

QuantiFERON[®]-TB Gold

***(Metóda „In-Tube“
= v skúmavke)***

**Test IFN-Gamma pre plnokrvné vzorky
na meranie reakcií na peptidantigény
ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p.4)**

PRÍBALOVÝ LETÁK

Diagnostikum *In Vitro*



OBSAH

1. ÚČEL POUŽITIA	2
2. ZHRNUTIE A VYSVETLENIE TESTU	2
Princíp testu	3
Časová náročnosť	3
3. REAGENCIE A SKLADOVANIE	4
Potrebné, avšak nedodané materiály	5
Skladovanie	5
Skúmavka na odber krvi	5
Súprava reagensí	5
Rekonštituované a nepotrebné reagensie	5
4. BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VÝSTRAŽNÉ UPOZORNENIA	6
Bezpečnostné opatrenia	6
Výstražné upozornenia	6
5. ODBER A MANIPULÁCIA SO VZORKOU	7
6. NÁVOD NA POUŽITIE	9
1. Krok: Inkubácia vzorky krvi a odobratie plazmy	9
2. Krok: Human-IFN- γ -ELISA	10
7. VÝPOČTY A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV	13
Zostavenie štandardnej krivky	13
Kontrola kvality	14
Interpretácia výsledkov	15
8. HRANICE METÓDY	19
9. CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY	19
10. TECHNICKÉ INFORMÁCIE	21
Nerozhodné výsledky	21
Zrazené vzorky plazmy	21
Odstraňovanie problému podľa metódy ELISA	22
Nešpecifická reakcia farieb	22
Nízke hodnoty optickej hustoty pri štandardoch	22
Silné sfarbenie pozadia	23
Nelineárna štandardná krivka a odchýlky medzi obidvomi dvojnásobnými vzorkami	23
11. BIBLIOGRAFIA	24
12. TECHNICKÁ SLUŽBA ZÁKAZNÍKOM	25
13. TESTOVACIA METÓDA (SKRÁTENÁ FORMA)	26

1. ÚČEL POUŽITIA

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) je test na diagnostiku *in-vitro*, ktorý obsahuje peptidový koktail, ktorý simuluje proteíny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4) a stimuluje bunky v heparinizovanej krvi. Dôkaz interferónu γ (IFN- γ) na základe metódy ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) slúži na rozpoznanie reakcií *in-vitro* na peptínantigény, ktoré sú prítomné pri infekcii *Mycobacterium tuberculosis*.

QuantiFERON®-TB Gold IT je nepriamy test na dôkaz infekcie *M. tuberculosis* (vrátane aktívneho ochorenia). Výsledky testu sa majú posudzovať v súvislosti s posúdením rizika, s röntgenovými vyšetreniami a s ostatnými medicínskymi a diagnostickými vyšetreniami.

2. ZHRNUTIE A VYSVETLENIE TESTU

Tuberkulóza (Tb) je infekčná choroba, ktorú spôsobuje infekcia organizmu prostredníctvom komplexu *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). Infikovanie osobami, ktoré trpia na tuberkulózu dýchacích ciest sa uskutočňuje spravidla kvapôčkovou infekciou. Pri novo infikovaných pacientoch sa môže ochorenie tuberkulózy vyskytnúť do niekoľkých týždňov, alebo mesiacov, ale pri väčšine infikovaných osôb sa nevyskytujú žiadne potiaže. U niektorých perzistuje latentná infekcia tuberkulózy (LTBI), neinfekčné, asymptomatické ochorenie, ktoré môže prepuknúť až po niekoľkých mesiacoch alebo rokoch. Hlavný cieľ rozpoznania LTBI pozostáva v tom, aby sa do úvahy vzalo ošetrenie za účelom prevencie prepuknutia tuberkulózy. Ešte donedávna bol tuberkulínový kožný test (tuberculin skin test, TST) jedinou metódou na diagnostikovanie LTBI. Senzitivita kože na tuberkulín vzniká 2 až 10 týždňov po infekcii. Avšak niektorí infikovaní nereagujú na tuberkulín, napr. pacienti s poruchou reakcie imunity v dôsledku inej choroby, ale aj pacienti bez takýchto porúch. Naopak, niektoré osoby, ktoré s veľkou pravdepodobnosťou netrpia na infekciu *M. tuberculosis*, po zaočkovaní pomocou Bacillus Calmette-Guérin (BCG), po infekcii inými mykobaktériami ako je komplex *M. tuberculosis*, alebo na základe iných neznámych faktorov vykazujú citlivosť na tuberkulín a dosahujú pozitívny výsledok kožného testu na tuberkulín.

LTBI sa musí rozlišovať od ochorenia tuberkulózy, ktoré podlieha povinnému hláseniu a ktorý napáda spravidla pľúca a dolné dýchacie cesty; zasiahnuté však môžu byť aj iné systémy orgánov. Ochorenie tuberkulózy sa diagnostikuje na základe výsledkov historických, fyzických, rádiologických, histologických a mykobakteriologických vyšetrení.

Test QuantiFERON®-TB Gold IT meria imunologické reakcie sprostredkované bunkami (CMI) na peptínové antigény, ktoré simulujú mykobakteriálne proteíny. Tieto proteíny (ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4)) chýbajú vo všetkých kmeňoch BCG a vo väčšine netuberkulózných mykobaktériách s výnimkou *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum*.¹ U osôb, ktoré sú infikované organizmami komplexu *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), sú vo všeobecnosti v krvi prítomné lymfocyty, ktoré rozpoznávajú tieto a iné mykobakteriálne organizmy. Pri tomto procese rozpoznávania sa produkuje a uvoľňuje cytokín IFN- γ . Dôkaz a následná kvantifikácia IFN- γ tvoria základ tohto testu.

Antigény použité v teste QuantiFERON®-TB Gold IT sú koktailom peptidov, ktorý simuluje proteíny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4). Mnoho štúdií preukázalo, že tieto peptínové antigény stimulujú reakciu IFN- γ v T-bunkách osôb infikovaných *M. tuberculosis*, ale nie v T-bunkách neinfikovaných osôb alebo osôb očkovaných pomocou BCG bez ochorenia tuberkulózy alebo bez rizika LTBI.¹⁻³² Avšak reakcia IFN- γ môže byť potenciálne znížená na základe lekárskeho ošetrenia alebo na základe chorôb, ktoré negatívne vplyvajú na funkciu imunity. Pacienti s určitými inými mykobakteriálnymi infekciami môžu tiež reagovať na ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4), pretože gény, na ktorých sa nachádzajú tieto proteíny, sú prítomné aj v *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum*.^{1,23} Test QuantiFERON®-TB Gold IT je preto cenou pomôckou pri diagnostikovaní infekcie komplexom *M. tuberculosis* u chorého pacienta. Pozitívny výsledok testu podporuje diagnostikovanie tuberkulózy, môže však byť vyvolaný aj inými mykobaktériami (napr. *M. kansasii*). Pre potvrdenie, resp. vylúčenie tuberkulózy sú potrebné ďalšie medicínske a diagnostické vyšetrenia.

Princíp testu

Systém QuantiFERON[®]-TB Gold IT obsahuje špeciálne skúmavky na odber krvi, do ktorých sa vykonáva odber vzoriek krvi. Následná inkubácia vzoriek krvi v skúmavkách trvá 16 až 24 hodín. Potom sa odoberie plazma a vyšetrí sa na prítomnosť IFN- γ , ktorý sa vytvoril prípadne v reakcii na peptidové antigény.

Test QuantiFERON[®]-TB Gold IT pozostáva z dvoch krokov. V 1. kroku sa vzorky krvi odoberú do rozličných skúmaviek QuantiFERON[®]-TB Gold. K tomu patrí nulová kontrolná skúmavka, skúmavka na TB-antigén a ako opcia skúmavka na mitogén.

Skúmavka na mitogén sa môže pri teste QuantiFERON[®]-TB Gold IT použiť ako pozitívna kontrola. Môže to byť zvlášť vhodné, ak je stav imunity pacienta otázný. Mitogénová skúmavka sa môže použiť aj ako kontrola správneho zaobchádzania so vzorkou krvi a na správnu inkubáciu.

Skúmavka by sa mala podľa možnosti čo najskôr, bezpodmienečne však do 16 hodín po odbere vzorky krvi inkubovať pri 37 °C. Po 16 až 24 hodinách inkubačnej doby sa dávajú skúmavky do centrifúgy. Potom sa odoberie plazma a stanoví sa množstvo IFN- γ (v IE/ml) pomocou metódy ELISA.

Test sa považuje za pozitívny pre reakciu IFN- γ na skúmavke TB-antigénu, ak je táto hodnota signifikantne nad hodnotou nulovej kontroly (IFN- γ v IE/ml). Pri použití mitogénovej skúmavky slúži vzorka plazmy stimulovaná mitogénom ako pozitívna kontrola IFN- γ pre každú testovanú vzorku. Nepatrná reakcia na mitogén (< 0,5 IE/ml) sa považuje za nerozhodný výsledok, ak vzorka krvi vykazuje tiež negatívnu reakciu na Tb-antigény.

Takáto vzorka môže vzniknúť pri nedostatočnom počte lymfocytov, pri zníženej aktivite lymfocytov v dôsledku neodbornej manipulácie so vzorkou, pri neodbornom naplnení alebo miešaní mitogénovej skúmavky, alebo vtedy, ak lymfocyty pacienta nie sú v stave produkovať IFN- γ . Nulová vzorka obsahuje korektúru pre nešpecifické reakcie pozadia, pre heteforilné efekty protilátok ⁷, ako aj nešpecifický IFN- γ vo vzorke krvi. Hodnota IFN- γ nulovej skúmavky sa odpočítava z hodnoty IFN- γ skúmavky Tb-Antigénov a mitogénovej skúmavky (pokiaľ sa použije).

Trvanie testu

Ďalej nájdete údaje ohľadom odhadovanej doby testu QuantiFERON[®]-TB Gold IT, ako aj ohľadom potrebného času pri testovaní viacerých vzoriek v moduse batch.

Inkubácia skúmaviek so vzorkami pri 37 °C:

16 – 24 hodín

ELISA:

cca. 3 hodiny na jednu dosku ELISA

- < 1 hod. pracovný čas
- plus 10 – 15 min. na ďalšiu dosku

3. REAGENCIE A SKLADOVANIE

Skúmavka na odber krvi na vyšetrenie tuberkulózy a skúmavka s kontrolným antigénom

Obj. č. : 0590 0301

- | | |
|---|---------------|
| 1. Nulová kontrolná skúmavka (sivý uzáver) | 100 skúmaviek |
| 2. Skúmavka s TB-antigénom (červený uzáver) | 100 skúmaviek |
| 3. Mitogénová kontrolná skúmavka (fialový uzáver) | 100 skúmaviek |

UPOZORNENIE: Skúmavky je možné objednať aj v nasledujúcom zložení:

*100 nulových kontrolných skúmaviek + 100 skúmaviek s Tb-antigénom (Obj. č.: 0590 0201)
100 mitogénových kontrolných skúmaviek (Obj. č.: 0593 0201)*

Obj. č.: 05900210: (pre veľké výšky) 100 nulových kontrolných skúmaviek, 100 skúmaviek s Tb-antigénom

Obj. č.: 05900505: (pre veľké výšky) 100 nulových kontrolných skúmaviek, 100 skúmaviek s Tb-antigénom a 100- mitogénových kontrolných skúmaviek

Obj. č.: T0593 0502: (pre veľké výšky) 100 mitogénových kontrolných skúmaviek

Súčasti ELISA

Obj. č.: 0594 0201

- | | |
|--|------------------|
| 1. Mikrotitrovacie pásiky | 24 x 8 priehlbín |
| 2. Human-IFN- γ -Standard, lyofilizované | 1 fľaštička |
| 3. Zelený roztok na riedenie | 1 x 30 ml |
| 4. Koncentrát konjugátu (100-násobne koncentrovaný), lyofilizovaný | 1 x 0,3 ml |
| 5. Koncentrát na umývanie (20-násobne koncentrovaný) | 1 x 100 ml |
| 6. Roztok substrátu enzýmu | 1 x 30 ml |
| 7. Zastavovací roztok enzýmu | 1 x 15 ml |

Potrebné, avšak nedodané materiály

- 37 °C inkubátor; nie je potrebný žiaden CO₂.
- Kalibrované pipety s variabilným objemom (10 µl do 1000 µl) s jednorazovými špičkami
- Kalibrovaná viackanálová pipeta na odovzdávanie 50 µl a 100 µl s jednorazovými špičkami
- Vytriasadlo pre mikrotitrovacie dosky
- Deionizovaná alebo destilovaná voda (2 litre)
- Umývačka pre mikrotitrovacie dosky (prednostne automatizovaná)
- Čítačka pre mikrotitrovacie dosky filtrom 450 nm a referenčným filtrom 620 až 650 nm

Skladovanie

Skúmavka na odber krvi

- Skúmavku na odber krvi skladujte pri 4 – 25 °C.
- Životnosť skúmaviek QuantiFERON[®]-TB Gold je 15 mesiacov od dátumu výroby (skladovanie pri 4 – 25 °C).

Súčasti súpravy ELISA

- Súpravu skladujte pri 2 – 8 °C.
- Chráňte roztok so substrátom enzýmu vždy pred priamym slnečným žiarením.
- Životnosť súpravy ELISA QuantiFERON[®]-TB Gold IT je 3 mesiace od dátumu výroby (skladovanie pri 2 – 8°C).

Rekonštituované a nepotrebné reagensy

Pokyny ohľadom rekonštituovania reagensí súpravy nájdete v kapitole 6 v časti „Príprava reagensí“.

- Rekonštituovaný štandard súpravy má životnosť pri skladovaní medzi 2 a 8 °C tri mesiace.
 - *Zaznamenajte si dátum rekonštitúcie štandardu súpravy.*
- Po rekonštitúcii sa musí nepotrebný koncentrát (100x) uskladniť znova pri 2-8 °C a tiež sa musí spotrebovať do troch mesiacov.
 - *Zaznamenajte si dátum rekonštitúcie konjugátu.*
- Konjugát pripravený na spotrebu sa musí použiť do 6 hodín po jeho príprave.
- Umývací prostriedok pripravený na použitie má pri izbovej teplote životnosť do dvoch týždňov.

4. BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VÝSTRAŽNÉ UPOZORNENIA

Bezpečnostné opatrenia

- Negatívny výsledok v teste QuantiFERON®-TB Gold IT nevylučuje možnosť infekcie *M. tuberculosis* alebo ochorenia tuberkulózy; chybné negatívne výsledky môžu byť podmienené fázou infekcie (napr. ak bola vzorka odobratá pred vývojom celulárnej imunologickej reakcie), poruchami funkcie imunity, inými ochoreniami, neodbornou manipuláciou so skúmavkami po odbere krvi, nesprávnym vykonaním testu alebo inými imunologickými premennými.
- Pozitívny výsledok testu QuantiFERON®-TB Gold IT by nemal byť jediným podkladom pre posúdenie infekcie *M. tuberculosis*; nesprávnou realizáciou testu môže dôjsť k chybným pozitívnym výsledkom.
- Pozitívny výsledok testu QuantiFERON®-TB Gold IT by mal byť konfrontovaný s ďalšími medicínskymi a diagnostickými vyšetreniami; len tak sa dá zistiť, či je prítomné aktívne ochorenie tuberkulózy (napr. sterom AFB a kultúrou, ako aj röntgenovým vyšetrením thoraxu).
- ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4) nie sú súčasťou obsahnuté v kmeňoch BCG a vo väčšine známych netuberkulózných mykobaktériách, avšak pozitívny výsledok testu QuantiFERON®-TB Gold IT môže vyplývať aj z infekcie *M. kansasii*, *M. szulgai* alebo *M. marinum*. Ak sa predpokladajú takéto infekcie, je potrebné vykonať alternatívne testovacie metódy.

Výstražné upozornenia

- **Len na diagnostické použitie *in vitro*.**
- **Upozornenie: Roztok substrátu enzýmu** obsahuje 3,3',5,5'-tetrametylbenzidín, ktorý je nebezpečný pri prehltnutí, vdýchnutí a pri kontakte s kožou. Dráždi pokožku a oči. Pôsobí mutagénne. Noste ochranné okuliare a laboratórne rukavice a manipulujte s týmto roztokom ako s potenciálne karcinogénnym roztokom.
- **Upozornenie: Roztok na zastavenie enzýmu** obsahuje H₂SO₄, ktorá je nebezpečná pri prehltnutí, vdýchnutí, pri kontakte s očami a s pokožkou. Noste ochranné okuliare, laboratórne rukavice a bežný laboratórny ochranný odev. Po náhodnom kontakte zastavovacieho roztoku s pokožkou alebo s očami ich vypláchnite veľkým množstvom vody a vyhľadajte lekára.
- **Upozornenie: IFN- γ štandard a 100-násobne koncentrovaný koncentrát konjugátu** môžu pri prehltnutí spôsobiť potiaže a pri kontakte s kožou môžu vyvolať iritácie. Noste laboratórne rukavice a bežný laboratórny ochranný odev.
- **Považujte ľudské vzorky krvi vždy ako potenciálne infekčné!** Dodržiavajte platné predpisy ohľadom manipulácie s krvou.
- Niektoré reagenty obsahujú ako konzervačný prostriedok **thimerosal**. Thimerosal môže pri prehltnutí, vdýchnutí a pri kontakte s pokožkou pôsobiť toxicky.
- **Zelený roztok na riedenie** obsahuje normálne myšacie sérum a kazeín; tieto substancie môžu vyvolať alergické reakcie. Zabráňte preto kontaktu s pokožkou.
- Odchýlky od popísanej metódy a inštrukcií v príbalovom letáku môžu mať za následok chybné výsledky. Prosíme, pred použitím si dôkladne prečítajte návod na testovanie.
- Nepoužívajte súpravu, ak je jedna, alebo viacero fliaš s reagentami pred použitím poškodená alebo netesná.
- So súčasťami tohto balenia nepoužívajte žiadne reagenty ELISA z iných šarží QuantiFERON®-TB Gold IT.
- Nepoužité reagenty a biologické vzorky likvidujte podľa miestnych a národných predpisov.
- Po dátume spotreby sa nesmú skúmavky na odber krvi a súčasti súpravy ELISA viac použiť.

5. ODBER A MANIPULÁCIA SO VZORKOU

Odber krvi

Test QuantiFERON®-TB Gold IT obsahuje nasledujúce skúmavky na odber krvi:

1. Nulová kontrolná skúmavka (sivý uzáver s bielym krúžkom) (pre výšky do nadmorskej výšky do 810 metrov nad morom)
2. Skúmavka so špecifickým TB-antigénom (červený uzáver s bielym krúžkom) (pre výšky do nadmorskej výšky do 810 metrov nad morom)
3. Mitogénová kontrolná skúmavka (fialový uzáver s bielym krúžkom) (opcia) (pre výšky do nadmorskej výšky do 810 metrov nad morom)
4. Nulová kontrolná skúmavka (sivý uzáver so žltým krúžkom) (pre nadmorské výšky medzi 1.020 a 1.875 metrov)
5. Tb-antigén (červený uzáver so žltým krúžkom) (pre nadmorské výšky medzi 1.020 a 1.875 metrov)
6. Mitogénová kontrolná skúmavka – opcia (fialový uzáver so žltým krúžkom) (pre nadmorské výšky medzi 1.020 a 1.875 metrov)

Antigény sa nachádzajú vo vysušenej forme v povrchovej úprave vnútornej steny skúmavky na odber krvi. Preto sa musia vzorky krvi dôkladne premiešať s obsahom skúmavky. Skúmavky sa potom čo najskôr, najpozdejšie do 16 hodín od odberu vzorky krvi, umiestnia do inkubátora (37°C).

Optimálne výsledky sa dosiahnu pri dodržaní nasledujúcich pokynov:

1. Od každého pacienta odoberte po 1 ml venóznej krvi do každej skúmavky QuantiFERON®-TB Gold IT.

- Do nadmorskej výšky 810 m by sa mali používať skúmavky na odber krvi QuantiFERON® Standard. V nadmorských výškach od 1020 m by sa mali používať špeciálne skúmavky na odber krvi QuantiFERON® pre veľké nadmorské výšky.

Pri používaní skúmaviek na odber krvi QuantiFERON® mimo menovaných rozsahov nadmorských výšok, alebo pri nižších objemoch odberu krvi sa môže krv odobrať aj pomocou striekačky; potom sa do každej z troch skúmaviek naplní po 1 ml krvi. Z bezpečnostných dôvodov sa za týmto účelom najlepšie odstraňuje ihla zo striekačky; dodržiavajte pritom bežné bezpečnostné opatrenia. Odstráňte uzáver z troch skúmaviek QFT-Gold IT a do každej skúmavky dajte po 1 ml krvi (až po čiernu značku na boku etikety). Potom znovu nasadte uzáver a premiešajte tak, ako je popísané nižšie.

- Keďže 1 ml skúmavky relatívne pomaly naberajú krv, ponechajte skúmavku po domnelom dosiahnutí stavu naplnenia ešte 2-3 sekundy na ihle. To Vám zaručí, že sa odoberie dostatočné množstvo krvi.

Čierne označenie na boku skúmavky je línia naplnenia 1 ml. Skúmavky na odber krvi QuantiFERON®-TB Gold boli validované na objemy od 0,8 do 1,2. Ak sa pri odbere krvi nedosiahne táto indikačná čiara, odporúča sa zobrať novú vzorku krvi.

- Pri použití ihly Butterfly na odber krvi je potrebné pomocou prázdnej skúmavky zabezpečiť, aby sa spojenie hadičkou naplnilo skôr, ako sa osadia skúmavky QuantiFERON®-TB Gold.

2. Premiešajte skúmavky **silným pretriasaním počas 5 sekúnd** (alebo 10x pretrepte). Presvedčte sa, že **celá vnútorná stena skúmavky** je pokrytá krvou.

- Dôkladné premiešanie je dôležité, aby sa obsah skúmavky úplne premiešal so vzorkou krvi.
- Pri pretrepávaní je potrebné očakávať určitú tvorbu peny. Táto nemá vplyv na testovanie a nie je dôvodom na znepokojenie.

3. Skúmavku označte štítkom s popisom.
4. Skúmavky sa potom musia čo najskôr, najneskôr však do 16 hodín od odberu vzorky krvi, umiestniť do inkubátora (37°C). Pred inkubáciou skladujte skúmavky pri izbovej teplote (22 °C ± 5 °C). Vzorky krvi neskladujte v chladničke alebo v mrazničke!

6. NÁVOD NA POUŽITIE

1. Krok: Inkubácia vzorky krvi a odobratie plazmy

Dodané materiály

Skúmavky na odber krvi QuantiFERON®-TB Gold IT (pozri kapitola 3).

Potrebné, ale nedodané materiály

Pozri kapitola 3.

Postup

1. Ak sa vzorky krvi neinkubujú okamžite po odbere, musia sa **skúmavky bezprostredne pred inkubáciou znovu premiešať, resp. pretrepať** tak, ako je to popísané v kapitole 5.
2. Inkubujte skúmavky **V STOJATEJ POLOHE** 16 až 24 hodín pri teplote 37 °C. Nie je tu potrebný CO₂ alebo zvlhčovanie.
3. Skúmavky na odber krvi sa môžu pred centrifúgovaním skladovať do 3 dní pri teplote 2 – 27 °C.
4. Po inkubácii skúmaviek pri 37 °C sa tieto kvôli ľahšiemu odberu plazmy centrifúgujú 5 – 15 minút pri 1500 – 2200g (RCF). Vytváraním štepov sa oddelia bunky od plazmy. Ak sa tak nestane, musia sa skúmavky centrifúgovať znova pri vyššej rýchlosti.
 - Plazma sa môže odobrať aj bez centrifúgovania, avšak pritom je potrebné postupovať opatrne, aby pri odbere plazmy nedošlo k rozvíreniu buniek.
5. Vzorky plazmy sa môžu priamo zo skúmaviek na odber krvi presunúť do dosky QuantiFERON®-TB Gold ELISA, hlavne pri použití automatu ELISA.
6. Alternatívne sa môžu vzorky plazmy uskladniť pred ELISA buď priamo v centrifúgovaných skúmavkách, alebo sa dajú do nádoby na úschovu plazmy, napr. >150 µl do priehlbín alebo do mikrónových skúmaviek v stojane v 96-kovom formáte. Pri uskladňovaní vzoriek je potrebné dosky zakryť, aby sa predišlo pretriasaniu a stratám pri vyparovaní.
 - Vzorky plazmy sa môžu pri teplote 2 – 8 °C skladovať až do 4 týždňov; pri teplote skladovania pod -20 °C (prednostne menej ako -70 °C) je možné ešte dlhšie skladovanie.

2. Krok: Human-IFN- γ ELISA

Dodané materiály

Súprava QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA (pozri kapitola 3).

Potrebné, avšak nedodané materiály

Pozri kapitola 3.

Postup

1. Všetky vzorky plazmy a reagentie s výnimkou 100-násobného koncentráту konjugátu musia pred použitím dosiahnuť izbovú teplotu (22 ± 5 °C). Naplánujte si na to minimálne 60 minút.
2. Vyberte nepoužité pásy z rámu, vložte ich späť do fóliového obalu a uskladnite ich až do použitia v chladničke.
Pre testovaného pacienta naplánujte minimálne jeden pásik QuantiFERON[®]-TB Gold Standards a dostatočný počet pásov (pozri obrázky 2A a 2B pre použitie 2 resp. 3 skúmaviek). Po použití odložte rám a kryt pre ostávajúce pásiky.
3. Rekonštituujte lyofylizovanú štandardnú súpravu množstvom deionizovanej alebo destilovanej vody, ktoré je uvedené štandardnej fľaštičky. Opatrne premiešajte fľaštičku (minimalizácia tvorby peny) a presvedčte sa, že obsah sa úplne rozpustil. Rekonštitúcia štandardu na uvedený objem vytvorí roztok s koncentráciou 8,0 IE/ml.

UPOZORNENIE: Rekonštitučný objem štandardu súpravy sa líši podľa šarže!

Použite rekonštituovanú štandardnú súpravu na výrobu série roztoku 1:4 IFN- γ v zelenom roztoku na riedenie (GV) – pozri obrázok 1. S1 (Štandard 1) obsahuje 4 IE/ml, S2 (Štandard 2) obsahuje 1 IE/ml, S3 (Štandard 3) obsahuje 0,25 IE/ml a S4 (Štandard 4) obsahuje 0 IE/ml (len GV). Štandardy by sa mali testovať minimálne dva krát.

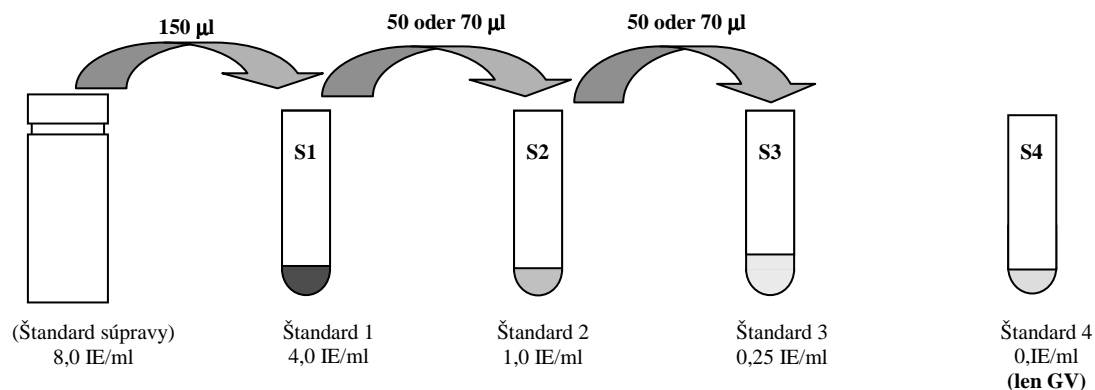
ODPORÚČANÝ POSTUP PRE DVOJITÉ ŠTANDARDY

- a. Označte 4 skúmavky ako „S1”, „S2”, „S3” a „S4”.
- b. Dajte **150 μ l** GV do S1, S2, S3, S4.
- c. Dajte **150 μ l** štandardu súpravy do S1 a dôkladne to premiešajte.
- d. Preneste **50 μ l** z S1 do S2 a dôkladne to premiešajte.
- e. Preneste **50 μ l** z S2 do S3 a dôkladne to premiešajte.
- f. „Len GV” platí ako nulový štandard (S4).

ODPORÚČANÝ POSTUP PRE TROJITÉ ŠTANDARDY

- a. Označte 4 skúmavky ako „S1”, „S2”, „S3” a „S4”.
- b. Dajte **150 μ l** GV do S1.
- c. Dajte **210 μ l** GV do S2, S3, S4.
- d. Dajte **150 μ l** štandardu súpravy do S1 a dôkladne to premiešajte.
- e. Preneste **70 μ l** z S1 do S2 a dôkladne to premiešajte.
- f. Preneste **70 μ l** z S2 do S3 a dôkladne to premiešajte.
- g. „Len GV” platí ako nulový štandard (S4).

Obrázok 1. Zostavenie štandardnej krivky



- Pre každú reláciu ELISA vyrobte nové riedenie štandardu súpravy.

4. Rekonštituujte lyofilizovaný 100-násobný koncentrát konjugátu s 0,3 ml deionizovanej alebo destilovanej vody. Opatrne premiešajte fľaštičku (minimalizácia tvorby peny) a presvedčte sa, že obsah sa úplne rozpustil.

Konjugát pripravený na použitie sa vyrobí tak, že sa potrebné množstvo rekonštituovaného 100-násobného koncentráту konjugátu zriedi v zelenom roztoku na riedenie tak, ako to zobrazuje tabuľka 1 (Príprava konjugátu).

TABUĽKA 1. Príprava konjugátu

Počet pásov	Množstvo na 100-násobný koncentrát konjugátu	Množstvo zeleného roztoku na riedenie
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

- Dôkladne, ale starostlivo premiešajte; pritom zabráňte tvorbe peny.
 - Nepotrebný 100-násobný koncentrát konjugátu okamžite po použití uskladnite pri 2-8 °C.
 - Na riedenie používajte iba zelený roztok na riedenie.
5. Pred testom je potrebné zamiešať plazmu, aby sa IFN- γ rozdelil rovnomerne vo vzorke.
 6. Dajte po 50 µl čerstvo pripraveného konjugátu pripraveného na použitie pomocou viackanálovej pipety do príslušných priehlbínok ELISA.
 7. Dajte po 50 µl vzoriek plazmy pomocou viackanálovej pipety do príslušných priehlbínok (pozri odporúčaný plán obsadenia dosky, nasledujúce obrázky 2A a 2B). Na záver pridajte po 50 µl štandardov 1 až 4.

Obrázok 2A. Odporúčané obsadenie dosky pre skúmvky nulovej kontroly a TB-antigénov (44 testov na dosku)

Rad	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 (Štandard 1), S2 (Štandard 2), S3 (Štandard 3), S4 (Štandard 4).
- 1N (vzorka 1, plazma nulovej kontroly); 1A (vzorka 1, plazma Tb-antigén).

Obrázok 2B. Odporúčané obsadenie dosky pre skúmvky nulovej kontroly, Tb-antigénu a mitogénu (28 testov na dosku)

Rad	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 (Štandard 1), S2 (Štandard 2), S3 (Štandard 3), S4 (Štandard 4).
- 1N (vzorka 1, plazma nulovej kontroly); 1A (vzorka 1, plazma Tb-antigén); 1M (vzorka 1, kontrolná plazma mitogén).

- Miešajte konjugát a vzorky plazmy/štandardy dôkladne 1 minútu vo vytriasadle pre mikrotitrovacie dosky.
- Zakryte každú dosku krytom a inkubujte dosky 120 ± 5 minút pri izbovej teplote ($22 \pm 5^\circ \text{C}$).
 - Počas inkubácie je potrebné dosky chrániť pred priamym slnečným žiarením.
- Počas inkubácie zriedte jeden diel 20-násobného koncentrátu umývacieho prostriedku s 19 dielmi deionizovanej alebo destilovanej vody a dôkladne ich premiešajte. V rozsahu dodávky sa nachádza dostatočné množstvo 20-násobného koncentrátu umývacieho prostriedku na výrobu 2 litrov umývacieho prostriedku pripraveného na použitie.

Umyte priehlbiny minimálne 6 krát so **400 µl** umývacieho prostriedku pripraveného na použitie. Odporúčame použiť automatickú umývačku pre mikrotitrovacie dosky.

- Dôležité umytie je veľmi dôležité pre testovanie. Pri každom cykle umývania skontrolujte, aby boli všetky priehlbiny **naplnené úplne až po okraj umývacím prostriedkom**. Medzi jednotlivými cyklami umývania sa odporúča dodržať minimálne 5 sekúnd na namáčanie.
- V zbernej nádrži pre odpadovú kvapalinu by sa mal nachádzať bežný laboratórny dezinfekčný prostriedok. Okrem toho dodržiavajte pokyny Vášho laboratória platné pre dekontamináciu potenciálne infikovaného materiálu.

11. Aby ste odstránili zvyškový umývací materiál, vyklopkajte dosky s priehlbunami nadol na papierovú utierku. Do každej priehlbiny potom dajte 100 µl roztoku substrátu enzýmu a premiešajte dosky vo vytriasadle.
12. Zakryte každú dosku krytom a inkubujte ich 30 minút pri izbovej teplote ($22 \pm 5^\circ \text{C}$).
 - Počas inkubácie je potrebné dosky chrániť pred priamym slnečným žiarením.
13. Po 30-minútovej inkubácii dajte do každej priehlbiny 50 µl zastavovacieho roztoku enzýmu a premiešajte.
 - Zastavovací roztok enzýmu by sa mal do priehlbín dávať v tom istom slede a zhruba v rovnakom tempe, ako to boli pri substráte v kroku 1.
14. Zmerajte optickú hustotu každej priehlbiny do 5 minút po pridaní zastavovacieho roztoku pomocou čítačky pre mikrotitrovacie dosky s použitím jedného filtra 450-nm a jedného referenčného filtra 620 až 650 nm. Hodnoty optickej hustoty sú potrebné pre výpočet výsledkov.

7. VÝPOČTY A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Cellestis má pre Vás k dispozícii softvér QuantiFERON[®]-TB Gold IT na analýzu hrubých dát a výpočet výsledkov.

Softvér vykonáva kontrolné posúdenie kvality vzorky, zostaví štandardnú krivku a poskytne pre každého testovaného pacienta výsledok na základe nižšie popísanej metódy interpretácie.

Ako alternatíva pre použitie softvéru analýzy QuantiFERON[®]-TB Gold IT sa dajú výsledky zistiť aj podľa nižšie popísanej metódy:

Zostavenie štandardnej krivky

(pri nepoužívaní softvéru QuantiFERON[®]-TB Gold IT)

Zistite priemernú hodnotu optickej hustoty opakovaní štandardu súpravy na každej doske.

Zostavte štandardnú krivku $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ na základe grafického zobrazenia $\log_{(e)}$ priemernej hodnoty optickej hustoty (os y) a $\log_{(e)}$ koncentrácie štandardu IFN- γ v IE/ml (os x), pričom nulový štandard sa pri tomto výpočte vynecháva. Vypočítajte líniu najlepšej vhodnej formy pre štandardnú krivku na základe regresnej analýzy.

Použite štandardnú krivku na zistenie koncentrácie IFN- γ (IE/ml) pre každú testovanú vzorku plazmy s použitím hodnoty optickej hustoty každej vzorky.

Pre výpočet sa môžu použiť softvérové balíky, ktoré sú ponúkané pre čítačky mikrotitrovacích dosiek, ako aj štandardné programy Spreadsheet alebo štatistické programy (ako napr. Microsoft Excel). Odporúčame použitie takýchto softvérových balíkov na výpočet regresnej analýzy, variačného koeficientu (% VK) štandardov, ako aj korelačných koeficientov (r) pre štandardnú krivku.

Kontrola kvality

Správnosť výsledkov závisí od zostavenia správnej štandardnej krivky. Preto je potrebné overiť výsledky odvodené od štandardov skôr, ako sa budú smieť interpretovať výsledky testu.

Metóda ELISA je platná, ak sú splnené všetky nižšie uvedené kritériá:

- **Priemerná hodnota optickej hustoty musí byť od štandardu 1 $\geq 0,600$.**
- **VK v % replikovaných hodnôt optickej hustoty štandardu 1 a štandardu 2 musí byť $\leq 15\%$.**
- **Replikované hodnoty optickej hustoty štandardu 3 a štandardu 4 sa nesmú od príslušnej priemernej hodnoty odchyľovať viac ako o 0,040 jednotiek optickej hustoty.**
- **Korelačný koeficient (r) vypočítaný z priemerných hodnôt extinkcie štandardov musí byť $\geq 0,98$.**

Softvér analýzy QuantiFERON®-TB Gold IT vypočíta tieto kontrolné parametre kvality.

Ak nebudú splnené tieto kritériá, je test neplatný a musí sa zopakovať.

- **Priemerná hodnota optickej hustoty nulového štandardu (zelený roztok na riedenie) by mala byť $\leq 0,150$. Ak je priemerná hodnota optickej hustoty $> 0,150$, odporúča sa vykonať kontrolu metódy po umytí dosiek.**

Interpretácia výsledkov

Výsledky testu QuantiFERON®-TB Gold IT sa interpretujú podľa nasledujúcich kritérií:

UPOZORNENIE: Diagnóza, resp. vylúčenie ochorenia tuberkulózy, ako aj posúdenie pravdepodobnosti LTBI si vyžaduje kombináciu epidemiologických, historických, medicínskych a diagnostických výsledkov; tieto sa musia zohľadniť pri interpretácii výsledkov testu QuantiFERON®-TB Gold IT.

PRI POUŽITÍ SKÚMAVIEK NULOVEJ KONTROLY A SKÚMAVIEK NA TB-ANTIGÉN

Nula [IE/ml]	TB-antigén mínus nula [IE/ml]	Výsledok QuantiFERON®-TB Gold IT	Správa / interpretácia
$\leq 8,0$	$< 0,35$	negatívny	Infekcia <i>M. tuberculosis</i> NIE JE pravdepodobná
	$\geq 0,35$ a $< 25\%$ hodnoty nulovej kontroly		
	$\geq 0,35$ a $\geq 25\%$ hodnoty nulovej kontroly	pozitívny¹	Infekcia <i>M. tuberculosis</i> pravdepodobná
$> 8,0$ ²	ľubovoľná	nerozhodný³	Výsledky pre reakciu Tb-antigénu nerozhodné

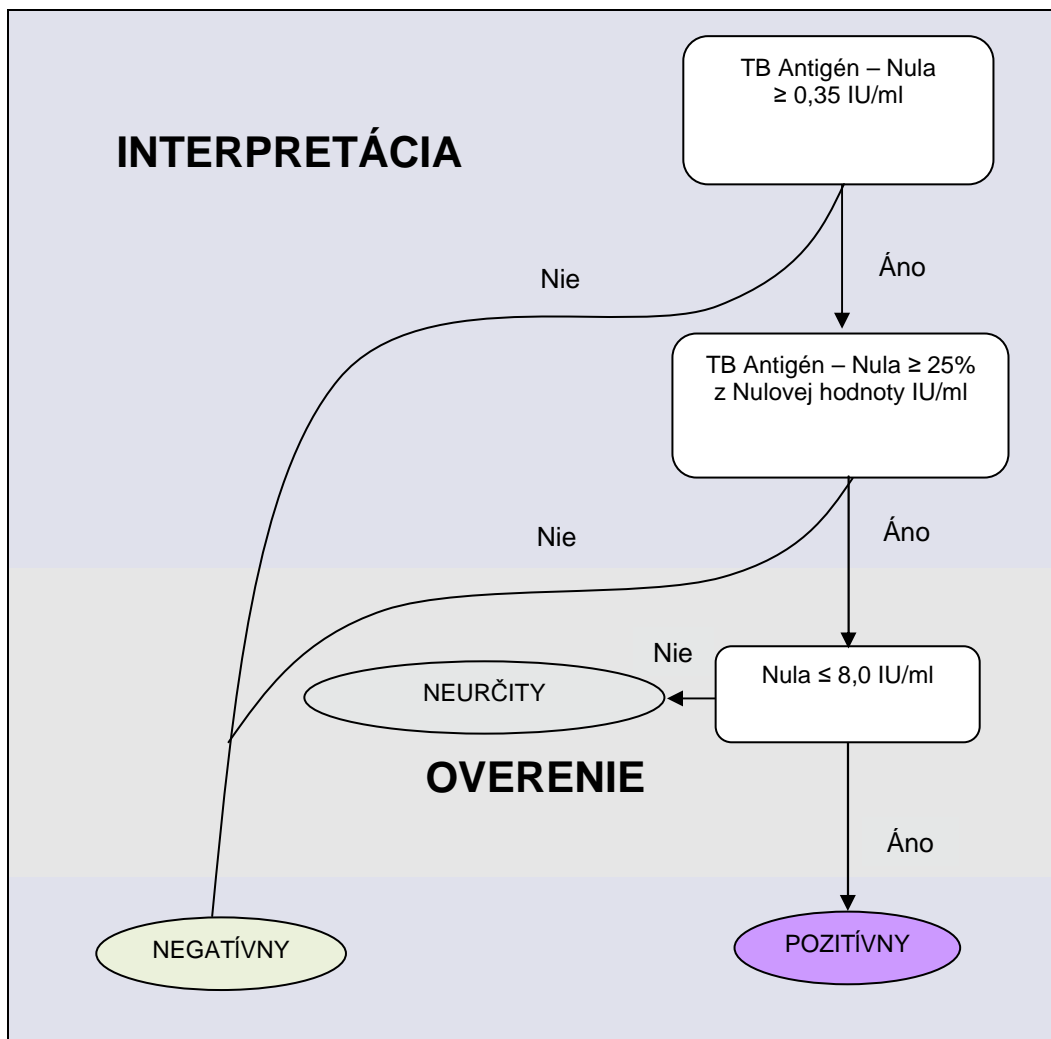
¹ V prípadoch, v ktorých sa nepredpokladá infekcia *M. tuberculosis*, sa môžu na začiatku potvrdiť pozitívne výsledky opätovným dvojitém testovaním originálnych vzoriek plazmy v QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Ak je výsledkom opakovaného testu pri prvej alebo druhej vzorke pozitívny výsledok, tak je potrebné výsledok testu hodnotiť ako pozitívny.

² V klinických štúdiách vykázalo menej ako 0,25 % účastníkov pri nulovej kontrole koncentráciu IFN- γ $> 8,0$ IE/ml.

³ Možné príčiny pozri kapitolu Odstraňovanie problémov.

Z výšky nameranej koncentrácie IFN- γ sa nedajú vyvodiť žiadne závery ohľadom štádia alebo stupňa infekcie, miera reaktivity imunity alebo pravdepodobnosť progresie pri aktívnom ochorení.

Obrázok 3. VÝVOJOVÝ DIAGRAM NA INTERPRETÁCIU (PRI POUŽITÍ SKÚMAVKY NULOVEJ KONTROLY A Tb-ANTIGÉNU)



PRI POUŽITÍ SKÚMAVKY NULOVEJ KONTROLY, Tb-ANTIGÉNU A MITOGÉNOVEJ SKÚMAVKY

Nula [IE/ml]	Tb-antigén mínus nula [IE/ml]	Mitogén mínus nula [IE/ ml]¹	Výsledok QuantiFERON®-Tb Gold IT	Správa / interpretácia
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	negatívny	Infekcia <i>M. tuberculosis</i> NIE JE pravdepodobná
	≥ 0,35 a < 25% hodnoty nulovej kontroly	≥ 0,5		
	≥ 0,35 a ≥ 25% hodnoty nulovej kontroly	ľubovoľná	pozitívny²	Infekcia <i>M. tuberculosis</i> pravdepodobná
	< 0,35	< 0,5	nerozhodný³	Výsledky pre reakciu Tb-antigénu nerozhodné
	≥ 0,35 a < 25% hodnoty nulovej kontroly	< 0,5		
> 8,0 ⁴	ľubovoľná	ľubovoľná		

¹ Reakcia pozitívnej kontroly mitogénu (a prípadne aj Tb-antigénu) je často mimo rozsahu merania čítačky pre mikrotitrovacie dosky. To však nemá žiaden vplyv na výsledky testu.

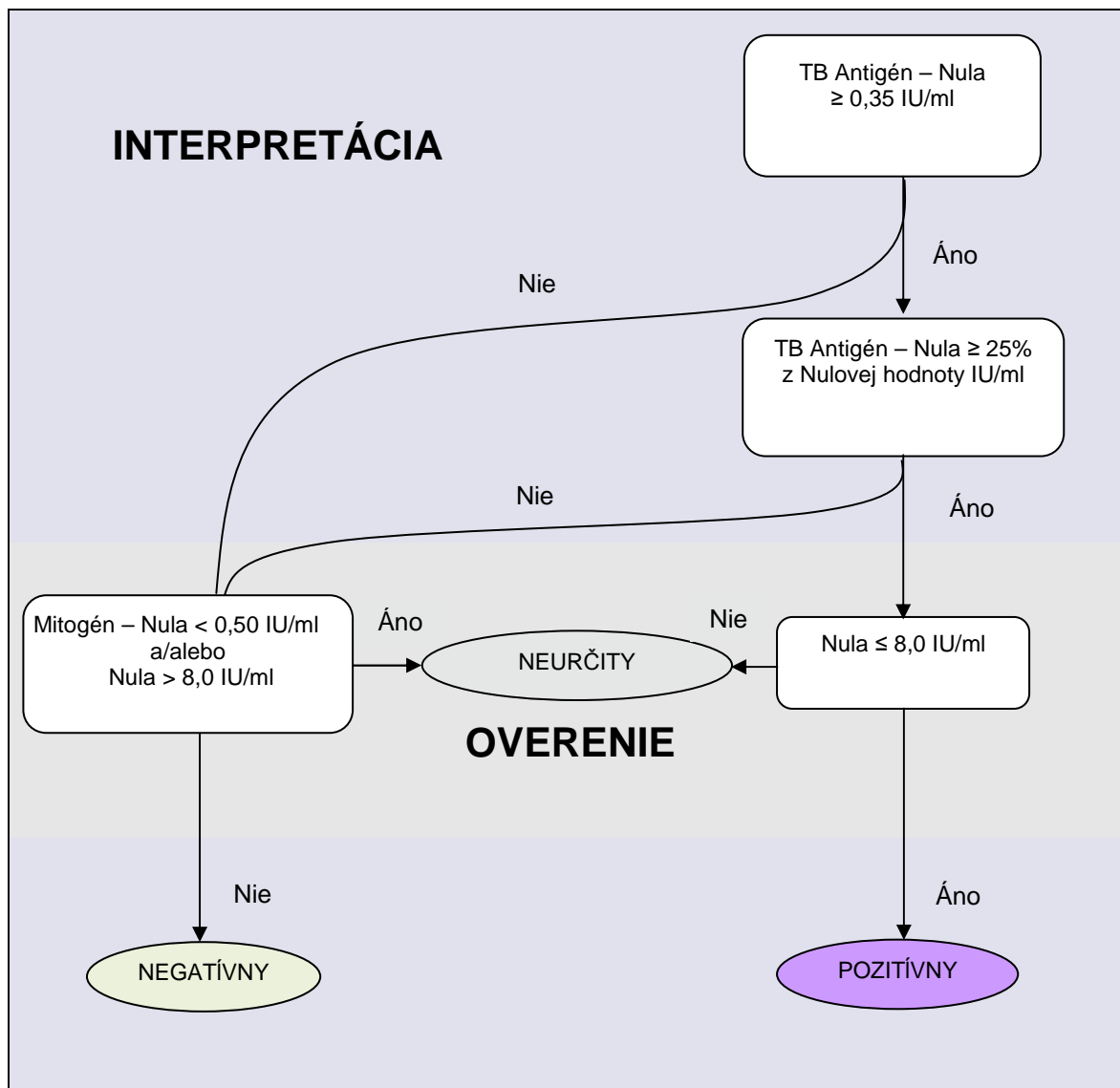
² V prípadoch, v ktorých sa nepredpokladá infekcia *M. tuberculosis*, sa môžu na začiatku potvrdiť pozitívne výsledky opätovným dvojitém testovaním originálnych vzoriek plazmy v QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Ak je výsledkom opakovaného testu pri prvej alebo druhej vzorke pozitívny výsledok, tak je potrebné výsledok testu hodnotiť ako pozitívny.

³ Možné príčiny pozri kapitolu Odstraňovanie problémov.

⁴ V klinických štúdiách vykazovalo menej ako 0,25 % účastníkov pri nulovej kontrole koncentráciu IFN-γ > 8,0 IE/ml.

Z výšky nameranej koncentrácie IFN-γ sa nedajú vyvodiť žiadne závery ohľadom štádia alebo stupňa infekcie, miera reaktivity imunity alebo pravdepodobnosť progresie pri aktívnom ochorení.

Obrázok 4: VÝVOJOVÝ DIAGRAM NA INTERPRETÁCIU (PRI POUŽITÍ SKÚMAVKY NULOVEJ KONTROLY, Tb-ANTIGÉNU A MITOGÉNOVEJ SKÚMAVKY)



8. HRANICE METÓDY

Výsledky testu QuantiFERON®-TB Gold IT sa musia posudzovať v kombinácii s epidemiologickou históriou každého pacienta, jeho súčasného zdravotného stavu a ostatných diagnostických vyšetrení.

Výsledky s nulovou hodnotou nad 8 IE/ml je potrebné vyhodnotiť ako “nerozhodné”, pretože reakcia na Tb-antigén zvýšená o 25% môže byť mimo rozsahu merania vzorky.

Nespoľahlivé a nerozhodné výsledky môžu mať nasledujúcu príčinu:

- odchýlky od metódy popísanej v príbalovom letáku
- extrémne vysoká koncentrácia cirkulujúcej IFN- γ alebo prítomnosť heterofilných protilátok
- prekročenie lehoty 16 hodín medzi odberom krvi a inkubácie pri 37 °C

9. CHARAKTERISTICKÉ ZNAKY

Klinické štúdie

Keďže pre latentnú infekciu tuberkulózy (LTBI) neexistuje žiaden definitívny štandard, nedá sa prakticky vyhodnotiť odhad citlivosti a špecifickosti testu QuantiFERON®-TB Gold IT. Špecifickosť QuantiFERON®-TB Gold IT bola približne zistená evaluáciou miery chybných pozitívnych výsledkov u osôb s nízkym rizikom (napr. bez známych rizikových faktorov) infekcie tuberkulózy. Citlivosť bola približne zistená na základe evaluácie skupiny pacientov s aktívnym ochorením tuberkulózy, ktorá bola potvrdená kultúrou.

Špecifickosť

V istej americkej štúdii s 866 účastníkmi bola pri realizácii TST odobraná vzorka krvi na test QuantiFERON®-TB Gold IT. Demografické údaje a rizikové faktory tuberkulózy boli zistené pomocou štandardnej ankety v čase testovania. Zo 432 účastníkov bez známych rizikových faktorov infekcie *M. tuberculosis* boli na záver k dispozícii výsledky QuantiFERON®-TB Gold IT a TST pre 391 osôb. Žiadna z týchto osôb nebola očkovaná pomocou BCG. Ďalšia štúdia špecifickosti s testom QuantiFERON®-TB Gold IT bola vykonaná v Japonsku, na ktorom sa podieľali účastníci s nízkym rizikom; zhruba 90 % týchto osôb bolo zaočkovaných pomocou BCG. Výsledky oboch štúdií špecifickosti sú uvedené v tabuľke 2.

TABUĽKA 2. Špecifickosť testu QuantiFERON®-TB Gold IT: Výsledky účastníkov bez známych rizikových faktorov infekcie *M. tuberculosis*

ŠTÚDIA	Status BCG: % očkovaných	Počet testovaných osôb	Počet nerozhodných výsledkov v QTF-G	Počet pozitívnych QTF-G / počet platných testov	Špecifickosť QTF-G (95% CI**)	Počet pozitívnych na TST / počet testov	Špecifickosť TST* (95% CI**)
USA (nezverejnené)	0%	391	1	3/390	99,2% (97,6-99,8)	6/391	98,5% (96,5-99,4)
Japonsko (nezverejnené)	~90%	190	4	3/186	98,4% (95-99,6)	--	--
CELKOM		581	5/584 (0,9%)	6/576	99,0%	--	--

* pri stanovení hranice testu TST 10 mm. Pri použití hraničnej hodnoty 15 mm je odhadovaná špecifickosť TST 99,1%.

** CI = interval dôvery

Citlivosť na aktívne Tb

Na zistenie citlivosti testu QuantiFERON®-TB Gold IT boli testované osoby z Austrálie a Japonska s podozrením na Tb, ktorých infekcia *M. tuberculosis* bola následne potvrdená kultúrou. Pre latentnú infekciu tuberkulózy (LTBI) síce neexistujú žiadne definitívne štandardy, avšak mikrobiologická kultúra *M. tuberculosis* je primeranou náhradou, pretože chorí ľudia sú na základe definície infikovaní. Pacienti boli pred odberom krvi na test QuantiFERON®-TB Gold IT ošetrovaní menej ako 8 dní.

V tabuľke 3 sú uvedené výsledky dvoch skupín pacientov, ktorí mali pozitívnu kultúru *M. tuberculosis*. Celková citlivosť testu QuantiFERON®-TB Gold IT pre aktívne ochorenie Tb bola 89 % (48/54).

TABUĽKA 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Osoby s potvrdenou kultúrou infekcie *M. tuberculosis*.

ŠTÚDIA	Ochorenie potvrdené na základe	Počet pozitívnych QTF-Gold / počet platných testov	Citlivosť QTF-G (95% CI*)
Japonskí pacienti s Tb Štúdia validácie	Kultúra	24/27	89% (72-96%)
Austrálski pacienti s Tb Štúdia validácie	pulmonal	7/10	70% (40-89%)
	extra-pulmonal	17/17	100% (82-100%)
CELKOM		48/54	89% (78-95%)

* CI = interval dôvernosti

Diagnóza LTBI

Bola zverejnený celý rad štúdií, ktoré dokladujú výkon QuantiFERON®-TB Gold IT pri rozličných rizikových populáciách LTBI. Najdôležitejšie údaje sú uvedené v tabuľke 4.

TABUĽKA 4. Vybrané zverejnené štúdie ohľadom použitia QuantiFERON®-TB Gold IT u rizikovej populácie LTBI

ŠTÚDIA	Počet testovaných osôb	Výsledky
Medicínsky personál v Indii (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Prostredie s veľmi vysokou mierou Tb. 40% pozitívnych na QFT-Gold IT resp. 41% pozitívnych na TST pri hraničnej hodnote 10 mm. Vysoká konkordancia s TST, žiaden efekt BCG na testy. Obidva testy v spojení s rizikovými faktormi „vek“ a „doba zamestnania v zdravotníctve“.
HIV-pozitívni v Dánsku (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	Celková prevalentnosť LTBI bola v QFT-Gold IT 4,6 % (27/590) pri HIV-pozitívnych. Pozitívne výsledky boli v súvislosti s rizikami Tb. U dvoch pacientov pozitívnych na QFT-Gold IT sa v priebehu jedného roka rozvinula Tb.. Nerozhodné výsledky (n=20, 3,4 %) boli spojené s číslom CD4 <100 / μ L.
Nemocnične ošetrované deti (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Deti s podozrením na Tb alebo s predpokladaným kontaktom s Tbboli testované pomocou QFT-Gold IT a TST. 10,5% pozitívnych na QFT-Gold IT resp. 9,5% pozitívnych na TST pri hraničnej hodnote 10 mm. Zhoda medzi testami celkom 95,2 % resp. 100 % pri nezačkovaných pomocou BCG.
Nemci s kontaktom s Tb (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Testované boli blízke kontaktné osoby v 15 rozličných indexových prípadoch. 51 % bolo očkovaných pomocou BCG, 27 % sa narodilo v cudzine. 70 % očkovaných pomocou BCG a 18 % neočkovaných bolo pozitívnych na TST (5 mm) a 9 % resp. 11 % bolo pozitívnych na QFT-Gold IT. QFT-Gold IT bol v spojení iba s rizikom Tb. TST bolo v súvislosti iba s očkovaním BCG.

Výkon menej citlivej verzie tekutého antigénu QuantiFERON®-TB Gold (test predchádzajúci QuantiFERON®-TB Gold IT) a testu QuantiFERON®-TB Gold IT je popísaný v mnohých ďalších publikáciách. Tieto štúdie obsahujú aj použitie testu u kontaktných osôb s pacientmi s aktívnou Tb^{9,11,19,25}, detí^{6-10,25,28}, HIV-pozitívnych^{2,5,20}, zdravotníckeho personálu^{13,26,32}, osôb s potlačenou imunitou^{3,4,22,23,27,30,31}, ako aj osôb s podozrením na Tb^{7,8,10,18} a osôb s nízkym rizikom¹⁵.

Opakovateľnosť a efekt TST na neskoršie testy QuantiFERON®-TB Gold IT

V rámci štúdie špecifickosti bola skúmaná podskupina účastníkov 4 až 5 týždňov po pôvodnom teste. 260 účastníkov malo teda k dispozícii výsledky z testu s QuantiFERON®-TB Gold IT a z testu TST z dvoch

časových období; zhoda bola 99,6 % (259/260). Predchádzajúci TST nemal za následok zvýšenie pozitívnych výsledkov v teste s QuantiFERON®-TB Gold IT.

10. TECHNICKÉ INFORMÁCIE

Nerozhodné výsledky

Nerozhodné výsledky by sa mali vyskytovať zriedka a môžu byť spôsobené nasledujúcimi faktormi:

- prekročenie lehoty 16 hodín medzi odberom krvi a inkubácie pri 37°C
- skladovanie vzoriek krvi mimo odporúčaného rozsahu teplôt (22 ± 5°C)
- nedostatočné premiešanie skúmaviek na odber krvi
- nedostatočné umytie dosky ELISA

Ak sa predpokladajú technické problémy pri odbere krvi alebo v manipulácii s vzorkami krvi, mal by sa celý test QuantiFERON®-TB Gold IT zopakovať s novými vzorkami krvi. Test stimulovaných vzoriek plazmy ELISA sa môže opakovať, ak sa predpokladá nedostatočné umytie alebo iná odchýlka od predpísanej metódy testovania ELISA. Nerozhodné výsledky, ktoré môžu vyplývať z nízkych hodnôt mitogénu alebo nulových hodnôt, sa nesmú pri zopakovaní testu zmeniť, leda že došlo pri teste ELISA k nejakej chybe. Nerozhodné výsledky by sa mali ako také postúpiť ďalej. Lekár môže prípadne odobrať novú vzorku krvi, alebo podľa potreby môže vykonať ostatné vyšetrenia.

Zrazené vzorky plazmy

Ak sa pri dlhšom skladovaní vzoriek plazmy objavia fibrínové zrazeniny, je potrebné vzorky centrifúgovať až do tvorby sedimentu; uľahčí to pipetovanie plazmy.

Odstraňovanie problému podľa metódy ELISA

Nešpecifická reakcia farieb

MOŽNÁ PRÍČINA	RIEŠENIE
Nedostatočné umytie dosiek	Dosku umyť minimálne 6x so 400 µl umývacieho prostriedku na priehlbínu. Podľa použitej umývačky môže byť potrebných aj viac ako 6 cyklov umývania. Medzi jednotlivými cyklami umývania sa odporúča dodržať vždy po 5 sekúnd na namáčanie.
Krížová kontaminácia priehlbín ELISA	Dôkladné pipetovanie a miešanie vzoriek minimalizuje riziko.
Súprava/súčasti súpravy po dobe spotreby	Skontrolujte, či ešte neuplynul dátum spotreby súpravy. Presvedčte sa, že štandard a 100-násobný koncentrát konjugátu sa použijú do 3 mesiacov.
Roztok substrátu enzýmu je kontaminovaný	Pri modrom sfarbení substrát zlikvidujte. Presvedčte sa, že boli použité čisté zásobníky reagensov.

Nízke hodnoty optickej hustoty pri štandardoch

MOŽNÁ PRÍČINA	RIEŠENIE
Chyby pri štandardnom riedení	Vyrobte roztoky štandardu súpravy presne podľa pokynov v príbalovom letáku.
Chyba pipetovania	Skontrolujte, či sú pipety kalibrované a používané presne podľa pokynov výrobcu.
Inkubačná teplota príliš nízka	Inkubácia pre metódu ELISA by sa mala uskutočniť pri izbovej teplote (17-27 °C).
Inkubačná doba príliš krátka	Inkubačná doba dosky s konjugátom, štandardmi a vzorkami by mala byť 120 ± 5 minút. Roztok substrátu enzýmu sa na doske inkubuje 30 minút.
Chybný filter dosky	Doska by sa mala načítavať pri 450 nm s referenčným filtrom 620-650 nm.
Reagencie príliš studené	Všetky reagenty (s výnimkou 100-násobného koncentrátku konjugátu) musia dosiahnuť pred testovaním izbovú teplotu. Toto trvá cca. 60 minút.
Súprava/súčasti súpravy po dobe spotreby	Skontrolujte, či ešte neuplynul dátum spotreby súpravy. Presvedčte sa, že štandard a 100-násobný koncentrát konjugátu sa použijú do 3 mesiacov.

Silné sfarbenie pozadia

MOŽNÁ PRÍČINA	RIEŠENIE
Nedostatočné umytie dosiek	Dosku umyť minimálne 6x so 400 µl umývacieho prostriedku na priehlbínu. Podľa použitej umývačky môže byť potrebných aj viac ako 6 cyklov umývania. Medzi jednotlivými cyklami umývania sa odporúča dodržať vždy po 5 sekúnd na namáčanie.
Inkubačná teplota príliš vysoká	Inkubácia pre metódu ELISA by sa mala uskutočniť pri izbovej teplote (17-27 °C).
Súprava/súčasť súpravy po dobe spotreby	Skontrolujte, či ešte neuplynul dátum spotreby súpravy. Presvedčte sa, že štandard a 100-násobný koncentrát konjugátu sa použijú do 3 mesiacov.
Roztok substrátu enzýmu je kontaminovaný	Pri modrom sfarbení substrát zlikvidujte. Presvedčte sa, že boli použité čisté zásobníky reagensov.

Nelineárna štandardná krivka a odchýlky medzi obidvomi dvojnásobnými vzorkami

MOŽNÁ PRÍČINA	<u>RIEŠENIE</u>
Nedostatočné umytie dosiek	Dosku umyť minimálne 6x so 400 µl umývacieho prostriedku na priehlbínu. Podľa použitej umývačky môže byť potrebných aj viac ako 6 cyklov umývania. Medzi jednotlivými cyklami umývania sa odporúča dodržať vždy po 5 sekúnd na namáčanie.
Chyby pri štandardnom riedení	Vyrobte roztoky štandardu súpravy presne podľa pokynov v príbalovom letáku.
Nedostatočné miešanie	Reagencie dôkladne premiešajte viacnásobným prevrátením alebo pretrepaním skôr, ako ich budete dispenzovať do priehlbín.
Nerovnomerná technika pipetovania alebo prerušenie pri testovaní	Dispenzovanie vzoriek a štandardov by sa malo vykonávať plynulo. Všetky reagencie sa musia pred testovaním pripraviť tak, aby boli pripravené na použitie.

Video, ktoré demonštruje metódu testovania, ako aj riešenie väčšiny technických problémov nájdete na CD-ROM s informáciami o produkte a s technickými návodmi. CD-ROM dostanete priamo v spoločnosti Cellestis, alebo od Vášho dodávateľa.

11. BIBLIOGRAFIA

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

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

13. TESTOVACIA METÓDA (SKRÁTENÁ FORMA)

1. KROK: INKUBOVANIE VZORKY KRVI

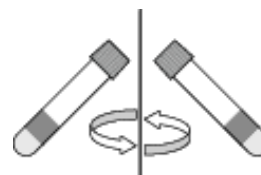
1. Vzorku krvi pacienta odoberte pomocou skúmaviek na odber krvi a dôkladne ich premiešajte **silným pretrepaním počas 5 sekúnd** (alebo 10x pretrepať). **Celá vnútorná stena skúmavky** musí byť pokrytá krvou.



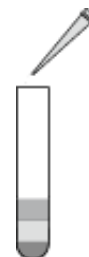
2. Skúmavky inkubujte v **stojacej polohe** 16 – 24 hodín pri 37 °C.



3. Po inkubácii skúmavky centrifúgujte 5-15 minút pri 1500 – 2200 g (RCF), aby sa oddelila plazma od červených krviniek.



4. Po centrifúgovaní odoberte z každej skúmavky vzorku plazmy na kvantifikáciu IFN- γ .



2. KROK: ELISA IFN- γ

1. Súčasti ELISA (okrem 100-násobného koncentráту konjugátu) nechajte stabilizovať minimálne 60 minút pri izbovej teplote.

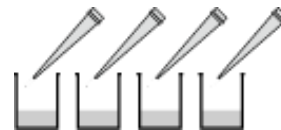


2. Rekombinantný Human-IFN- γ -Standard rekonštituujte pomocou deionizovanej alebo destilovanej vody na 8,0 IE/ ml. Vyroberte 4 štandardné roztoky.

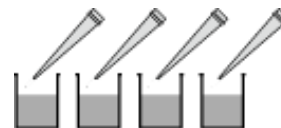


3. Lyofilizovaný 100-násobný koncentrát konjugátu rekonštituujte pomocou destilovanej alebo deionizovanej vody.

4. Vyroberte konjugát so zeleným roztokom na riedenie a do priehlbín dajte po 50 μ l.



5. Do zodpovedajúcich priehlbín dajte po 50 μ l vzoriek plazmy a 50 μ l štandardov. Zmiešajte vo vytriasadle.



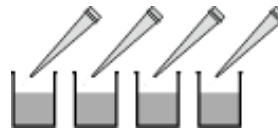
6. Inkubujte 120 minút pri izbovej teplote.



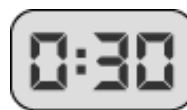
7. Priehlbiny vymyte minimálne 6 x 400 μ l umývacím roztokom na priehlbinu.



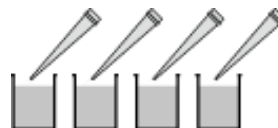
8. Do všetkých priehlbín dajte po 100 μ l roztoku substrátu enzýmu.



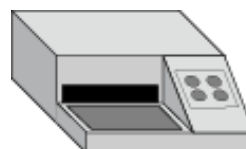
9. Inkubujte 30 minút pri izbovej teplote.



10. Do všetkých priehlbín dajte po 50 μ l zastavovacieho roztoku. Zmiešajte pomocou vytriasadla.



11. Výsledky pri 450 nm zmerajte s referenčným filtrom 620-650 nm.



12. Výsledky analyzujte.





Vyrobené pre:
Cellestis Limited (Austrália) a Cellestis GmbH (Európa)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Austrália
Tel. (Austrália) +61 3 9571 3500, (Európa) +49 6151 428 59-0
E-Mail: quantiferon@cellestis.com
Website: www.cellestis.com

Č. dokumentu: 05990301C
August 2009

EC	REP
----	-----

Autorizovaný zástupca:
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Germany

The CE mark, consisting of a stylized 'C' and 'E'.