenja profena se celice ločijo od plazme. Če se to ne zgodi, centrifugiranje ponovite pri višji hitrosti.
 - Odvzem plazme je možen tudi brez centrifugiranja, vendar je treba pri tem zelo previdno postopati, ker se pri odvzemu lahko celice vzvrtinčijo.
5. Vzorci plazme se lahko direktno prenesejo iz epruвет za odvzem krvi v ploščo QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA, še posebno pri uporabi avtomata ELISA.
6. Vzorci plazme se lahko pred izvajanjem metode ELISA alternativno vskladiščijo, bodisi direktno v centrifugiranih epruветah ali pa se prenesejo v posode za shranjevanje plazme (na primer >150 µl v vdolbinah ali v mikro epruветah v stojalu formata 96). Pri shranjevanju vzorcev je treba plošče pokriti. Tako se boste izognili razlitju in izgubam zaradi izhlapevanja.
 - Vzorci plazme se lahko shranjujejo do 4 tednov pri temperaturi 2 – 8°C. Pri temperaturi shranjevanja pod –20°C (še bolje pri nižji od –70°C) pa je možno še daljše skladiščenje.

2. faza: humani IFN- γ ELISA

Dobavljena oprema

Komplet QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA (glejte poglavje 3).

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

Glejte poglavje 3.

Postopek

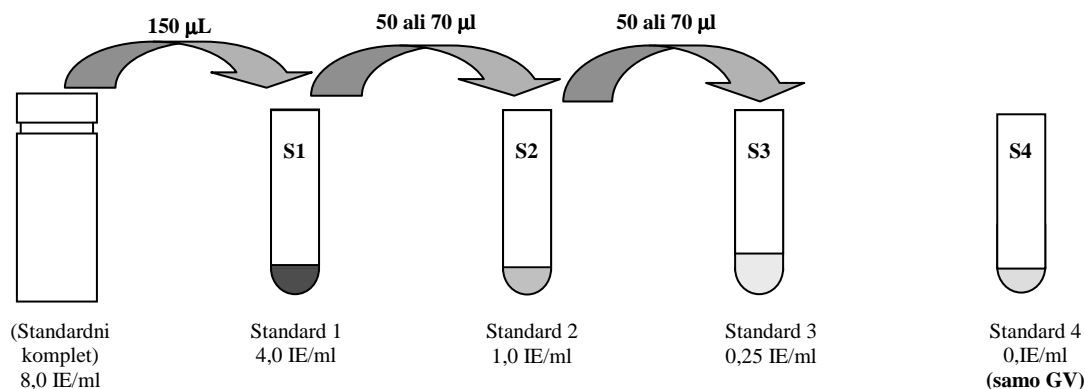
1. Vsi vzorci plazme in reagentov z izjemo 100x koncentrata konjugata morajo pred uporabo doseči sobno temperaturo ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$). Za ta proces načrtujte najmanj 60 minut.
2. Iz okvira odstranite nepotrebne trakove, jih spravite nazaj v folijsko embalažo in jih do uporabe shranjujte v hladilniku.
Za QuantiFERON[®]-TB Gold Standard morate predvideti najmanj en trak in zadostno število trakov za paciente, ki jih boste testirali (glejte slike 2A in 2B za uporabo 2 oziroma 3 epruвет). Po uporabi okvir in pokrov shranite za ostale trakove.
3. Rekonstruirajte standardni komplet s količino deionizirane ali destilirane vode, ki je navedena na etiketi standardne stekleničke. Previdno premešajte stekleničko (minimirajte penjenje) in preverite, če se je vsebina popolnoma razpustila. Rekonstruiranje standarda na navedeni volumen izkazuje raztopino s koncentracijo 8,0 IE/ml.

Opozorilo: volumen rekonstruiranja standardnega kompleta je različen glede na naboj!

Rekonstruiran standardni komplet uporabite za izdelavo serije razredčila 1:4 IFN- γ v zeleni raztopini za redčenje (**GV**) – glejte sliko 1. S1 (standard 1) vsebuje 4 IE/ml, S2 (standard 2) vsebuje 1 IE/ml, S3 (standard 3) vsebuje 0,25 IE/ml und S4 (standard 4) vsebuje 0 IE/ml (samo GV). Standarde je treba najmanj dvakrat testirati.

| PRIPOROČENI POSTOPEK ZA DVOJNI STANDARD | PRIPOROČENI POSTOPEK ZA TROJNI STANDARD |
|--|---|
| <p>a. 4 epruvete opremite z napisi „S1”, „S2”, „S3” in „S4”.</p> <p>b. Napolnite 150μl GV v S1, S2, S3, S4.</p> <p>c. V S1 dajte 150μl standardnega kompleta in skrbno premešajte.</p> <p>d. 50μl prenesite iz S1 v S2 In skrbno premešajte.</p> <p>e. 50μl prenesite iz S2 v S3 in skrbno premešajte.</p> <p>f. Kot nični standard (S4) velja »samo GV«.</p> | <p>a. 4 epruvete opremite z napisi „S1”, „S2”, „S3” in „S4”.</p> <p>b. Napolnite 150μl GV v S1.</p> <p>c. V S2, S3 in S4 dajte 210μl GV.</p> <p>d. 150μl standardnega kompleta dajte v S1 in skrbno premešajte.</p> <p>e. 70μl prenesite iz S1 v S2 in skrbno premešajte.</p> <p>f. 70μl prenesite iz S2 v S3 in skrbno premešajte.</p> <p>g. Kot nični standard velja »samo GV” (S4).</p> |

Slika 1. Izdelava standardne krivulje



- Za vsak postopek ELISA izdelajte novo razredčilo standardnega kompleta.
4. Rekonstruirajte liofiliziran 100x koncentrat konjugata z 0,3 ml deionizirane ali destilirane vode. Previdno premešajte stekleničko (minimirajte penjenje) in preverite, če se je vsebina popolnoma raztopila.

Konjugat je pripravljen za uporabo, ko potrebno količino rekonstruiranega 100x koncentrata razredčite v zeleni raztopini za redčenje, kot je prikazano v tabeli 1 (priprava konjugata).

TABELA 1. Priprava konjugata

| Število trakov | Količina 100x koncentrata konjugata | Količina zelene raztopine za redčenje |
|----------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 2 | 10 µl | 1,0 ml |
| 3 | 15 µl | 1,5 ml |
| 4 | 20 µl | 2,0 ml |
| 5 | 25 µl | 2,5 ml |
| 6 | 30 µl | 3,0 ml |
| 7 | 35 µl | 3,5 ml |
| 8 | 40 µl | 4,0 ml |
| 9 | 45 µl | 4,5 ml |
| 10 | 50 µl | 5,0 ml |
| 11 | 55 µl | 5,5 ml |
| 12 | 60 µl | 6,0 ml |

- Temeljito, vendar previdno premešajte; pri tem se izogibajte penjenju.
 - 100x koncentrat konjugata, ki ga ne potrebujete, takoj po uporabi shranite pri temperaturi 2-8°C.
 - Kot razredčilo uporabljajte samo zeleno raztopino za redčenje.
5. Pred testom je treba plazmo premešati, tako da se IFN-γ enakomerno porazdeli v vzorcu.
 6. V vdolbine ELISA s pomočjo večkanalne pipete dajte po 50 µl sveže pripravljenega konjugata.
 7. Po 50 µl vzorcev plazme z večkanalno pipeto dajte v ustrezne vdolbine (glejte priporočeni načrt obloženosti plošče, sliki 2A in 2B). Nazadnje dodajte še po 50 µl standarda 1 do 4.

**Slika 2A. Priporočljiva obloženost plošče za epruvete za nično kontrolo in kontrolo antigena Tb
(44 testov na ploščo)**

| | 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 (vzorec 1, plazma za nično kontrolo); 1A (vzorec 1, antigenska plazma Tb).

**Slika 2B. Priporočena obloženost plošče za epruvete za nično kontrolo, kontrolo antigenov Tb in kontrolo mitogenov
(28 testov na ploščo)**

| Vrsta | 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 (vzorec 1, plazma za nično kontrolo); 1A (vzorec 1, plazma za kontrolo antigena Tb); 1M (vzorec 1, plazma za kontrolo mitogena).

- Konjugat in vzorce plazme/standarde eno minuto skrbno mešajte v vibratorju za mikro plošče.
- Vsako ploščo pokrijte s pokrovom in plošče 120 ± 5 minut inkubirajte pri sobni temperaturi ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Med inkubacijo morajo biti plošče zavarovane pred direktnimi sončnimi žarki.
- Med inkubacijo razredčite en del 20x koncentriranega koncentrata pralnega puferja z 19 deli deionizirane ali destilirane vode in skrbno premešajte. Dobavi je priloženega dovolj 20x koncentriranega koncentrata pralnega puferja za izdelavo 2 litrov pralnega puferja, pripravljenega za uporabo.

Vdolbine najmanj šestkrat operite s **400 µl** pralnega puferja, pripravljenega za uporabo. Priporočamo uporabo pralnega avtomata za mikro plošče.

- Skrbno pranje je za učinkovitost testiranja zelo pomembno. Pri vsakem pralnem ciklusu preverite, če so vdolbine **popolnoma, torej do zgornjega roba napolnjene s pralnim**

pufanjem. Med posameznimi pralnimi cikli priporočamo fazo namakanja, ki naj traja najmanj 5 sekund.

- V lovilno posodo za odpadno tekočino dajte razkužilo, ki se uporablja v laboratorijih. Poleg tega upoštevajte navodila za dekontaminacijo potencialno kužnega materiala, ki veljajo v vašem laboratoriju.

11. Plošče z vdolbinami obrnjenimi navzdol iztrkajte na papirno brisačo in tako odstranite ostanke pralnega pufanja. V vsako vdolbino nato nalijte 100 μ l raztopine za blokiranje encimov in premešajte ploščo v vibratorju.
12. Vsako ploščo zaprite s pokrovom in jo 30 minut inkubirajte pri sobni temperaturi ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Med inkubacijo je treba plošče zavarovati pred direktnimi sončnimi žarki.
13. Po 30-minutni inkubaciji nalijte v vsako vdolbino 50 μ l raztopine za blokiranje encimov in premešajte.
 - Raztopino za blokiranje encimov nalivajte v vdolbine v enakem zaporedju in približno enako hitro kot substrat v fazi 11.
14. S pomočjo čitalnika za mikro plošče izmerite optično gostoto (OD) vsake vdolbine v 5 minutah po dodajanju raztopine za blokiranje - pri tem uporabljajte filter 450 nm in referenčni filter 620 do 650 nm. Vrednosti OD boste potrebovali pri izračunavanju rezultatov.

7. IZRAČUNAVANJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Cellestis je za vas pripravil softver za analizo QuantiFERON[®]-TB Gold IT, s pomočjo katerega boste lahko analizirali neobdelane podatke in izračunali rezultate.

Softver bo opravil kontrolno oceno kakovosti testiranja in izdelal standardno krivuljo ter za vsakega testiranega pacienta posredoval rezultat na podlagi interpretacijske metode, opisane v nadaljevanju besedila.

Alternativno uporabi softvera za analizo podatkov se lahko rezultati izračunavajo tudi po spodaj opisani metodi:

Izdelava standardne krivulje

(pri neuporabi softvera QuantiFERON[®]-TB Gold IT)

Ugotovite srednje vrednosti OD pri ponovitvah standardnega kompleta na vsaki plošči.

Izdelajte standardno krivuljo $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ z grafičnim prikazom srednje vrednosti OD $\log_{(e)}$ (os y) proti $\log_{(e)}$ koncentracije standarda IFN- γ v IE/ml (os x) - nični standard pri tem izpustite. S pomočjo regresivne analize izračunajte linijo, ki se oblikovno najbolj prilagaja standardni krivulji.

Standardno krivuljo uporabite za izračun koncentracije IFN- γ (IE/ml) za vsak testirani vzorec plazme, pri čemer uporabite vrednost OD vsakega vzorca..

Za te izračune lahko uporabljate pakete softverov, ki so v ponudbi za čitalnike mikro plošč, pa tudi standardni program Spreadsheet oziroma statistične programe (na primer Microsoft Excel). Uporabo teh paketov softvera priporočamo za izračunavanje regresijske analize in variacijskih koeficientov (%VK) za standard ter korelacijskih koeficientov (r) za standardno krivuljo.

Kontrola kakovosti

Pravilnost testnih rezultatov je odvisna od izdelave pravilne standardne krivulje. Zato je treba rezultate, ki so pridobljeni s standardi, preveriti pred interpretiranjem testnih rezultatov.

ELISA velja, če so izpolnjeni vsi naslednji kriteriji:

- **Srednja vrednost OD standarda 1 mora biti $\geq 0,600$.**
- **VK v % repliciranih vrednostih OD standarda 1 in standarda 2 mora znašati $\leq 15\%$.**
- **Replicirane vrednosti OD standarda 3 in standarda 4 ne smejo več kot 0,040 enot OD odstopati od srednje vrednosti vsakega od njiju.**
- **Korelacijski koeficient (r), izračunan iz srednjih ekstinkcijskih vrednosti, mora znašati $\geq 0,98$.**

Softver za analizo QuantiFERON[®]-TB Gold IT izračunava zgoraj navedene parametre za kontrolo kakovosti.

Če ti kriteriji niso izpolnjeni, je test neveljaven in ga je treba ponoviti.

- **Srednja vrednost OD ničnega standarda (zelena raztopina za redčenje) naj znaša $\leq 0,150$. Če je srednja vrednost OD $> 0,150$ priporočamo, da preverite postopek za pranje plošč.**

Interpretacija rezultatov

Testni rezultati QuantiFERON®-TB Gold IT se interpretirajo po naslednjih kriterijih:

OPOZORILO: Diagnoza oziroma izključitev okužbe s Tb kakor tudi ocena verjetnosti LTBI zahteva kombinacijo epidemioloških, anamnestičnih, medicinskih in diagnostičnih rezultatov; pri interpretaciji testnih rezultatov QuantiFERON®-TB Gold IT jih je treba obvezno upoštevati.

PRI UPORABI EPRUVET ZA NIČNO KONTROLO IN KONTROLO ANTIGENA Tb

| ničla [IE/ml] | Antigen Tb minus ničla [IE/ml] | Rezultat QuantiFERON®-TB Gold IT | Poročilo/interpretacija |
|-------------------------|--|---|---|
| ≤ 8,0 | < 0,35 | negativen | Okužba z <i>M. tuberculosis</i> -NI verjetna |
| | ≥ 0,35 in < 25% vrednosti nične kontrole | | |
| | ≥ 0,35 in ≥ 25% vrednosti nične kontrole | pozitiven ¹ | Okužba z <i>M. tuberculosis</i> verjetna |
| > 8,0 ² | poljubno | neodločen ³ | Neodložni rezultati antigenske reakcije na Tb |

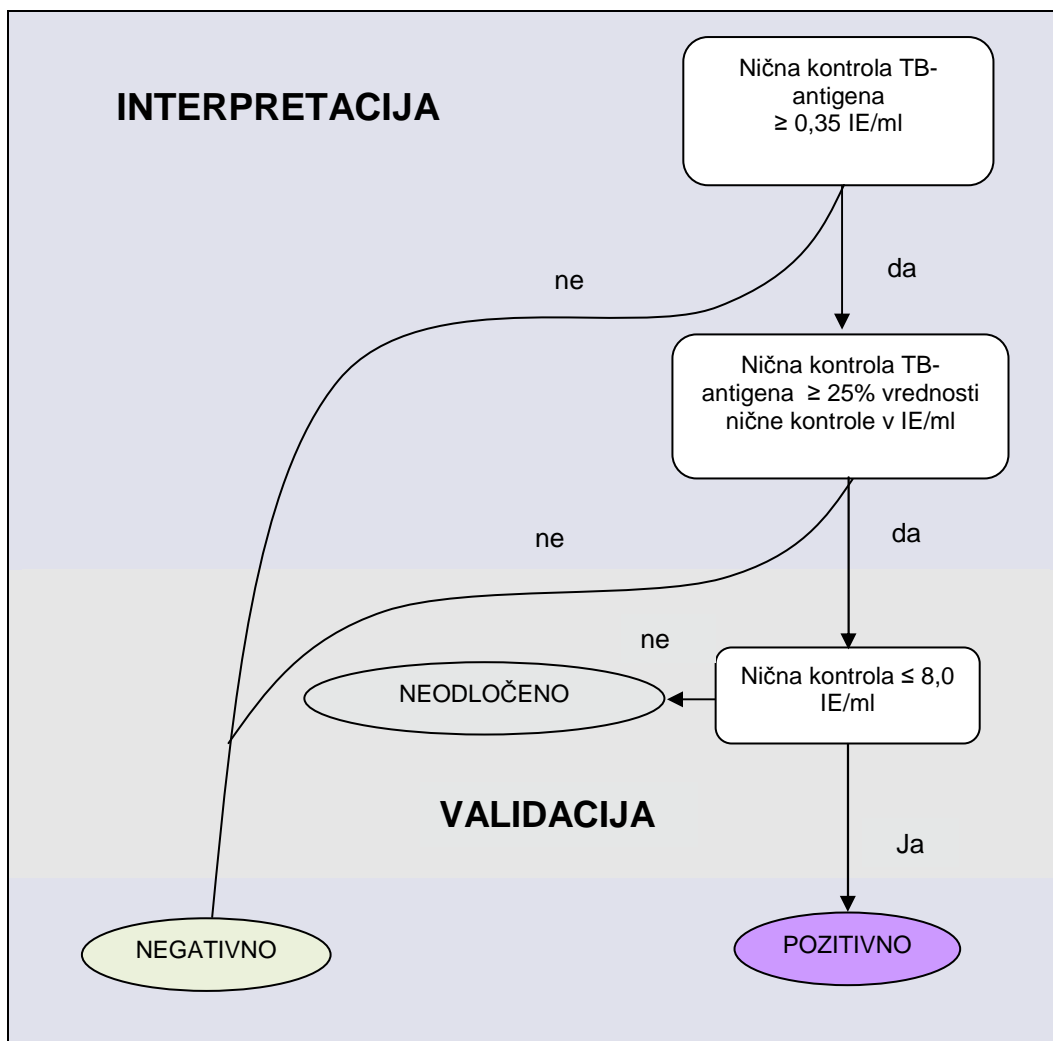
¹ V primerih, kjer ne obstaja sum na okužbo s *M. tuberculosis* ne obstaja, se lahko začetni pozitivni rezultati testa potrdijo z novim dvojnimi testiranjem originalnih vzorcev plazme v QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Če ponovitev testa pri prvem ali drugem vzorcu pokaže pozitiven rezultat, je rezultat testiranja pozitiven.

² V kliničnih študijah manj kot 0,25 % udeležencev pri nični kontroli izkazuje koncentracijo IFN- γ > 8,0 IE/ml.

³ Možni vzroki so navedeni v poglavju Odstranitev težav.

Na podlagi višine izmerjene koncentracije IFN- γ niso možni nobeni zaključki glede stadija ali stopnje okuženosti, obsega imunske reaktivnosti ali verjetnosti za progresivnost pri aktivni obolevnosti.

Slika 3. **DIAGRAM PRETOKA ZA INTERPRETACIJO (PRI UPORABI EPRUVET ZA NIČNO KONTROLO IN KONTROLO ANTIGENA Tb)**



PRI UPORABI EPRUVET ZA NIČNO KONTROLO, KONTROLO ANTIGENA Tb IN KONTROLO MITOGENA:

| <u>ničla</u> [IE/ ml] | <u>Antigen Tb minus ničla</u> [IE/ml] | <u>Mitogen minus ničla</u> [IE/ ml] ¹ | QuantiFERON®-Tb Gold IT rezultat | Poročilo/interpretacija |
|---|---|--|-------------------------------------|--|
| ≤ 8,0 | < 0,35 | ≥ 0,5 | negativen | Okužba z <i>M. tuberculosis</i> NI verjetna |
| | ≥ 0,35 in < 25% vrednosti nične kontrole | ≥ 0,5 | | |
| | ≥ 0,35 in ≥ 25% vrednosti nične kontrole | poljubno | pozitiven ² | Okužba z <i>M. tuberculosis</i> verjetna |
| | < 0,35 | < 0,5 | neodločen ³ | Neodločni rezultati reakcije antigena Tb |
| ≥ 0,35 in < 25% vrednosti nične kontrole | < 0,5 | | | |
| > 8,0 ⁴ | poljubno | poljubno | | |

¹ Reakcija pozitivne kontrole mitogena (občasno pa tudi antigena Tb) se pogosto nahaja izven merilnega območja čitalnika za mikro plošče. Vendar pa to na rezultate testa ne vpliva.

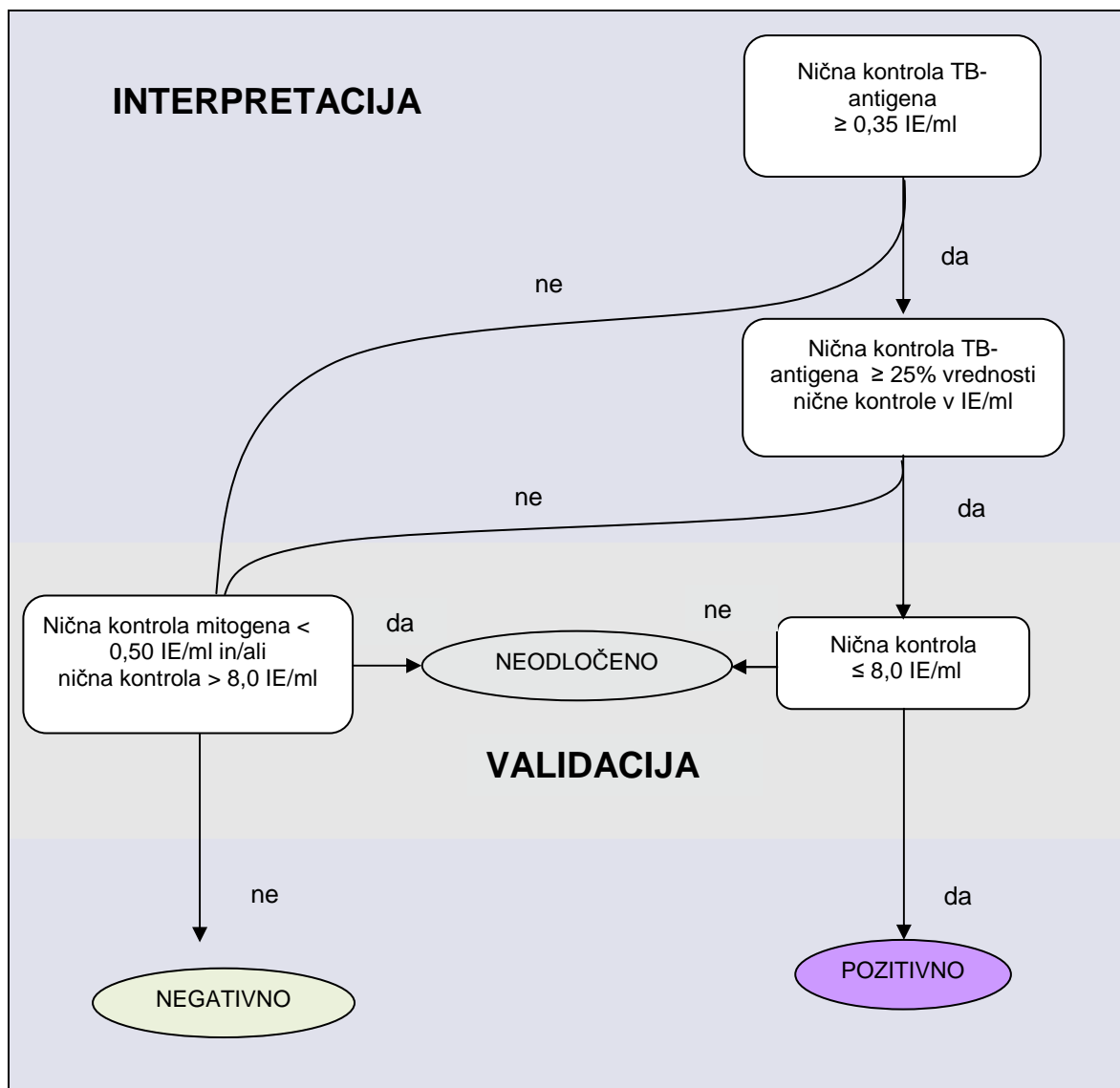
² V primerih, v katerih sum za okužbo z *M. tuberculosis* ne obstaja, se lahko začetni pozitivni rezultati testa potrdijo z novim dvojnimi testiranjem originalnih vzorcev plazme v QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Če ponovitev testa pri prvem ali drugem vzorcu pokaže pozitiven rezultat, velja da testiranje pozitivno.

³ Možni vzroki so navedeni v poglavju Odstranitev težav.

⁴ V kliničnih študijah manj kot 0,25 % udeležencev pri nični kontroli izkazuje koncentracijo IFN-γ > 8,0 IE/ml.

Na podlagi višine izmerjene koncentracije IFN-γ ni možno delati nobenih zaključkov glede stadija ali stopnje okuženosti, obseg imunske reaktivnosti ali verjetnosti za progresivnost pri aktivni obolelosti.

Slika 4: DIAGRAM PRETOKA ZA INTERPRETACIJO (PRI UPORABI EPRUVET ZA NIČNO KONTROLO, KONTROLO ANTIGENA Tb IN MITOGENA)



8. OMEJITVE POSTOPKA

Rezultati testa QuantiFERON®-TB Gold IT se morajo obravnavati v kombinaciji z epidemiološko anamnezo posameznega pacienta, njegovega trenutnega zdravstvenega stanja in drugih diagnostičnih preiskav.

Rezultati z nično vrednostjo nad 8 IE/ml se ocenjujejo kot »neodločni«, ker se antigenska reakcija Tb, povišana za 25 %, lahko nahaja izven merilnega območja testiranja.

Nezanesljivi ali neodločni rezultati lahko imajo naslednje vzroke:

- odstopanja od postopka, ki je opisan v navodilu za uporabo,
- izredno visoke koncentracije krožečega IFN- γ ali prisotnost heterofilnih protiteles,
- prekoračenje 16-urnega roka med odvzemom krvi in inkubacijo pri 37°C.

9. ZNAČILNOSTI

Klinične študije

Z ozirom na to, da za latentno okužbo s tuberkulozo (LTBI) ne obstaja noben dokončen standard, analiza občutljivosti in specifikke testa QuantiFERON®-TB Gold IT praktično ni možna. Specifika QuantiFERON®-TB Gold IT je bila izračunana približno s pomočjo evaluacije stopnje napačno-pozitivnih rezultatov pri osebah z majhnim tveganjem (to pomeni brez znanih dejavnikov tveganja) za okužbo z tuberkulozo. Občutljivost je bila izračunana približno z evaluacijo skupin pacientov z aktivno obolelostjo s tb, ki je bila nato potrjena s kulturo.

Specifičnost

V študiji z 866 udeleženci, ki je bila opravljena v Ameriki, je bilo pri opravljanju TST odvzet vzorec krvi za test QuantiFERON®-TB Gold IT. Demografski podatki in faktorji tveganja za Tb so bili pridobljeni s pomočjo standardnih vprašanj ob izvedbi testiranja. Od 432 udeležencev brez znanih dejavnikov tveganja okužbe z *M. tuberculosis* so bili na voljo rezultati za 391 oseb, ki so opravile testiranje z QuantiFERON®-TB Gold IT- in TST. Nobena od teh oseb ni bila cepljena z BCG. Druga študija specifikke s testom QuantiFERON®-TB Gold IT je bila opravljena na Japonskem na udeležencih z majhnim tveganjem; približno 90% teh oseb je bilo cepljenih z BCG. Rezultati obeh študij specifikke so prikazani v tabeli 2.

TABELA 2. Specifika testa QuantiFERON®-TB Gold IT: rezultati udeležencev brez znanih faktorjev tveganja za okužbo z *M. tuberculosis*.

| ŠTUDIJA | BCG status: % cepljenih | Število estiranih oseb | Število neodločeni h rezultatov QFT-G | Število QFT-G-pozitivnih/število veljavnih testov | Specifika QFT-G (95% CI**) | Število TST-pozitivnih/število testov | Specifika TST* (95% CI**) |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| ZDA (neobjavljenot) | 0% | 391 | 1 | 3/390 | 99,2% (97,6-99,8) | 6/391 | 98,5% (96,5-99,4) |
| Japonska (neobjavljeno) | ~90% | 190 | 4 | 3/186 | 98,4% (95-99,6) | -- | -- |
| SKUPAJ | | 581 | 5/584 (0,9%) | 6/576 | 99,0% | -- | -- |

* za podlago je bila vzeta mejna vrednost TST 10 mm. Pri uporabi mejne vrednosti 15 mm znaša ocenjena specifika TST 99,1%.

** CI = interval konfidence

Občutljivost za aktivno Tb

Za izračun občutljivosti testa QuantiFERON®-TB Gold IT so bile testirane osebe iz Avstralije in Japonske, pri katerih je obstajal sum za Tb in pri katerih je bila nato okužba z *M. tuberculosis* potrjena s kulturo. Za latentno okužbo s tuberkulozo (LTBI) sicer ni dokončnega standarda, mikrobiološka kultura *M. tuberculosis* pa je vseeno primerno nadomestilo, ker so obolele osebe okužene po definiciji. Pacienti so bili pred odvzemom krvi za test QuantiFERON®-TB Gold IT zdravljeni manj kot 8 dni.

V tabeli 3 so prikazani rezultati dveh skupin pacientov s pozitivno kulturo *M. tuberculosis*. Skupna občutljivost testa QuantiFERON®-TB Gold IT za aktivno obolenje s Tb je znašala 89% (48/54).

TABELA 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: osebe z okužbo s *M. tuberculosis*, ki je bila potrjena s kulturo.

| ŠTUDIJA | Obolenje potrjeno z | Število QFT-Gold-pozitivnih /število veljavnih testov | Občutljivost QFT-Gold (95% CI*) |
|--|---------------------|---|---------------------------------|
| Japonski pacienti s Tb/ študija validacije | kultura | 24/27 | 89% (72-96%) |
| Avstralski pacienti s Tb/ študija validacije | pulmonalno | 7/10 | 70% (40-89%) |
| | ekstra-pulmonalno | 17/17 | 100% (82-100%) |
| SKUPAJ | | 48/54 | 89% (78-95%) |

*CI = interval konfidence

Diagnoza LTBI

Objavljena je bila cela vrsta študij, ki izpričujejo delovanje QuantiFERON®-TB Gold IT pri različnih populacijah za tveganje za LTBI. Najvažnejši podatki nekaterih izbranih študij so prikazani v tabeli 4.

TABELA 4. Izbrane objavljene študije za uporabo QuantiFERON®-TB Gold IT pri populacijah s tveganjem za LTBI

| ŠTUDIJA | Testirane osebe | Rezultati |
|--|-----------------|--|
| Medicinsko osebje v Indiji (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁷ | 726 | Okolje z zelo visoko stopnjo Tb. 40% QFT-Gold IT-pozitivnih oziroma 41% TST-pozitivnih pri mejni vrednosti 10 mm. Visoka konkordanca s TST, brez učinka BCG na teste. Oba testa v zvezi z dejavnikoma tveganja »starost« in »trajanje dela v zdravstvu«. |
| HIV-pozitivni na Danskem (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵ | 590 | Skupna premoč HIV-pozitivnih za LTBI je znašala pri QFT-Gold IT 4,6% (27/590). Pozitivni rezultati so bili povezani s tveganji za Tb. Dva pozitivna pacienta QFT-Gold IT sta v letu dni razvila aktivno Tb. Neodločni rezultati (n=20, 3,4 %) so bili tesno povezani s CD4-število <100 / μ L. |

| | | |
|---|-----|--|
| Stacionarno zdravljeni otroci (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹⁰ | 105 | Otroci s sumom na Tb ali otroci, ki so predhodno imeli stik s Tb, so bili testirani s QFT-Gold IT in TST. 10,5% QFT-Gold IT-pozitivnih oziroma 9,5% TST-pozitivnih pri mejni vrednosti 10 mm. Ujemanje med testoma znaša skupaj 95,2% oziroma 100% pri otrocih, ki niso bili cepljeni z BCG. |
| Nemci s stikom s Tb (Diel <i>et al</i> 2006) ⁹ | 309 | Testirane so bile bližnje kontaktne osebe s 15 različnimi indeksnimi primeri. 51% je bilo cepljenih z BCG, 27 % rojenih v tujini. 70% cepljenih z BCG in 18% necepljenih je bilo TST-pozitivnih (5 mm) in 9% oziroma 11% je bilo QFT-Gold IT-pozitivnih. QFT-Gold IT je bil opravljen v povezavi s tveganjem za Tb. TST je bil opravljen samo v povezavi s cepljenjem BCG. |

Učinki manj občutljive verzije tekočega antigena QuantiFERON®-TB Gold (predhodnik testa QuantiFERON®-TB Gold IT) in testa QuantiFERON®-TB Gold IT so opisani v mnogih nadaljnjih objavah. Te študije zajemajo tudi uporabo testa pri kontaktnih osebah pacientov z aktivno Tb^{7,9,10,13,14,17,20,25}, otrok^{10,23,25}, HIV-pozitivnih^{5,18}, medicinskega osebja^{16,27,28}, imunsko suprimiranih oseb²⁹, oseb s sumom na Tb^{7,22,31} in oseb z majhnim tveganjem.^{17,22}

Ponovljivost in učinek TST na kasnejše teste QuantiFERON®-TB Gold IT.

V okviru ameriške študije specifične je bila pregledana podskupina udeležencev 4 do 5 tednov po prvotnem testu. Za 260 udeležencev so bili tako na voljo rezultati testov QuantiFERON®-TB Gold IT in TST v dveh trenutkih testiranja, ujemanje je znašalo 99,6% (259/260). Test TST, opravljen pred tem, ni pokazal večjega porasta pozitivnih rezultatov QuantiFERON®-TB Gold IT.

10. TEHNIČNE INFORMACIJE

Neodločni rezultati

Neodločni rezultati naj bi se pojavljali redko, vzrok zanje pa so naslednji tehnični dejavniki:

- prekoračenje 16-urnega roka med odvzemu krvi in inkubacijo pri 37°C,
- skladiščenje vzorcev krvi izven predpisanega temperaturnega območja (22 ± 5°C),
- pomanjkljivo mešanje epruvet za odvzem krvi,
- pomanjkljivo pranje plošče ELISA.

Pri domnevnih tehničnih težavah pri odvzemu krvi ali med rokovanjem z vzorci je treba celoten test QuantiFERON®-TB Gold IT ponoviti z novim vzorcem krvi. Test ELISA simuliranih vzorcev plazme pa se lahko ponovi, kadar se domneva pomanjkljivo pranje ali kakšno drugo odstopanje od predpisane testne metode ELISA. Neodločni rezultati, ki si jih lahko razlagamo z nizkimi vrednostmi mitogena ali z visokimi ničnimi vrednostmi, se pri ponovnem testiranju ne smejo ponoviti, razen če je pri testu ELISA prišlo do napake. Neodločni rezultati naj se kot taki posredujejo naprej. Zdravnik lahko nato odvzame še en krvni vzorec ali po potrebi opravi druge preiskave.

Strjeni vzorci plazme

Če se pri daljšem skladiščenju vzorcev plazme pojavijo fibrinski strdki, je treba vzorce centrifugirati, tako da začne nastajati sediment. To bo olajšalo pipetiranje plazme.

ELISA-odstranitev težav

Nespecifična barvna reakcija

| MOŽNI VZROKI | RAZTOPINA |
|--|--|
| Nezadostno pranje plošč | Ploščo operite najmanj 6x s 400 µl puferja na vsako vdolbino. Glede na vrsto uporabljenega pralnega aparata bo morda potrebno več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje. |
| Križna kontaminacija vdolbin ELISA | Natančno pipetiranje in mešanje vzorcev tveganje minimalizira. |
| Pretek roka uporabnosti kompleta/sestavin kompleta | Preverite, če rok uporabnosti kompleta še ni pretekel. Poskrbite, da bosta standard in 100x koncentrat konjugata uporabljena v 3 mesecih po rekonstruiranju. |
| Kontaminirana raztopina encimskega substrata | Modrikasto obarvan substrat zavrzite. Poskrbite, da bodo uporabljeni čisti rezervoarji reagentov. |

Nizke vrednosti OD standardov

| MOŽNI VZROKI | RAZTOPINA |
|--|--|
| Napaka pri redčenju standarda | Redčenje kompleta standarda opravite natančno po priloženih navodilih. |
| Napaka pri pipetiranju | Preverite, če so pipete kalibrirane in uporabljene točno v skladu z navodili proizvajalca. |
| Prenizka inkubacijska temperatura | Inkubacija za metodo ELISA naj po opravljena pri sobni temperaturi (17 - 27°C). |
| Prekratek čas inkubacije | Čas inkubacije plošče s konjugatom, standardi in vzorci naj znaša 120 ± 5 minut. Raztopina encimskega substrata naj se na plošči inkubira 30 minut. |
| Napačen filter plošče | Plošča naj se odčita pri 450 nm z referenčnim filtrom 620-650 nm. |
| Prehladni reagenti | Vsi reagenti (razen 100x koncentrata konjugata) se morajo pred začetkom testa segreti na sobno temperaturo. To traja približno 60 minut. |
| Pretečen rok uporabnosti kompleta/sestavnih delov kompleta | Preverite, če rok uporabnosti kompleta še ni pretekel. Poskrbite, da bosta standard in 100x koncentrat konjugata uporabljena v 3 mesecih po rekonstruiranju. |

Močna obarvanost ozadja

| MOŽNI VZROKI | RAZTOPINA |
|---|--|
| Nezadostno pranje plošč | Ploščo operite najmanj 6x s 400 µl puferja na vsako vdolbino. Glede na uporabljen pralni aparat bo morda potrebno več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje. |
| Previsoka temperatura inkubacije | Inkubacija za metodo ELISA naj poteka pri sobni temperaturi (17 - 27°C). |
| Pretečen rok uporabnosti kompleta/sestavin kompleta | Preverite, če rok uporabnosti kompleta še ni pretekel. Poskrbite, da bosta standard in 100x koncentrat konjugata uporabljena v 3 mesecih po rekonstruiranju. |
| Kontaminirana raztopina encimskega substrata | Modrikasto obarvan substrat zavržite. Poskrbite, da bodo uporabljeni čisti rezervoarji reagentov. |

Nelinearna standardna krivulja in odstopanja med obema dvojnima testoma

| MOŽNI VZROKI | RAZTOPINA |
|---|--|
| Nezadostno pranje plošč | Ploščo operite najmanj 6x s 400 µl puferja na vsako vdolbino. Glede na uporabljen pralni aparat bo morda potrebno več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje. |
| Napaka pri redčenju standarda | Redčenje kompleta standarda opravite natančno po priloženih navodilih. |
| Nezadostno mešanje | Skrbno premešajte reagente z večkratnim obračanjem ali rahlim vrtinčenjem in jih šele nato dispenzirajte v vdolbine. |
| Neenakomerna tehnika pipetiranja ali prekinitvev med izvajanjem testa | Dispenziranje vzorcev in standardov naj bo kontinuirano. Vsi reagenti morajo biti pred začetkom testa pripravljeni za uporabo. |

Video posnetek z demonstracijo postopka testiranja in rešitvami za večino tehničnih problemov boste našli na CD romu skupaj z informacijami o izdelku in tehničnim navodilom. CD rom lahko dobite direktno pri Cellestis-u ali prek svojega dobavitelja.

11. BIBLIOGRAFIJA

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

20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.
22. **Manuel, O., et al.** Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007. 7; 2797-801.
23. **Matulis, G., et al.** Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann Rheum Dis.* 2007. 67; 84-90.
24. **Mirtskhulava, V., et al.** Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 513-519.
25. **Nakaoka, H., et al.** Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis.* 2006. 12; 1383-8.
26. **Pai, M., et al.** Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. *JAMA.* 2005. 293; 2746-55.
27. **Ponce de Leon, D., et al.** Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol.* 2008. 35; 776-81.
28. **Richeldi, L., et al.** Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur Respir J.* 2008. 32; 524-5.
29. **Rothel, J.S. and Andersen, P.** Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005. 3; 981-93.
30. **Schoepfer, A.M., et al.** Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2008. 103; 2799-806.
31. **Silverman, M.S., et al.** Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin Biochem.* 2007. 40; 913-5.
32. **Stebler, A., et al.** Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008. 29, 681-3.

12. TEHNIČNA SERVISNA SLUŽBA

Naslovi naših servisov:

Cellestis International Pty Ltd: Tel.: +61 3 9571 3500
 Faks: +61 3 9571 3544
 E-Mail: quantiferon@cellestis.com
 Spletna stran: www.cellestis.com

Cellestis GmbH:
 (Evropa) Tel.: +49 6151 428-59-0
 Faks: +49 6151 428 59-110
 E-Mail: europa@cellestis.com

13. TESTNI POSTOPEK (SKRAJŠANA OBLIKA)

1. FAZA: INKUBIRANJE VZORCA KRVI

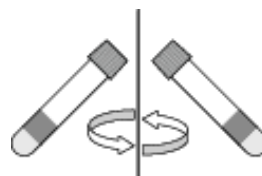
1. Z epruveto za odvzem krvi odzemi vzorec krvi od pacienta. Epruveto nato temeljito zmešajte s **5- sekundnim močnim stresanjem** (Oziroma jo 10x stresite). Vsa **notranja stena epruvete** mora biti prekrita s krvjo.



2. Epruvete v **stoječem položaju** 16 - 24 ur inkubirajte pri 37°C.



3. Po inkubaciji centrifugirajte epruvete 5 - 15 minut pri 1500 - 2200g (RCF) in tako ločite plazmo od rdečih krvničk.



4. Po centrifugiranju odzemi iz vsake epruvete vzorec plazme za kvantificiranje IFN- γ .



2. FAZA: IFN- γ -ELISA

1. Sestavine ELISA (razen 100x koncentriranega koncentrata konjugata) najmanj 60 minut stabilizirajte pri sobni temperaturi.

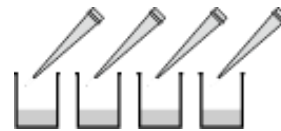


2. Rekombinantni humani IFN- γ -standard rekonstruirajte z destilirano ali deionizirano vodo na 8,0 IE/ ml. Izdelajte 4 razredčene standarde.

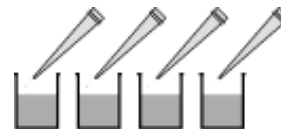


3. Liofilizirani 100x koncentrirani koncentrat konjugata rekonstruirajte z destilirano ali deionizirano vodo.

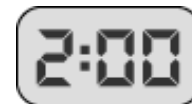
4. Z zeleno raztopino za redčenje izdelajte konjugat in v vsako vdolbino dajte po 50 μ l .



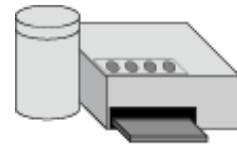
5. V ustrezne vdolbine dajte po 50 μ l vzorca plazme in 50 μ l standarda. Premešajte v vibratorju.



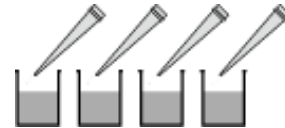
6. 120 minut inkubirajte pri sobni temperaturi.



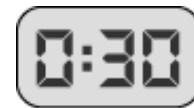
7. Vdolbine najmanj 6x operite s po 400 μ l puferja za pranje na vsako vdolbino.



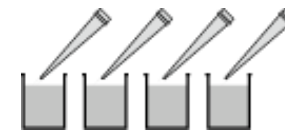
8. V vse vdolbine dajte po 100 μ l raztopine encimskega substrata.



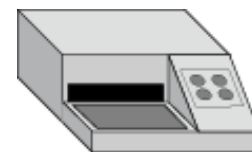
9. 30 minut inkubirajte pri sobni temperaturi.



10. V vse vdolbine dajte po 50 μ l raztopine za blokiranje in premešajte s pomočjo vibratorja.



11. Rezultate merite pri 450 nm z reagenčnim filtrom 620-650 nm.



12. Analizirajte rezultate.





Proizvaja za:

Cellestis Limited (Avstralija) in Cellestis GmbH (Evropa)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Avstralija
Tel. (Avstralija) +61 3 9571 3500, (Evropa) +49 6151 428 59-0
E-Mail: quantiferon@cellestis.com
Spletna stran: www.cellestis.com

Štev. dokumenta 05990301C
August 2009



Pooblaščen zastopnik:
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Germany