

QuantiFERON[®]-TB Gold

(In-Tube Metodu)

**ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4) Peptid Antijenlerine
Oluşan Cevabı Ölçen
Tam Kan IFN-gama Testi**

**KİT
PROSPEKTÜSÜ**

In Vitro Teşhis Kullanımı İçin



İÇİNDEKİLER

1. KULLANIM AMACI	2
2. KISA ÖZET VE TESTİN AÇIKLAMASI	2
Testin Prensipleri	4
Testin Yapılması için Gerekli Süre	4
3. REAKTİFLER VE SAKLANMASI	5
Gerekli Malzemeler (ancak sağlanmayan)	5
Saklama Bilgileri	6
Kan Alma Tüpleri	6
Kit Reaktifleri	6
Çözülmüş ve Artan Reaktifler	6
4. UYARILAR VE ÖNLEMLER	7
Uyarılar	7
Önlemler	8
5. NUMUNE TOPLAMA VE KULLANIMI	9
6. KULLANIM TALİMATLARI	11
BİRİNCİ AŞAMA – Kanın inkübasyonu ve Plazmanın toplanması	11
İKİNCİ AŞAMA – İnsan IFN- γ ELISA	12
7. HESAPLAMA VE TESTİN YORUMLANMASI	17
Standart Eğrinin Çizilmesi	17
Testin Kalite Kontrolü	18
Sonuçların Yorumlanması	19
8. SINIRLAMALAR	23
9. PERFORMANS ÖZELLİKLERİ	23
10. TEKNİK BİLGİ	26
Belirsiz Sonuçlar	26
Pıhtılı Plazma Numuneleri	26
ELISA Sorun Çözme	27
Spesifik Olmayan Renk Oluşumu	27
Standartların Düşük Optik Dansite Okumaları	27
Yüksek Arka Plan Rengi	28
Doğrusal Olmayan Standart Eğri ve Tekrarlama Değişkenliği	28
11. KAYNAKÇA	29
12. TEKNİK SERVİS	30
13. KISALTILMIŞ TEST PROSEDÜRÜ	31

1. KULLANIM AMACI

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT), heparinli tam kan içindeki hücrelerin, uyarıcı ESAT-6, CFP-10 ve TB7.7(p4) proteinlerinin peptit kokteyli ile uyarılmasını kullanan, bir *in vitro* teşhis testidir. Enzim Bağlı İmmün Absorbsiyon Testi (ELISA) ile interferon- γ (IFN- γ) tespiti, *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonu ile ilgili olan bu peptit antijenlerine olan *in vitro* cevabın saptanması için kullanılır.

QuantiFERON®-TB Gold IT, *M. tuberculosis* enfeksiyonu (hastalık da dahil) için bir indirek testtir ve risk değerlendirilmesi, radyografi ve diğer medikal ve teşhis değerlendirmeleriyle birlikte kullanılması amaçlanmıştır.

2. KISA ÖZET VE TESTİN AÇIKLAMASI

Tüberküloz, tipik olarak solunum yolu tüberküloz hastası hastalardan havadaki zerrecikler yoluyla yeni bireylere bulaşan, *M. tuberculosis* kompleks organizmalarının (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) enfeksiyonu ile ortaya çıkan bulaşıcı bir hastalıktır. Yeni enfekte olan bir bireyde tüberküloz hastalığı haftalar veya aylar içerisinde gelişebilir, fakat yine de çoğu enfekte olmuş kişiler sağlıklı kalabilir. Bulaşıcı olmayan semptomsuz bir durum olan, gizli tüberküloz enfeksiyonu (LTBI), bazı kişilerde olabilir. Bu kişilerde, tüberküloz hastalığı aylar veya yıllar sonra gelişebilir. LTBI teşhisinin ana amacı, tüberküloz hastalığının önlenmesi için medikal tedavinin değerlendirilmesidir. Son zamanlara kadar, tüberkülin deri testi (TST) LTBI teşhisi için mevcut tek metottu. Tüberküline karşı kutanöz hassasiyet, enfeksiyondan 2 ila 10 hafta sonra gelişir. Buna rağmen, immün fonksiyonları engelleyici durumlarda olan kişiler ve bu durumda olmayan bazı enfekte bireyler, tüberküline karşı cevap vermezler. Ayrıca, *M. tuberculosis* enfeksiyonu olması beklenmeyen bazı kişiler, tüberküline karşı hassasiyet göstermektedir ve Bacille Calmette-Guérin (BCG) ile aşılama sonrası, *M. tuberculosis* kompleksinden farklı mycobacteria ile enfeksiyon veya belirlenemeyen diğer faktörlerden dolayı pozitif TST sonucu çıkmaktadır.

LTBI, genellikle akciğerler ve alt solunum yollarını ve bazen de diğer organ sistemlerini etkileyebilen tüberküloz hastalığından ayrıştırılmalıdır. Tüberküloz hastalığı, tarihsel, fiziksel, radyolojik, histolojik ve bakteriyolojik bulgular ile teşhis edilir.

QuantiFERON®-TB Gold IT testi, uyarıcı myobacterial proteinlerin peptid antijenlerine karşı hücre yoluyla bağışıklık (CMI) cevabını ölçen bir testtir. Bu proteinler, ESAT-6, CFP-10 and TB7.7(p4), hiçbir BCG aşısında ve *M. kansasii*, *M. szulgai* ve *M. marinum* hariç tüberküloza neden olmayan diğer mycobacterilerde yoktur.¹ *M. tuberculosis* kompleksi organizmaları ile enfekte olmuş bireylerin kanında, genellikle bu ve diğer antijenleri tanıyan lenfositler bulunmaktadır. Bu tanıma işlemi, sitokin, IFN- γ oluşumunu ve salınmasını kapsar. IFN- γ 'nın tespiti ve sonradan kantitasyonu, bu testin temelini oluşturur.

QuantiFERON®-TB Gold IT'de kullanılan antijenler, ESAT-6, CFP-10 ve TB7.7(p4) uyarıcı proteinlerinin bir peptid kokteylidir. Bu peptid antijenlerinin *M. tuberculosis* ile enfekte olan kişilerde T-lenfositlerinin IFN- γ salınımını uyardığı, ancak enfekte olmayan veya BCG aşı, hastalık veya LTBI riski bulunmayan kişilerde de uyarım olmadığı birçok çalışmada gösterilmiştir.¹⁻³² Bununla birlikte, tıbbi tedaviler veya bağışıklık fonksiyonunun zayıf olması durumlarında, IFN- γ cevabında düşme olabilir. ESAT-6, CFP-10 ve TB7.7(p4) proteinlerinin kodlandığı genler, *M. kansasii*, *M. szulgai* ve *M. Marinum*'de bulunmaktadır, bu türlerin mycobacterial enfeksiyonu bulunan hastalarda da bu proteinlere yanıt oluşabilir.^{1,23} QuantiFERON®-TB Gold IT hem LTBI için bir testtir, hem de enfekte kişilerde *M. tuberculosis* kompleks enfeksiyonunun teşhisine yardım eder. Pozitif bir sonuç tüberküloz hastalığı teşhisini destekler; ancak diğer bazı mycobacteria enfeksiyonlarında da (ör. *M. kansasii*) pozitif sonuç verebilir. Tüberküloz hastalığının varlığının veya yokluğunun doğrulanması için, diğer medikal ve tanı testleri de yapılmalıdır.

Testin Prensipleri

QuantiFERON®-TB Gold IT sisteminde, tam kanı toplamak için özel kan tüpleri kullanılır. Kanların inkübasyonu tüplerde 16 ila 24 saat süreyle yapılır, daha sonra plazma ayrılır ve peptit antijenlerine cevaben oluşan IFN- γ 'nın miktarı ölçülür.

QuantiFERON®-TB Gold IT testi iki aşamada yapılır. İlk aşamada, her bir QuantiFERON®-TB Gold kan alma tüplerine tam kan alınır. Bu tüpler, Nil Kontrol tüpü, TB Antijen Tüpü ve opsiyonel Mitogen tüpüdür.

Mitogen tüpü, QuantiFERON®-TB Gold IT testinde bir pozitif kontrol olarak kullanılabilir. Bu tüp, özellikle kişinin bağışıklık durumu ile ilgili şüpheliyi ortadan kaldıracaktır. Mitogen tüpü ayrıca kan alım ve inkübasyon işlemlerinin doğru yapıldığını da kontrol edebilir.

Tüpler, kan alımından sonraki 16 saat içinde, mümkün olduğunca çabuk 37°C'de inkübe edilmelidir. 16 ila 24 saatlik inkübasyon periyodundan sonra, tüpler santrifüj edilir, plazma ayrılır ve ELISA çalışmasıyla IFN- γ (IU/mL) miktarı ölçülür.

TB Antijen tüpündeki IFN- γ miktarı Nil tüpündekinden belirgin şekilde yüksekse, test pozitif olarak düşünülür. Mitogen tüpü kullanılmışsa, Mitogen tarafından uyarılmış plazma numunesi, test edilen her numunenin kendi IFN- γ pozitif kontrolü olur. Mitogen'e karşı düşük cevap olması (<0.5 IU/mL), kan numunesinde de TB antijenlerine karşı negatif bir cevap varken, şüpheli bir sonucu gösterir. Bu durum, yetersiz lenfosit olması, uygun olmayan numune alınması yüzünden azalmış lenfosit aktivitesi, Mitogen tüpünün hatalı doldurulması veya karıştırılması ya da hastanın lenfositlerinin IFN- γ salınımının yetersiz olması nedeniyle ortaya çıkar. Nil numunesi arka plan rengini, heterofil antikor etkilerini⁷ veya kan numunesindeki spesifik olmayan IFN- γ 'nın testteki düzeltmesini sağlar. Nil tüpünün IFN- γ seviyesi TB antijen tüpünün ve Mitogen tüpünün (kullanılmışsa) IFN- γ seviyesinden çıkartılır.

Testin Yapılması için Gerekli Süre

QuantiFERON®-TB Gold IT testinin yapılması için gereken süre aşağıda hesaplanmıştır; çoklu numunelerin toplu çalışılma süresi ayrıca belirtilmiştir:

Kan tüplerinin 37°C inkübasyonu: 16 ila 24 saat

ELISA: Her bir ELISA plak için yaklaşık 3 saat
(28 ila 44 numune)

- <1 saat çalışma
- Her bir plak için 10 ila 15 dakika eklenir

3. REAKTİFLER VE SAKLANMASI

Tüberküloz ve Kontrol Antijen Kan Alma Tüpleri

Katalog Numarası 0590 0301

- | | |
|----------------------------------|-----------|
| 1. Nil Kontrol (Gri kapaklı) | 100 x tüp |
| 2. TB Antijen (Kırmızı kapaklı) | 100 x tüp |
| 3. Mitogen Kontrol (Mor kapaklı) | 100 x tüp |

NOT: Tüpler ayrıca farklı konfigürasyonlar için de mevcuttur:

Kat. No. 0590-0201: 100 x Nil Kontrol, 100 x TB Antijen tüpleri.

Kat. No. 0593 0201: 100 x Mitogen Kontrol tüpleri.

Yüksek Rakım Tüpleri (Bölüm 5'e bakınız)

Kat. No. 590 0501: (Yüksek Rakım) 100 x Nil Kontrol, 100 x TB Antijen tüpleri.

Kat. No. 0590 0505: (Yüksek Rakım) 100 x Nil Kontrol, 100 x TB Antijen & 100 x Mitogen tüpleri.

Kat. No. T0593 0501 (Yüksek Rakım) 100 x Mitogen Kontrol tüpleri.

ELISA Bileşimi

Katalog Numarası 0594 0201

- | | |
|--|-------------|
| 1. Mikroplak stripleri | 24 x 8 kuyu |
| 2. İnsan IFN- γ Standardı, liyofilize | 1 x şişe |
| 3. Yeşil Dilüent | 1 x 30mL |
| 4. Konjugat 100X Konsantre, liyofilize | 1 x 0.3mL |
| 5. Yıkama Tamponu 20X Konsantre | 1 x 100mL |
| 6. Enzim Substrat Solüsyonu | 1 x 30mL |
| 7. Enzim Durdurma Solüsyonu | 1 x 15mL |

Gerekli Malzemeler (ancak sağlanmayan)

- 37°C inkübatör. CO₂ gerekli değil.
- 10 μ L ila 1000 μ L dağıtım için kalibre edilmiş değiştirilebilir hacimli pipetler ve tek kullanımlık pipet uçları.
- 50 μ L ila 100 μ L dağıtım yapabilen kalibre edilmiş çok kanallı pipetler ve tek kullanımlık pipet uçları.
- Mikroplak çalkalayıcı.
- Deiyonize veya distile su - 2L.
- Mikroplak yıkayıcı (otomatik yıkayıcı tavsiye edilir).
- 450nm filtreli ve 620nm ila 650nm referans filtresine sahip mikroplak okuyucu .

Saklama Bilgileri

Kan Alma Tüpleri

- Kan alma tüplerini 4°C ila 25°C arasında saklayınız.
- QuantiFERON®-TB Gold kan alma tüplerinin raf ömrü 4°C ila 25°C'de saklandığında üretim tarihinden itibaren 15 aydır.

Kit Reaktifleri

- Kiti 2°C ila 8°C arasında saklayınız.
- Enzim Substrat Solüsyonunu her zaman direk gün ışığından koruyunuz.
- QuantiFERON®-TB Gold IT ELISA kitinin raf ömrü 2°C ila 8°C'de saklandığında üretim tarihinden itibaren 3 yıldır.

Çözülmüş ve Artan Reaktifler

Reaktiflerin nasıl çözüleceği hakkındaki bilgiler için lütfen Bölüm 6'ya bakınız (sayfa 11).

- Çözülen Kit Standardı 2°C to 8°C'de saklandığında, 3 aya kadar kullanılabilir.
 - *Kit Standardının çözüldüğü tarihi not ediniz.*
- Çözüldükten sonra, kullanılmayan Konjugat 100X Konsantre'yi 2°C to 8°C'de saklanmalıdır ve 3 ay içinde kullanılmalıdır.
 - *Konjugatın çözüldüğü tarihi not ediniz.*
- Çalışma için hazırlanan Konjugat 6 saat içinde kullanılmalıdır.
- Çalışma için hazırlanan Yıkama Tamponu oda sıcaklığında 2 hafta saklanabilir.

4. UYARILAR VE ÖNLEMLER

Uyarılar

- QuantiFERON®-TB Gold IT sonucunun negatif çıkması, *M. tuberculosis* enfeksiyonunun veya tüberküloz hastalığının olmadığını göstermez: yalancı negatif sonuçlar, enfeksiyonun aşamalarından kaynaklanabilir (ör: numune hücrel immün cevap oluşmadan alınmış olabilir), bağışıklık fonksiyonlarını etkileyen hastalık durumları, kan alımını takiben tüplerin hatalı kullanılması, testin hatalı çalışması veya diğer immünolojik değişimler.
- QuantiFERON®-TB Gold IT sonucunun pozitif çıkması, *M. tuberculosis* enfeksiyonunun belirlenmesinde tek başına yeterli değildir. Testin hatalı çalışması yalancı pozitif sonuç verebilir.
- Pozitif bir QuantiFERON®-TB Gold IT sonucu, aktif tüberküloz hastalığı için, daha ileri medikal ve tanı değerlendirmeler yapılmalıdır (ör: ARB yayma ve kültür, akciğer grafisi).
- ESAT-6, CFP-10 ve TB7.7(p4) hiçbir BCG aşısında ve bilinen tüberküloza sebep olmayan mycobakterilerde bulunmamasına rağmen, *M. kansasii*, *M. szulgai* veya *M. marinum* enfeksiyonları yüzünden QuantiFERON®-TB Gold IT sonucu pozitif çıkabilir. Böyle bir enfeksiyon şüphesi varsa, alternatif testlerle araştırılmalıdır.

Önlemler

- **In vitro kullanımı içindir.**
- **Zararlı: Enzim substrat solüsyonu** 3,3',5,5' tetrametilbenzidin içermektedir. Bu solüsyonun yutulması, solunması ve deri teması zararlıdır. Deri ve gözü tahriş edicidir. Mutajendir. Kullanırken koruyucu gözlük takın, eldiven giyin ve potansiyel kanserojen olduğundan dikkatli kullanın.
- **Zararlı: Enzim Durdurma Solüsyonu** H₂SO₄ içerir. Bu solüsyonun deri ve göz ile teması, yutulması, solunması ve zararlıdır. Kullanırken koruyucu gözlük, eldiven ve normal laboratuvar koruyucu giysisi kullanın. Durdurma solüsyonu deriye veya göze temas ederse, bol suyla durulayın ve tıbbi yardım alın.
- **Zararlı: IFN-γ Standart ve Konjugat 100X Konsantre** yutulursa rahatsız edebilir ve deri tahrişine sebep olabilir. Eldiven ve normal koruyucu laboratuvar giysisi kullanın.
- **İnsan kanını potansiyel bulaşıcı olarak kullanın.** Kanla çalışma kılavuzlarını inceleyin.
- **Thimerosal** bazı reaktiflerde koruyucu olarak kullanılmıştır. Yutulduğunda, solunduğunda veya deri ile temasında toksik olabilir.
- **Yeşil Dilüent** normal fare serumu ve kazein içerir. Bu maddeler alerjik yanıtı tetikleyebilir; deri ile temasından kaçının.
- Kit prospektüsünden farklı işlemler, hatalı sonuçlara yola açabilir. Lütfen kiti kullanmadan önce talimatları dikkatlice okuyunuz.
- Hasarlı veya akmış kit reaktiflerini kullanmayın.
- Farklı QuantiFERON®-TB Gold kitlerinin reaktiflerini karıştırmayın ve birlikte kullanmayın.
- Artan reaktifleri ve biyolojik numuneleri Yerel, Ulusal ve Federal düzenlemelere göre imha edin.
- Kan alma tüplerini veya ELISA kitini son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

5. NUMUNE TOPLAMA VE KULLANIMI

QuantiFERON®-TB Gold IT'de aşağıdaki tüpler kullanılır:

1. Nil Kontrol (Beyaz halkalı gri kapak) (deniz seviyesi ile 810 m rakıma kadar kullanılır).
2. TB Antijen (Beyaz halkalı kırmızı kapak) (deniz seviyesi ile 810 m rakıma kadar kullanılır).
3. Mitogen Kontrol (Beyaz halkalı mor kapak) (deniz seviyesi ile 810 m rakıma kadar kullanılır).
4. Nil Kontrol (Sarı halkalı gri kapak) (1020 m ile 1875 m arasında kullanılır).
5. TB Antijen (Sarı halkalı kırmızı kapak) (1020 m ile 1875 m arasında kullanılır).
6. Mitogen Kontrol (Sarı halkalı mor kapak) (1020 m ile 1875 m arasında kullanılır).

Antijenler kan alma tüplerinin iç yüzeyine yapıştırılmıştır, bu yüzden kan alımından sonra iyice çalkalanması çok önemlidir. Kan alımını takip eden 16 saat içinde, tüpler mümkün olduğunca çabuk 37°C'lik inkübatöre transfer edilmelidir.

En uygun sonuç için aşağıdaki prosedürü uygulayın:

1. Her hasta için, QuantiFERON®-TB Gold IT kan alma tüplerine direk olarak 1 ml kan alınız.
 - Standart QuantiFERON® kan alma tüpleri 810 metre rakıma kadar kullanılabilir. 1020 metre ile 1875 metre arasındaki rakımlarda, Yüksek Rakım (HA) QuantiFERON® kan alma tüpleri kullanılmalıdır.
 - *QuantiFERON® kan alma tüpleri bu rakım aralıklarının dışında kullanılıyorsa veya tüpe alınan kan hacmi düşükse, kan bir şırınga kullanılarak alınabilir ve her üç tüpe de 1'er ml olarak dağıtılabilir. Emniyet nedeniyle, bu işlemi yaparken şırınga iğnesinin çıkarın, **ilgili güvenlik prosedürlerini uygulayarak**, üç QuantiFERON® tüpünün de kapaklarını çıkarın ve her birine 1mL kan transfer edin (tüpün etiketinin yanındaki siyah işarete kadar). Kapakları dikkatlice kapatın ve aşağıda anlatıldığı gibi karıştırın.*
 - 1mL'lik tüpler diğer tüplere göre biraz yavaş dolduğundan, tüp tamamen dolduğunda, yeterli hacmin tüpe alındığından emin olmak için, iğneyi 2-3 saniye tüpün içinde bekletin.

Tüpün yanındaki siyah işaret, 1 mL dolum hacmini gösterir. QuantiFERON®-TB Gold kan alma tüpleri, 0.8 ila 1.2 mL arasındaki hacimler için onaylanmıştır. Herhangi bir tüpte kan seviyesi belirteç çizgisine yakın değilse, başka bir kan numunesi alınması tavsiye edilir.

- Kan alımı için “kelebek iğne” kullanılıyorsa, QuantiFERON®-TB Gold tüpleri kullanılmadan önce, hortumun kanla dolduğundan emin olmak için, boş bir tüp kullanılmalıdır.
2. **Tüpün tüm iç yüzeyinin kanla kaplandığından** emin olmak için, **tüpleri kuvvetli bir şekilde 5 saniye (veya 10 kez) çalkalayarak** karıştırınız.
 - Karıştırma, tüp içeriğinin kanla birleşmesinden emin olmak için gereklidir.
 - Çalkalama işlemi sırasında, kanın köpürmesi beklenir, ancak bu durum testin performansını etkilemez ve kan alımı ile ilgili değildir.
 3. Tüpler uygun şekilde etiketlenir.
 4. Kan alımından sonra 16 saat içinde, tüpler mümkün olduğunca çabuk 37°C'lik inkübatöre transfer edilebilmelidir. Kan örneklerini buzdolabına koymayın ve dondurmayın.

6. KULLANIM TALİMATLARI

Birinci Aşama – Kanın inkübasyonu ve plazmanın toplanması

Sağlanan Malzemeler

QuantiFERON®-TB Gold IT kan alma tüpleri (3. Bölüme bakınız).

Gerekli Malzemeler (ancak sağlanmayan)

3. Bölüme bakınız.

Prosedür

1. Kan, alımından sonra hemen inkübe edilmeyecekse, Bölüm 5'te anlatıldığı gibi, **tüplerin çalkalanması inkübasyondan hemen önce tekrarlanmalıdır.**
2. Tüpleri, 37°C'de 16 ila 24 saat **DİK** olarak inkübe edin. İnkübatörün CO₂ içermesi veya nemli olması gerekli değildir.
3. 37°C'de inkübasyondan sonra, kan alma tüpleri, santrifüj işleminden önce, 2°C ila 27°C'de 3 gün saklanabilir.
4. 37°C'de tüplerin inkübasyonundan sonra, tüpler 15 dakika 2000 ila 3000 RCF (g)'de santrifüj edilerek plazma ayrılır. Tüpteki jel, hücreleri plazmadan ayırır. Bu işlem olmazsa, tüpler daha yüksek bir hızda tekrar santrifüj edilmelidir.
 - Santrifüj yapılmadan da plazmayı almak mümkündür, ancak hücresiz olarak plazmayı ayırmak için ekstra dikkat edilmesi gereklidir.
5. Plazma numuneleri, özellikle otomatik ELISA cihazları kullanılıyorsa, kan alma tüplerinden direk olarak QuantiFERON®-TB Gold ELISA plağına yüklenebilir.
6. Alternatif olarak, plazma numuneleri, santrifüj edilmiş tüpler olarak veya plazması farklı bir tüpe ayrılarak, ELISA çalışmasından önce saklanabilir. Örneğin, numuneler saklanacaksa, 150µL'den fazla plazma mikroplak kuyularına veya 96 kuyulu mikrotüplere ayrılabilir, dökülmesini ve buharlaşmasını önlemek için üstü uygun şekilde kapatılır.
 - Plazma numuneleri, 2°C ila 8°C'de 4 hafta, -20°C'de (tercihen -70°C'den düşük) daha uzun süre için saklanabilir.

İkinci Aşama - İnsan IFN- γ ELISA

Sağlanan Malzemeler

QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA kiti (Bölüm 3'e bakınız).

Gerekli Malzemeler (sağlanmayan)

Bölüm 3'e bakınız.

Prosedür

1. Tüm plazma numuneleri ve reaktifler, Konjugat 100X Konsantre hariç, kullanmadan önce oda sıcaklığına (22°C \pm 5°C) getirilmelidir. Oda sıcaklığında en az 60 dakika bekletilmelidir.
2. Kullanılmayacak stripleri plak çerçevesinden çıkarın, ambalajına geri koyup sıkıca kapatın ve buzdolabına geri koyun.

En az bir strip QuantiFERON[®]-TB Gold Standartları için ve test edilecek numuneler için gereken miktarda strip bulundurun (2-tüplü ve 3-tüplü formatlar için Şekil 2A ve 2B'ye bakınız). Kullanımdan sonra, kalan striplerin kullanımı için plak çerçevesini ve kapağı saklayınız.

3. Dondurularak kurutulmuş Kit Standardını, Standart şişesinin etiketinde belirtilen miktarda deiyonize veya distile su ile çözünüz. Köpürmesini azaltmak ve tamamen çözüldüğünden emin olmak için, hafifçe karıştırınız. Belirtilen hacimde Standardın çözülmesi ile 8.0 IU/mL konsantrasyonunda solüsyon elde edilir.

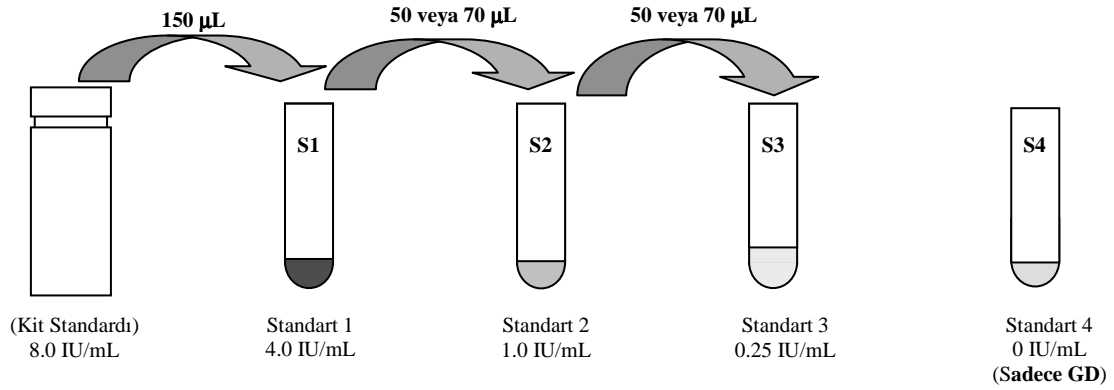
Not: Kit Standardını çözme hacmi kitler arası farklılık gösterir.

Çözülmüş Kit Standardını, Yeşil Dilüent (GD) ile 4 dilüsyon serisini hazırlama için kullanın – Şekil 1'e bakınız. S1 (Standart 1) 4 IU/mL içerir, S2 (Standart 2) 1 IU/mL içerir, S3 (Standart 3) 0.25 IU/mL içerir, ve S4 (Standart 4) 0 IU/mL içerir (sadece GD). Standartlar en az çift olarak çalışılmalıdır.

ÇİFT STANDARTLI ÇALIŞMA İÇİN TAVSİYE EDİLEN PROSEDÜR
a. 4 tüpe "S1", "S2", "S3", "S4" yazın.
b. S1, S2, S3, S4'e 150µL GD ekleyin.
c. S1'e 150µL Kit Standardı koyun ve iyice karıştırın.
d. S1'den 50µL alıp S2'ye koyun ve iyice karıştırın.
e. S2'den 50µL alıp S3'e koyun ve iyice karıştırın.
f. GD tek başına sıfırlık standart olacaktır (S4).

ÜÇ STANDARTLI ÇALIŞMA İÇİN TAVSİYE EDİLEN PROSEDÜR
a. 4 tüpe "S1", "S2", "S3", "S4" yazın.
b. S1'e 150µL GD ekleyin.
c. S2, S3, S4'e 210µL GD ekleyin.
d. S1'e 150µL Kit Standardı koyun ve iyice karıştırın.
e. S1'den 70µL alıp S2'ye koyun ve iyice karıştırın.
f. S2'den 70µL alıp S3'e koyun ve iyice karıştırın.
g. GD tek başına sıfırlık standart olacaktır (S4).

ŞEKİL 1. Standartların Hazırlanışı



- Her ELISA çalışmasında Kit Standardının dilüsyonlarını taze olarak hazırlayınız.
4. Dondurularak kurutulmuş Konjugat 100X Konsantre'yi 0.3 ml deiyonize veya distile su ile çözünüz. Köpürmesini azaltmak ve Konjugat'ın tamamen çözündüğünden emin olmak için, hafifçe karıştırınız.

Çalışma Konjugatı, çözülen Konjugat 100X Konsantre'nin gereken miktarda Yeşil Dilüent ile dilüe edilmesiyle hazırlanır, hazırlama miktarları için Tablo 1 – Konjugat Hazırlanışı'na bakınız.

TABLO 1. Konjugat Hazırlanışı

STRİP SAYISI	KONJUGAT 100X KONSANTRE HACMİ	YEŞİL DİLÜENT HACMİ
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

- Köpürmeyi engellemek için iyice ama kibarca karıştırınız.
 - Kullanımdan hemen sonra, kalan Konjugat 100X Konsantre'yi 2°C to 8°C'ye kaldırınız.
 - Sadece Yeşil Dilüent kullanınız.
5. Teste başlamadan önce, IFN-γ tüm numune içinde eşit dağıldığından emin olmak için, plazmalar çalkalanmalıdır.
 6. Kullanılan tüm ELISA kuyularına, çok kanallı pipet kullanarak, taze hazırlanmış çalışma konjugatından 50µL ekleyiniz.
 7. Çok kanallı pipet kullanarak, uygun kuyulara 50µL plazma numunelerini pipetleyin (tavsiye edilen plak yerleşimine bakınız – Şekil 2A & 2B). En son olarak her Standarttan 50µL pipetleyin.

ŞEKİL 2A. Nil & TB Antijen Tüpleri için Tavsiye Edilen Numune Yerleşimi
(Her plak için 44 test)

	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 (Standart 1), S2 (Standart 2), S3 (Standart 3), S4 (Standart 4).
- 1N (Numune 1. Nil Kontrol plazması); 1A (Numune 1. TB Antijen plazması).

ŞEKİL 2B. Nil, TB Antijen & Mitogen Tüpleri için Tavsiye Edilen Numune Yerleşimi
(Her plak için 28 test)

	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 (Standart 1), S2 (Standart 2), S3 (Standart 3), S4 (Standart 4).
- 1N (Numune 1. Nil Kontrol plazması); 1A (Numune 1. TB Antijen plazması);
1M (Numune 1. Mitogen Kontrol plazması).

8. Mikroplak çalkalayıcı kullanarak, 1 dakika konjugat ve plazma numuneleri/standartları iyice karıştırınız.
9. Her plağı kapak ile kapatın ve oda sıcaklığında ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) 120 ± 5 dakika inkübe edin.
 - İnkübasyon sırasında plaklar direk güneş ışığına maruz kalmamalıdır.
10. İnkübasyon sırasında, bir birim Wash Buffer 20X Konsantreyi 19 birim deiyonize veya distile su ile dilüe edin ve iyice karıştırın. Mevcut Wash Buffer 20X Konsantre, 2L yıkama solüsyonu hazırlamak için yeterlidir.

İnkübasyondan sonra kuyuları **400 μL** yıkama solüsyonu ile en az 6 kez yıkayınız. Otomatik bir plak yıkayıcı kullanılması tavsiye edilir.

 - Testin performansı için düzgün bir yıkama yapılması çok önemlidir. Her kyunun, her yıkama aşamasında, yıkama solüsyonu ile **tamamen dolu** olduğundan emin olun. Her yıkama adımı arasında en az 5 saniye bekleme periyodu (soak) olması tavsiye edilir.
 - Atık kabına standart laboratuvar dezenfektanı eklenmelidir ve potansiyel enfektif materyallerinin dekontaminasyonu için gerekli prosedürler uygulanmalıdır.
11. Plakları ters çevirip, kalan yıkama solüsyonunu kuyulardan uzaklaştırmak için kağıt havlu üzerine vurun. Her kuyuya 100 μL Enzim Substrat Solüsyonundan ekleyin ve bir mikroplak çalkalayıcı kullanarak iyice karıştırın.
12. Her plağı kapak ile kapatın ve oda sıcaklığında ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) 30 dakika inkübe edin.
 - İnkübasyon sırasında plaklar direk güneş ışığına maruz kalmamalıdır.
13. 30 dakikalık inkübasyonu takiben, her kuyuya 50 μL Enzim Durdurma Solüsyonu ekleyin ve karıştırın.
 - Enzime Durdurma Solüsyonununun kuyulara pipetlenmesi, 11. adımdaki substrat dağıtımındaki aynı sırayla ve yaklaşık olarak aynı hızda olmalıdır.
14. Bir mikroplak okuyucu kullanarak, 450nm ana dalga boyunda ve 620nm ila 650nm arasında bir referans dalgaboyunu kullanarak durdurma solüsyonunun eklenmesinden sonraki 5 dakika içinde her bir kyunun Optik Dansitesini (OD) ölçün. OD değerleri sonuçların hesaplanmasında kullanılır.

7. HESAPLAMA VE TESTİN YORUMLANMASI

Ham verilerin analizinde kullanılan ve sonuçları hesaplayan, QuantiFERON®-TB Gold IT Analiz Yazılımı, Cellestis tarafından hazırlanmıştır.

Yazılım, testin Kalite Kontrol değerlendirmesini, standart eğrinin çizilmesini ve Sonuçların Yorumlanması bölümünde anlatılan, her numunenin test sonuçlarının hesaplanmasını gerçekleştirir.

QuantiFERON®-TB Gold IT Analiz Yazılımını kullanmak yerine, sonuçlar aşağıdaki metoda göre hesaplanabilir:

Standart Eğrinin Çizilmesi

(QuantiFERON®-TB Gold IT Analiz Yazılımı kullanılmıyorsa)

Her plaktaki Kit Standardı tekrarlamalarından ortalama OD değerlerini hesaplayın.

IU/ml olarak, standartların IFN- γ konsantrasyonlarının $\log_{(e)}$ 'sine karşı (x-ekseni), ortalama OD'lerin $\log_{(e)}$ 'si (y-ekseni) ile bir $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standart eğrisi çiziniz, bu hesaplamalara sıfırlık standardı katmayınız. Standart eğrinin en iyi çizimini regresyon analizi hesaplayınız.

Numunelerin OD değerlerini kullanarak, her bir test plazma numunesinin IFN- γ konsantrasyonu (IU/mL) belirlemek için standart eğriyi kullanın.

Bu hesaplamalar, mikroplak okuyucularla gelen yazılımları, standart hesaplama programları veya istatistik yazılımları (Microsoft Excel gibi) ile de yapılabilir. Bu paketlerin, regresyon analizinin, standartların değişim katsayısının (%CV) ve standart eğrinin doğruluk katsayısının (r) hesaplanmasında kullanılması tavsiye edilir.

Testin Kalite Kontrolü

Test sonucunun kesinliği, doğru bir standart eğrinin oluşturulmasına bağlıdır. Bu yzden, standartlardan ortaya çıkan sonuçlar, numune sonuçları yorumlanmadan önce gözden geçirilmelidir.

ELISA'nın geçerli olması için:

- Standart 1'in ortalama OD değeri ≥ 0.600 olmalıdır.
- Standart 1 ve Standart 2'nin tekrarlarının OD değerleri arasındaki %CV $\leq 15\%$ olmalıdır.
- Standart 3 ve Standart 4'ün tekrarlamalarının OD değerleri, ortalamaları arasında 0.040 optik dansite değerinden fazla farklılık göstermemelidir.
- Standartların ortalama absorbans değerlerinden hesaplanan doğruluk katsayısı (r) ≥ 0.98 olmalıdır.

QuantiFERON[®]-TB Gold Analiz Yazılımı, bu kalite kontrol parametrelerini hesaplar ve raporlar.

Çalışma sonunda yukarıdaki kriterler uymuyorsa, çalışma geçersiz kabul edilmeli ve tekrarlanmalıdır.

- Sıfır Standardının (Yeşil Dilüent) ortalama OD değeri ≤ 0.150 olmalıdır. Eđer bu OD değeri > 0.150 ise plak yıkama prosedürü gözden geçirilmelidir.

Sonuçların Yorumlanması

QuantiFERON®-TB Gold IT sonuçları aşağıdaki kriterler kullanılarak yorumlanır:

DİKKAT: Tüberküloz hastalığının teşhisini yapmak veya olmadığını düşünmek ve LTBI ihtimalini değerlendirmek, epidemiyolojik, tarihsel, medikal ve QuantiFERON®-TB Gold IT sonuçları yorumlanırken dikkate alınması gereken tanı bulgularının bir kombinasyonunu gerektirir.

SADECE NİL & TB ANTİJEN TÜPLERİ KULLANILDIĞINDA

Nil [IU/mL]	TB Antijen – Nil farkı [IU/mL]	QuantiFERON®-TB	Rapor/Yorum
≤ 8.0	< 0.35	Negatif	<i>M. tuberculosis</i> enfeksiyonu olası DEĞİL
	≥ 0.35 ve < Nil değerinin %25'i		
	≥ 0.35 ve ≥ Nil değerinin %25'i	Pozitif¹	<i>M. tuberculosis</i> enfeksiyonu olasılığı yüksek
> 8.0 ²	Her Türlü	Şüpheli³	Sonuçlar TB-Antijen cevabına göre şüphelidir.

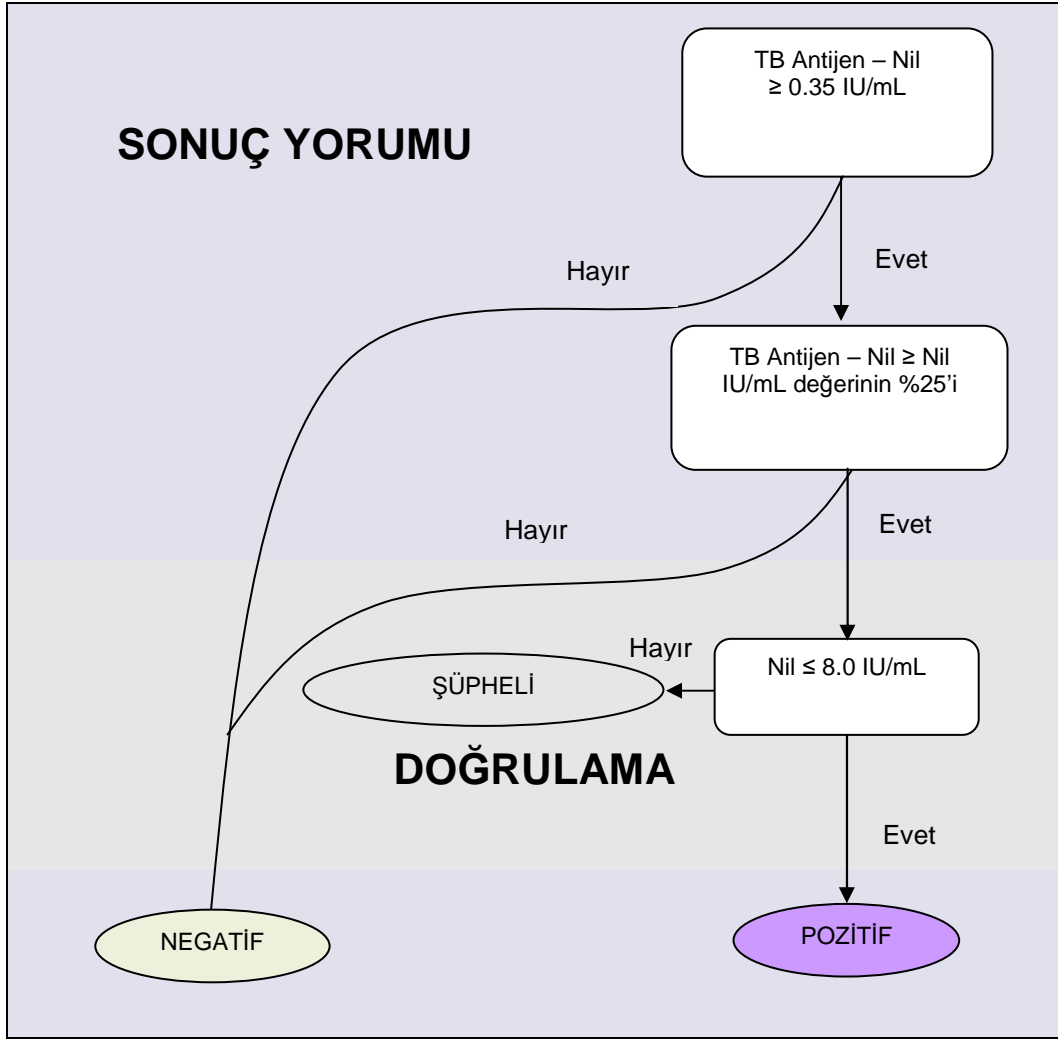
¹ *M. tuberculosis* enfeksiyonundan şüphelenilmediğinde, ilk bulunan pozitif sonuçlar, orijinal plazma numunelerinin çift tekrarlı olarak QuantiFERON®-TB Gold ELISA ile yeniden test edilerek doğrulanmalıdır. Testin tekrarlarından biri veya her ikisi de pozitif bulunursa, bireyin testi pozitif olarak düşünülür.

² Klinik çalışmalarda, numunelerin %0.25'inden daha azında Nil Kontrol için IFN-γ seviyesi > 8.0 IU/mL çıkmıştır.

³ Muhtemel sebepler için Problem Çözme bölümüne bakınız.

Ölçülen IFN-γ seviyesinin büyüklüğü ile, enfeksiyonun aşaması veya derecesi, immün cevap seviyesi veya aktif hastalığın gelişim ihtimali hakkında ilişki kurulamaz.

ŞEKİL 3. Yorum Akış Diyagramı NİL & TB ANTİJEN tüpleri kullandığında



NİL, TB ANTİJEN VE MITOGEN TÜPLERİ KULLANILDIĞINDA

Nil [IU/mL]	TB Antijen – Nil farkı [IU/mL]	Mitogen – Nil farkı [IU/mL] ¹	QuantiFERON®-TB	Rapor/Yorum
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5	Negatif	<i>M. tuberculosis</i> enfeksiyonu olası DEĞİL
	≥ 0.35 ve < Nil değerinin %25'i	≥ 0.5		
	≥ 0.35 ve ≥ Nil değerinin %25'i	Her Türü	Pozitif²	<i>M. tuberculosis</i> enfeksiyonu olasılığı yüksek
	< 0.35	< 0.5	Şüpheli³	Sonuçlar TB-Antijen cevabına göre şüphelidir.
≥ 0.35 ve < Nil değerinin %25'i	< 0.5			
> 8.0 ⁴	Her Türü	Her Türü		

¹ Mitogen pozitif kontrole (ve bazen TB Antijen) oluşan cevap, genellikle mikroplak okuyucuların okuma aralığının dışında olabilir. Bu durum test sonuçlarına herhangi bir etki oluşturulmaz.

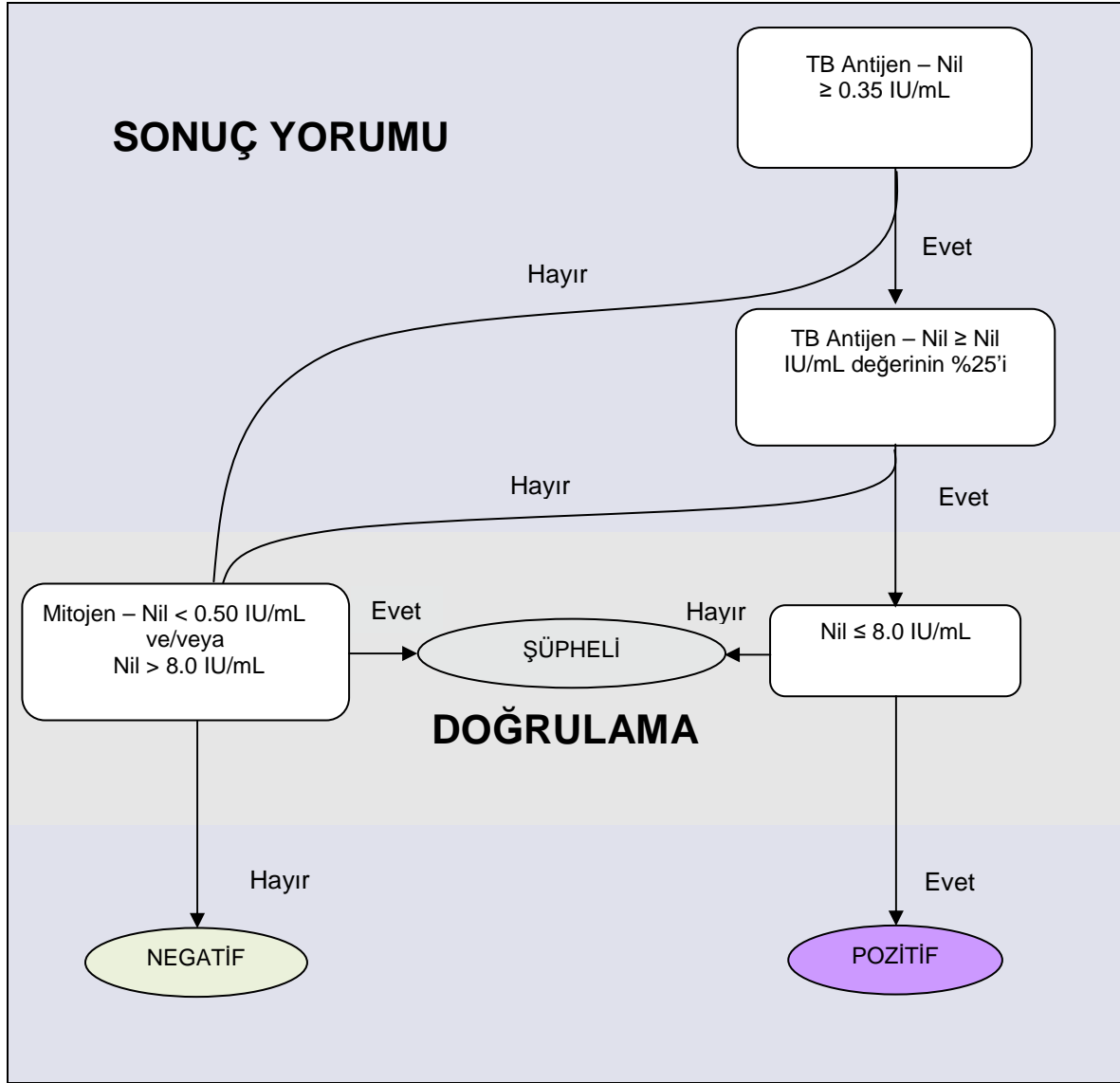
² *M. tuberculosis* enfeksiyonundan şüphelenilmediğinde, ilk bulunan pozitif sonuçlar, orijinal plazma numunelerinin çift tekrarlı olarak QuantiFERON®-TB Gold ELISA ile yeniden test edilerek doğrulanmalıdır. Testin tekrarlarından biri veya her ikisi de pozitif bulunursa, bireyin testi pozitif olarak düşünülür.

³ Muhtemel sebepler için Problem Çözme bölümüne bakınız.

⁴ Klinik çalışmalarda, numunelerin %0.25'inden daha azında Nil Kontrol için IFN- γ seviyesi > 8.0 IU/mL çıkmıştır.

Ölçülen IFN- γ seviyesinin büyüklüğü ile, enfeksiyonun aşaması veya derecesi, immün cevap seviyesi veya aktif hastalığın gelişim ihtimali hakkında ilişki kurulamaz.

FIGURE 4. Yorum Akış Diyagramı NİL, TB ANTİJEN & MITOGEN tüpleri kullandığında



8. SINIRLAMALAR

QuantiFERON®-TB Gold IT test sonuçları, her bireyin kendi epidemiyolojik geçmişi, mevcut medikal durumu ve diğer teşhis değerlendirmelerinin bir birleşimi ile birlikte kullanılmalıdır.

Nil değeri 8 IU/ml'den daha yüksek çıkan bireyler, “şüpheli” olarak sınıflandırılırlar, çünkü TB Antijenlerinin %25 daha yüksek cevabı, testin ölçüm aralığının dışında kalabilir.

Emin olunmayan veya şüpheli sonuçlar aşağıdaki sebepler nedeniyle olabilir:

- Paket Prospektüsünde anlatılan prosedürün tam uygulanmaması,
- Dolaşımdaki IFN- γ seviyesinin aşırı yüksek olması veya heterofil antikorların varlığı,
- Kan numunelerinin 37°C'deki inkübasyonunun 16 saatten fazla olması.

9. PERFORMANS ÖZELLİKLERİ

Klinik Çalışmalar

Gizli tüberküloz enfeksiyonu (LTBI) için kesin bir standart olmadığından, QuantiFERON®-TB Gold IT testinin hassasiyetinin ve özgüllüğünün belirlenmesi, pratik olarak yapılamaz. QuantiFERON®-TB Gold IT testinin özgüllüğü, tüberküloz enfeksiyonu açısından düşük riskli (bilinen risk faktörlerinin olmadığı) bireylerdeki yalancı pozitif oranının değerlendirilmesi ile yaklaşık olarak tahmin edilebilir. Hassasiyeti ise, kültür ile doğrulanmış aktif TB hastası grubunun değerlendirmesi ile tahmin edilebilir.

Özgüllük

866 gönüllü ile yapılan Amerika'daki bir çalışmada, TST yapıldığında, QuantiFERON®-TB Gold IT için de kan alınmıştır. TB demografik bilgi ve risk faktörleri, test yapım sırasında, standart bir araştırma kullanılarak belirlenmiştir. 432 gönüllüde *M. tuberculosis* enfeksiyonu için bilinen bir risk faktörü bulunmamış, bunlardan sadece 391'ine QuantiFERON®-TB Gold IT ve TST uygulanabilmiştir. Bu bireylerin hiçbirine BCG aşısı yapılmamıştır. İkinci özgüllük çalışması Japonya'da düşük risk taşıyan bireylerde QuantiFERON®-TB Gold IT ile yapılmıştır. Bu grubun yaklaşık %90'ı daha önceden BCG ile aşılanmıştır. Her iki özgüllük çalışmasının sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. QuantiFERON®-TB Gold IT özgüllüğü: *M. tuberculosis* enfeksiyonu açısından herhangi bir riski bulunmayan bireylerin sonuçları.

ÇALIŞMA	BCG Durumu Aşlanmış %	Toplam Test Edilen	QFT-G Şüpheli Sayısı	QFT-G Pozitif Sayısı / Geçerli Test Sayısı	QFT-G Özgüllüğü (95% CI)	TST Pozitif Sayısı / Test Edilmiş Sayısı	TST* Özgüllüğü (95% CI)
Amerika (yayınlanmamış)	0%	391	1	3 / 390	99.2% (97.6-99.8)	6 / 391	98.5% (96.5-99.4)
Japonya (yayınlanmamış)	~90%	190	4	3 / 186	98.4% (95-99.6)	-	-
TOPLAM		581	5/584 (0.9%)	6 / 576	99.0%	-	-

* 10mm TST cut off olarak kullanıldı. TST özgüllüğü 15 mm cut off olarak kullanıldığında %99.1 olarak belirlenmiştir.

Aktif TB için hassasiyet

Avustralya ve Japonya'dan TB-şüphesi olan kişiler (*M. tuberculosis* enfeksiyonu olduğu daha sonradan kültür ile doğrulanmıştır) QuantiFERON®-TB Gold IT testinin hassasiyetinin belirlenmesi için çalışılmıştır. Gizli tüberküloz enfeksiyonu (LTBI) için kesin bir standart olmadığından, hastalıklı bireylerin enfekte olduğunun belirlenmesinde, *M. tuberculosis* mikrobiyolojik kültürü kullanılmıştır. Hastalar, QuantiFERON®-TB Gold IT testi için kan alınmadan önce, en az 8 gün tedavi görmüşlerdir.

Tablo 3, *M. tuberculosis* kültürü pozitif olan iki grubun bulgularını özetlemektedir. Aktif TB hastalığı için QuantiFERON®-TB Gold IT testin genel hassasiyeti %89'dur (48/54).

Tablo 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Kültürle doğrulanmış *M. tuberculosis* enfeksiyonu bulunan bireyler.

ÇALIŞMA	Hastalığın doğrulama şekli	QFT-Gold Pozitif Sayısı / Geçerli Test Sayısı	QFT-Gold Hassasiyeti (95% CI)
Japon TB Hastaları Doğrulama Çalışması	Kültür	24 / 27	89% (72-96%)
Avustralyalı TB Hastaları Doğrulama Çalışması	Pulmoner	7 / 10	70% (40-89%)
	Ekstra-Pulmoner	17 / 17	100% (82-100%)
TOPLAM		48 / 54	89% (78-95%)

LTBI Teşhisi

LTBI riskindeki çeşitli populasyonların, QuantiFERON®-TB Gold IT testinin performansını gösteren birçok çalışma yayınlanmıştır. Bazı seçilen çalışmaların kaynak ve bulguları Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. LTBI riskindeki populasyonların QuantiFERON®-TB Gold IT çalışmalarının seçilen yayımları.

ÇALIŞMA	Toplam test edilen	Sonuçlar ve Bulgular
Hindistan HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁷	726	Çok yüksek TB oranı. %40 QFT-Gold IT pozitifliği, 10mm'ye göre %41 TST pozitifliği. TST ile yüksek uyumluluk, ayrıca BCG etkisinin olmaması. Her iki test de yaş ve sağlık alanında çalışma süresi açısından ilişkili
Danish HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	HIV ⁺ bireylerdeki genel LTBI prevalansı QFT-Gold IT ile %4.6 (27/590) bulunmuştur. Pozitif sonuçlar TB riski ile ilişkilendirilmiştir. İki QFT-Gold IT pozitif bireyde bir yıl içinde aktif TB gelişmiştir. Sonuçları şüpheli çıkan (n=20, 3.4%) bireylerin CD4 sayısı <100 / µL belirgin bir şekilde ilişkilendirilmiştir.
Hastanede Yatan Çocuklar (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	TB şüphesi olan veya TB teması olan çocuklarda QFT-Gold IT testi ve TST çalışılmıştır. %10.5 QFT-Gold IT pozitifliği, 10mm'ye göre %9.5 TST pozitifliği. Testler arası uyuma genel olarak %95.2 ve BCG aşılı olmayanlarda %100'dür.
Alman Temaslı Bireyler (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	15 farklı yakın temas grubu test edilmiştir. %51'i BCG ile aşılı, %27'si ise farklı bir ülkede doğmuştur. BCG aşılarının %70'i ve aşılı olmayanların %18'i TST pozitifdir (5mm), oysa, aynı sırayla sadece %9 ve %11'i QFT-Gold IT pozitifdir. QFT-Gold IT TB riski ile ilişkilendirilmiştir. TST ise sadece BCG aşısıyla ilişkilendirilmiştir.

Çok fazla yayında daha düşük hassasiyetliğe sahip QuantiFERON®-TB Gold likit antijen versiyonunun (QuantiFERON®-TB Gold IT'nin öncüsü) ve QuantiFERON®-TB Gold IT testinin performansı tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda; aktif TB vakalarıyla temasta olanlar^{9,11,19,25}, çocuklar^{6-10,25,28}, HIV pozitif^{2,5,20}, sağlık sektörü çalışanları^{13,26,32}, bağışıklık sistemi baskılanmış kişiler^{3,4,22,23,27,30,31} TB şüphesi olanlar^{7,8,10,18} ve düşük riskli bireyler¹⁵ de çalışılmıştır.

Tekrarlanabilirlik ve QuantiFERON®-TB Gold testinin üzerine TST'nin etkisi

Amerikan özgüllük çalışmasının bir bölümü olarak, gönüllülerin bir altgrubu ilk QuantiFERON®-TB Gold IT testi ve TST'den sonra 4 ila 5 hafta içinde tekrar test edilmiştir. 260 birey için QuantiFERON®-TB Gold IT testi sonuçları her iki kez için de mevcuttur ve uyuma seviyesi %99.6'dır (259/260). Önceki yapılan TST, pozitif QuantiFERON®-TB Gold IT yanıtına neden olmamıştır.

10. TEKNİK BİLGİ

Şüpheli Sonuçlar

Şüpheli sonuçlar nadir olarak olabilir ve testi yapılan kişinin immün durumundan kaynaklanabilir, ancak birçok teknik faktörden de kaynaklanmış olabilir:

- 37°C'deki kanın inkübasyonunun 16 saatten fazla olması
- Kanın tavsiye edilen sıcaklık aralığının (22°C ± 5°C) dışında bekletilmesi
- Kan alma tüplerinin yeterli olarak karıştırılmaması
- ELISA plağının düzgün yıkanmaması

Kan numunelerinin alımı, kullanımı ile ilgili bir teknik sorundan şüpheleniliyorsa, tüm QuantiFERON®-TB Gold IT testini yeni kan numunesi ile tekrarlayınız. Yetersiz yıkama veya diğer prosedürdeki sapmalardan şüpheleniliyorsa, Uyarılmış plazmalar ile ELISA testinin tekrarlanması yapılmalıdır. Düşük Mitogen veya yüksek Nil değerlerinden kaynaklanan şüpheli sonuçlar, ELISA testinde bir hata olmadığında, tekrarlanmasına gerek yoktur. Şüpheli sonuçlar olduğu gibi raporlanır. Uzman doktor, yeni bir numune için kan alımına veya uygun diğer prosedürlerin uygulanmasına karar verebilir.

Pıhtılı Plazma Numuneleri

Plazma numunelerinin uzun süreli saklanması fibrin oluşumuna neden olabilir, böyle bir durumda, pıhtının çökmesi ve plazmanın pipetlenmesini kolaylaştırmak için numuneyi santrifüj ediniz.

ELISA Sorun Çözme

Spesifik olmayan Renk Oluşumu

MUHTEMEL NEDEN	ÇÖZÜM
Yetersiz plak yıkaması.	Plağı en az 6 kez 400µL/kuyu yıkama solüsyonu ile yıkayınız. Kullanılan yıkayıcıya bağlı olarak 6 yıkamadan fazlası gerekli olabilir. Yıkama adımları arası bekleme (soak) süresi en az 5 saniye olmalıdır.
ELISA kuyularının birbirine kontaminasyonu.	Pipetleme veya numunelerin çalkalanması sırasında riski azaltmak için dikkat edin.
Kit / Reaktiflerin son kullanma tarihinin geçmesi.	Kullanılan kitin son kullanma tarihinin geçmediğinden emin olun. Çözülen Standardın ve Konjugat 100X Konsantrenin çözüldüğü tarihten sonraki 3 ay için kullanıldığından emin olun.
Enzim Substrat Solüsyonunun kontamine olması.	Mavi renklenme mevcutsa substratı kullanmayın. Temiz reaktif kapları kullanıldığından emin olun.

Standartların Düşük Optik Dansite Okumaları

MUHTEMEL NEDEN	ÇÖZÜM
Standartların dilüsyon hatası.	Kit standardının prospektüste anlatıldığı şekilde hazırlandığından emin olun.
Pipetleme hatası.	Pipetlerin üreticilerinin belirttiği gibi kalibre edildiğinden emin olun.
İnkübasyon sıcaklığının çok düşük olması.	ELISA'nın inkübasyonu oda sıcaklığında, 17°C ila 27°C yapılmalıdır.
İnkübasyon süresinin çok kısa olması.	Plağın konjugat, standartlar ve numuneler ile inkübasyonu 120 ± 5 dakika olmalıdır. Enzim Substrat Solüsyonu plakta 30 dakika inkübe edilmelidir.
Hatalı plak okuyucu filtresi kullanılması.	Plak ana filtre olarak 450nm'de, referans filtre olarak da 620 ila 650nm arasında okunmalıdır.
Reaktiflerin çok soğuk olması.	Konjugat 100X Konsantre hariç, tüm reaktifler, All reagents, with the exception of the Konjugat 100X Concentrate, mutlaka teste başlamadan önce oda sıcaklığına getirilmelidir. Bu işlem yaklaşık bir saat sürer.
Kit / Reaktiflerin son kullanma tarihinin geçmesi.	Kullanılan kitin son kullanma tarihinin geçmediğinden emin olun. Çözülen Standardın ve Konjugat 100X Konsantrenin çözüldüğü tarihten sonraki 3 ay için kullanıldığından emin olun.

Yüksek Arka Plan Rengi

MUHTEMEL NEDEN	ÇÖZÜM
Yetersiz plak yıkaması.	Plağı en az 6 kez 400µL/kuyu yıkama solüsyonu ile yıkayınız. Kullanılan yıkayıcıya bağlı olarak 6 yıkamadan fazlası gerekli olabilir. Yıkama adımları arası bekleme (soak) süresi en az 5 saniye olmalıdır.
İnkübasyon sıcaklığının çok yüksek olması.	ELISA'nın inkübasyonu oda sıcaklığında, 17°C ila 27°C yapılmalıdır.
Kit / Reaktiflerin son kullanma tarihinin geçmesi.	Kullanılan kitin son kullanma tarihinin geçmediğinden emin olun. Çözülen Standardın ve Konjugat 100X Konsantrenin çözülmediği tarihten sonraki 3 ay için kullanıldığından emin olun.
Enzim Substrat Solüsyonunun kontamine olması.	Mavi renklenme mevcutsa substratı kullanmayın. Temiz reaktif kapları kullanıldığından emin olun.

Doğrusal Olmayan Standart Eğri ve Tekrarlama Değişkenliği

MUHTEMEL NEDEN	ÇÖZÜM
Yetersiz plak yıkaması.	Plağı en az 6 kez 400µL/kuyu yıkama solüsyonu ile yıkayınız. Kullanılan yıkayıcıya bağlı olarak 6 yıkamadan fazlası gerekli olabilir. Yıkama adımları arası bekleme (soak) süresi en az 5 saniye olmalıdır.
Standartların dilüsyon hatası.	Kit standardının prospektüste anlatıldığı şekilde hazırlandığından emin olun.
Yetersiz karıştırma.	Plağa pipetlemeden önce, reaktifleri alt üst yaparak veya vorteksleyerek iyice karıştırın.
Değişken pipetleme tekniği veya testin yapılışı sırasında ara verilmesi.	Numune ve standartların eklenmesi, ara vermeden yapılmalıdır. Tüm reaktifler teste başlamadan önce hazırlanmalıdır.

Analiz prosedürünün videosu ve çoğu teknik problemlerin çözümü, Cellestis'ten veya distribütörünüzden ücretsiz olarak isteyebileceğiniz Ürün Bilgisi ve Teknik kılavuz CD'sinde bulunmaktadır.

11. KAYNAKÇA

QuantiFERON®-TB Gold IT referanslarının geniş bir listesini Cellestis web sitesinde (www.cellestis.com) yer almaktadır.

1. **Andersen, P., et al.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. **Balcells, M.E., et al.** A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis.* 2008. 12; 645-52.
3. **Bartalesi, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2008. [Epub ahead of print].
4. **Bocchino, M., et al.** Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008. 27; 907-13.
5. **Brock, I., et al.** Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res.* 2006. 7; 56.
6. **Chun, J.K., et al.** The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008. 62; 389-94.
7. **Connell, T.G., et al.** A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. **Detjen, A.K., et al.** Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007. 45; 322-8.
9. **Diel, R., et al.** Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2008. [Epub ahead of print].
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2008. [Epub ahead of print].
17. **Kang, Y.A., et al.** Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA.* 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.
22. **Manuel, O., et al.** Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007. 7; 2797-801.

23. **Matulis, G., et al.** Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann Rheum Dis.* 2007. 67; 84-90.
24. **Mirtskhulava, V., et al.** Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 513-519.
25. **Nakaoka, H., et al.** Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis.* 2006. 12; 1383-8.
26. **Pai, M., et al.** Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-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. TEKNİK SERVİS

Teknik servis için lütfen şunlara başvurun:

Cellestis International Pty Ltd: Phone: +61 3 9571 3500
Fax: +61 3 9571 3544
Email: quantiferon@cellestis.com
Website: www.cellestis.com

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

13. KISALTILMIŞ TEST PROSEDÜRÜ

AŞAMA 1 – KANIN İNKÜBASYONU

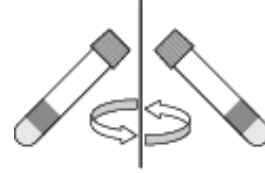
1. Hastanın kanını kan alma tüplerine alın ve **tüplerin tüm iç yüzeyinin kanla kaplandığından emin olacak şekilde**, tüpleri **5 saniye (veya 10 kez) şiddetlice çalkalayınız**.



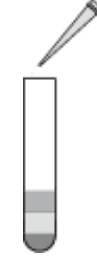
2. Tüpleri **dik olarak** 37°C'de 16 ila 24 saat inkübe edin.



3. İnkübasyondan sonra, plazma ve eritrositlerin ayrılması için 5 ila 15 dakika, 2000 ila 3000g RCF'de santrifüj edin.



4. Santifüjden sonra, IFN- γ ölçümü için plazma numunelerini ayırın.



AŞAMA 2 – IFN- γ ELISA

1. Konjugat 100X Konsantre hariç, ELISA reaktiflerini çalışma sıcaklığına getirmek için, oda sıcaklığında en az 60 dakika bekletin.

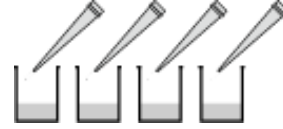


2. Kit standardını 8.0 IU/ml olacak şekilde distile veya deiyonize su ile çözün. Dört (4) standart dilüsyonunu hazırlayın.

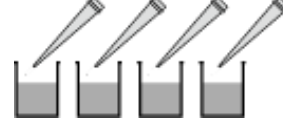


3. Dondurularak kurutulmuş Konjugat 100X Konsantre'yi distile veya deiyonize su ile çözün.

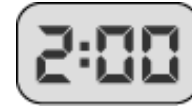
4. Çalışma konjugatını Yeşil Dilüent ile hazırlayın ve her kuyuya 50 μ L pipetleyin.



5. İlgili kuyulara 50 μ L plazma numunelerini ve 50 μ L standartları pipetleyin. Çalkalayıcı kullanarak karıştırın.

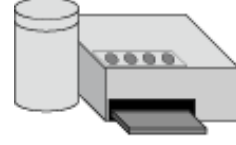


6. Oda sıcaklığında 120 dakika inkübe edin.



AŞAMA 2 – IFN- γ ELISA (devam)

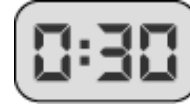
7. 400 μ L/kuyu olacak şekilde yıkama solüsyonu ile en az 6 kez yıkayın.



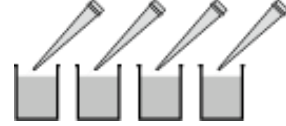
8. Kuyulara 100 μ L Enzim Substrat Solüsyonu pipetleyin. Çalkalayıcı kullanarak karıştırın.



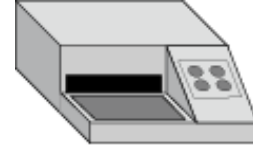
9. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edin.



10. Tüm kuyulara 50 μ L Stop Solüsyonu ekleyin. Çalkalayıcı kullanarak karıştırın.



11. Plağı 450nm ana filtre ve 620 ila 650nm referans filtre kullanarak okuyun.



12. Sonuçları hesaplayın.





Üretim:

Cellestis Limited (Avustralya)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia
Tel (Aust) +61 3 9571 3500
ve Cellestis GmbH (Avrupa) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Website: www.cellestis.com

Doc. No. 05990301C
August 2009

