

# *QuantiFERON<sup>®</sup>-TB* **Gold**

Εξέταση IFN-γ Πλήρους Αίματος  
Μετρώντας τις Αποκρίσεις στα Αντιγονικά Πεπτίδια  
ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4)

ΕΝΘΕΤΟ  
ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Για Διαγνωστική Χρήση *In Vitro*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ	2
2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ	2
Βασικές Αρχές Της Ανάλυσης	3
Χρόνος Που Απαιτείται Για Την Ανάλυση	3
3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ	4
Υλικά Που Απαιτούνται (αλλά δεν παρέχονται)	4
Οδηγίες Φύλαξης	5
Φιαλίδια Συλλογής Αίματος	5
Αντιδραστήρια του Kit ELISA	5
Ανασυσταμένα και Αχρησιμοποίητα Αντιδραστήρια	5
4. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ	6
Προειδοποιήσεις	6
Προφυλάξεις	7
5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	8
6. ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ	10
ΠΡΩΤΟ ΣΤΑΔΙΟ - Επώαση Αίματος και Λήψη Πλάσματος	10
ΔΕΥΤΕΡΟ ΣΤΑΔΙΟ - Ανάλυση ELISA Ανθρώπινης IFN- $\gamma$	11
7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	14
Προετοιμασία Καμπύλης Βαθμονόμησης	14
Ποιοτικός Έλεγχος της Εξέτασης	15
Ερμηνεία Αποτελεσμάτων	16
8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ	20
9. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ	20
10. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ	22
Διφορούμενα Αποτελέσματα	22
Πηγμένα Δείγματα Πλάσματος	22
Αντιμετώπιση Προβλημάτων ELISA	23
Ακαθόριστη Ανάπτυξη Χρώματος	23
Χαμηλές Ενδείξεις Οπτικής Πυκνότητας στους Βαθμονομητές	23
Υψηλό Υπόβαθρο	24
Μη Γραμμική Καμπύλη Βαθμονομητή και Διακύμανση Επαναλήψεων	24
11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	25
12. ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ	26
13. ΣΥΝΤΟΜΕΥΜΕΝΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ	27
14. ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ	30

## 1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Η QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT®) είναι διαγνωστική μέθοδος *in vitro* που χρησιμοποιεί ένα απλό μίγμα πεπτιδίων που προσομοιώνονται με τις πρωτεΐνες ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4) για να διεγείρουν τα κύτταρα στο ηπαρινοσμένο πλήρες αίμα. Ο εντοπισμός της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) με ανοσοπροσροφητική ανάλυση συνδεδεμένη με ένζυμα (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) χρησιμεύει στον εντοπισμό *in vitro* αντιδράσεων σε αυτά τα αντιγονικά πεπτίδια που συνδέονται με τη μόλυνση από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Mycobacterium tuberculosis*).

Το QFT είναι μια έμμεση εξέταση για μόλυνση από το *M. tuberculosis* (συμπεριλαμβανόμενης και της νόσου) και προορίζεται για χρήση παράλληλα με την εκτίμηση κινδύνων, τη ραδιογραφία και άλλες ιατρικές και διαγνωστικές αποτιμήσεις.

## 2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Η φυματίωση είναι μεταδοτική νόσος που προκαλείται από μόλυνση με οργανισμούς του *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), που συνήθως μεταφέρεται σε νέους ξενιστές αερογενώς με πυρήνες σταγονιδίων από ασθενείς με φυματίωση του αναπνευστικού συστήματος. Ένα άτομο που μόλις έχει μολυνθεί μπορεί να νοσήσει από φυματίωση σε εβδομάδες ή μήνες, αλλά τα περισσότερα μολυσμένα άτομα παραμένουν υγιή. Σε ορισμένα παραμένει μόλυνση από λανθάνουσα φυματίωση, μια μη μεταδοτική ασυμπτωματική πάθηση, και τα άτομα αυτά ίσως νοσήσουν από φυματίωση μήνες ή χρόνια αργότερα. Ο κύριος σκοπός της διάγνωσης φυματίωσης είναι η παροχή θεραπείας για να αποφευχθεί η φυματίωση. Μέχρι πρόσφατα η δερμοαντίδραση της φυματίωσης (TST ή Mantoux) ήταν η μοναδική μέθοδος διάγνωσης της λανθάνουσας φυματίωσης. Η δερματική ευαισθησία στη φυματίνη αναπτύσσεται 2 με 10 εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Ωστόσο, ορισμένα μολυσμένα άτομα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με ευρύ φάσμα παθήσεων που εμποδίζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, δεν αποκρίνονται στη φυματίνη. Αντίθετα, ορισμένα άτομα που δεν είναι πιθανό να έχουν μολυνθεί από το *M. tuberculosis* παρουσιάζουν ευαισθησία στη φυματίνη και έχουν θετικά αποτελέσματα έπειτα από εμβολιασμό με βάκιλο Calmette-Guérin (BCG), μόλυνση από μυκοβακτηρίδια εκτός του *M. tuberculosis complex*, ή άλλους απροσδιόριστους παράγοντες.

Η λανθάνουσα φυματίωση πρέπει να διαχωριστεί από τη φυματίωση, μια πάθηση που πρέπει να αναφέρεται και η οποία συνήθως επιδρά στους πνεύμονες και την άνω αναπνευστική οδό, αν και μπορούν να επηρεαστούν και άλλα οργανικά συστήματα. Η διάγνωση της φυματίωσης γίνεται με βάση το ιατρικό ιστορικό και φυσικές, ραδιολογικές, ιστολογικές και μυκοβακτηριδιακές εξετάσεις.

Το QFT είναι εξέταση για κυτταροεξαρτώμενη ανοσία (Cell Mediated Immunity - CMI) σε αντιγονικά πεπτίδια που προσομοιώνονται με μυκοβακτηριδιακές πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες, οι ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4), απουσιάζουν από όλα τα στελέχη BCG και από τα περισσότερα μη-φυματικά μυκοβακτηρίδια με εξαίρεση τα *M. kansasii*, *M. szulgai* και *M. marinum*.<sup>1</sup> Τα άτομα που έχουν μολυνθεί από οργανισμούς *M. tuberculosis* συνήθως έχουν λεμφοκύτταρα στο αίμα τους που αναγνωρίζουν αυτά και άλλα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα. Η διαδικασία αναγνώρισης γίνεται με την παραγωγή και έκκριση της κυτοκίνης ιντερφερόνης-γ (IFN-γ). Ο εντοπισμός και η επακόλουθη ποσοστοποίηση της IFN-γ αποτελούν τη βάση της παρούσας εξέτασης.

Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στο QFT είναι ένα μίγμα πεπτιδίων που προσομοιώνονται με τις πρωτεΐνες ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα αντιγονικά πεπτίδια προκαλούν αποκρίσεις της IFN-γ σε T κύτταρα ατόμων που έχουν μολυνθεί από *M. tuberculosis* αλλά συνήθως όχι από μη μολυσμένα άτομα ή άτομα εμβολιασμένα με BCG που δεν νοσούν ή που δεν κινδυνεύουν από λανθάνουσα φυματίωση.<sup>1-32</sup> Ωστόσο, ιατρικές θεραπείες ή παθήσεις που εμποδίζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν δυνητικά να μειώσουν την απόκριση της IFN-γ. Οι ασθενείς με ορισμένες άλλες μυκοβακτηριδιακές μολύνσεις πιθανώς να παρουσιάσουν και αυτοί ευαισθησία στα ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4), επειδή τα γονίδια, επάνω στα οποία βρίσκονται αυτές οι πρωτεΐνες, εμφανίζονται στα *M. kansasii*, *M. szulgai* και *M. marinum*.<sup>1,23</sup> Το QFT είναι τόσο εξέταση για λανθάνουσα φυματίωση όσο ένα χρήσιμο βοήθημα διάγνωσης μόλυνσης *M. tuberculosis complex* σε νοσούντες ασθενείς. Ένα θετικό αποτέλεσμα στηρίζει τη διάγνωση φυματίωσης, αλλά οι μολύνσεις από άλλα μυκοβακτηρίδια (π.χ. *M. kansasii*) μπορούν να επιφέρουν και αυτές θετικό αποτέλεσμα. Απαιτούνται και άλλες ιατρικές και διαγνωστικές εξετάσεις για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της φυματίωσης.

## **Βασικές Αργές της Ανάλυσης**

Το QFT® χρησιμοποιεί ειδικά φιαλίδια συλλογής αίματος που χρησιμεύουν στη λήψη πλήρους αίματος. Μετά από την επώαση εντός των φιαλιδίων για περίοδο 16 με 24 ωρών, γίνεται λήψη και εξέταση του πλάσματος για τον εντοπισμό της παρουσίας IFN- $\gamma$  που παράχθηκε σε απόκριση στα αντιγονικά πεπτίδια.

Το QFT γίνεται σε δύο στάδια. Πρώτα, το πλήρες αίμα συλλέγεται σε καθένα από τα φιαλίδια συλλογής αίματος QFT, τα οποία περιλαμβάνουν ένα φιαλίδιο Μηδενικού Ελέγχου, ένα φιαλίδιο Αντιγόνου Φυματίωσης και ένα προαιρετικό φιαλίδιο Μιτογόνου.

Το φιαλίδιο Μιτογόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί με την εξέταση QFT σαν θετικός μάρτυρας. Αυτό ενδείκνυται ειδικά όταν υπάρχει αμφιβολία ως προς την ανοσία του ατόμου. Το φιαλίδιο Μιτογόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν έλεγχος για τον σωστό χειρισμό και τη σωστή επώαση του αίματος.

Τα φιαλίδια πρέπει να επωαστούν στους 37°C το συντομότερο δυνατόν, εντός 16 ωρών από τη συλλογή του αίματος. Μετά από περίοδο επώασης 16 με 24 ωρών, τα φιαλίδια φυγοκεντρίζονται, αφαιρείται το πλάσμα και η τιμή της IFN- $\gamma$  (IU/mL) μετريέται μέσω ανάλυσης ELISA.

Μια εξέταση θεωρείται θετική όταν η απόκριση IFN- $\gamma$  στο φιαλίδιο Αντιγόνου Φυματίωσης υπερβαίνει κατά πολύ τη μηδενική τιμή IFN- $\gamma$  IU/mL. Εφόσον χρησιμοποιηθεί, το δείγμα πλάσματος που διεγείρεται από το Μιτογόνο χρησιμεύει ως θετικός έλεγχος IFN- $\gamma$  για κάθε δείγμα που εξετάζεται. Μια χαμηλή απόκριση στο Μιτογόνο (<0.5 IU/mL) υποδηλώνει διαφορετικό αποτέλεσμα όταν το δείγμα αίματος παρουσιάζει επίσης αρνητική απόκριση στα αντιγόνα της φυματίωσης. Αυτό μπορεί να συμβεί σε περίπτωση ανεπάρκειας λεμφοκυττάρων, μειωμένης λεμφοκυτταρικής δραστηριότητας λόγω του κακού χειρισμού των δειγμάτων, λανθασμένου γεμίματος/ανάμειξης του φιαλιδίου Μιτογόνου, ή επειδή τα λεμφοκύτταρα του ασθενή δεν μπορούν να παράγουν IFN- $\gamma$ . Ο Μηδενικός Έλεγχος διορθώνει το υπόβαθρο, τις επιδράσεις των ετερόφιλων αντισωμάτων<sup>7</sup>, ή τη μη συγκεκριμένη IFN- $\gamma$  στα δείγματα αίματος. Το επίπεδο της IFN- $\gamma$  στο φιαλίδιο Μηδενικού Ελέγχου αφαιρείται από το επίπεδο IFN- $\gamma$  στο φιαλίδιο Αντιγόνου Φυματίωσης και το φιαλίδιο Μιτογόνου (εφόσον χρησιμοποιηθεί).

## **Χρόνος που Απαιτείται για την Ανάλυση**

Ο εκτιμώμενος χρόνος που απαιτείται για τη μέθοδο QFT παρουσιάζεται παρακάτω, μαζί με τον χρόνο ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων σε παρτίδες: με την μέθοδο Batch-Modus.

37°C Επώαση φιαλιδίων αίματος: 16 έως 24 ώρες

ELISA: Περίπου 3 ώρες για μια πλάκα ELISA (28 - 44 άτομα)

- <1 ώρα εργασίας
- Προσθέσετε 10 έως 15 ώρες για κάθε επιπλέον πλάκα

### 3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ

#### Φιαλίδια Συλλογής Αίματος Αντιγόνων Φυματίωσης και Ελέγχου

##### Αρ. Καταλόγου T0590-0301

- |                                         |                |
|-----------------------------------------|----------------|
| 1. Μηδενικός Έλεγχος (Γκριζο καπάκι)    | 100 x φιαλίδια |
| 2. Αντιγόνο Φυματίωσης (Κόκκινο καπάκι) | 100 x φιαλίδια |
| 3. Έλεγχος Μιτογόνου (Πορφυρο καπάκι)   | 100 x φιαλίδια |

*ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα φιαλίδια είναι διαθέσιμα και σε άλλους συνδυασμούς:*

*100 x φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου, 100 x φιαλίδια Αντιγόνου Φυματίωσης (Αρ. Κατ. T0590-0201)  
100 x φιαλίδια Ελέγχου Μιτογόνου (Αρ. Κατ. T0593-0201)*

*Αριθ. παραγγελίας T0590-0501: (για μεγάλα υψόμετρα) 100 φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου, 100 Tb φιαλίδια Αντιγόνου Φυματίωσης*

*Αριθ. παραγγελίας T0590-0505: (για μεγάλα υψόμετρα) 100 φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου, 100 Tb φιαλίδια Αντιγόνου Φυματίωσης και 100-x φιαλίδια Ελέγχου Μιτογόνου*

*Αριθ. παραγγελίας T0593- 0501 (για μεγάλα υψόμετρα) 100 x φιαλίδια Ελέγχου Μιτογόνου*

#### Συστατικά ELISA

Συστατικά ELISA	Αρ. Καταλόγου 0594-0201 2-πλάκες κιτ	Αρ. Καταλόγου 0594- 0501 Αναφορά Lab Pack
Ταινίες μικροπλακών επιστρωμένες με ενδημικό αντι-ανθρώπειο IFN-γ μονοκλωνικό αντίσωμα	2 x 96 θέσεις πλακών	20 x 96 θέσεις πλακών
Ανθρώπινο τυποποιημένο λυοφιλοποιημένο IFN-γ (περιέχει ανασυνδυασμένο ανθρώπινο IFN-γ, βοδινή καζεΐνη, 0,01 % κ.ο (κατ' όγκο) θυμεροσάλη)	1 x φιάλη (8 IU/ml εφόσον ανασυσταθεί)	10 x φιάλη (8 IU/ml εφόσον ανασυσταθεί)
Πράσινο Αραιωτικό (περιέχει βοδινή καζεΐνη, κανονικός ορός ποντικού, 0,01 % κ.ο (κατ' όγκο) θυμεροσάλη)	1 x 30mL	10 x 30mL
Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X, λυοφιλοποιημένο (ενδημικό αντι-ανθρώπειο IFN-γ HRP, (περιέχει 0,01 % κ.ο (κατ' όγκο) θυμεροσάλη)	1 x 0,3mL (εφόσον ανασυσταθεί)	10 x 0,3mL (εφόσον ανασυσταθεί)
Συμπυκνωμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 20X (ph 7.2, περιέχει 0,01 % κ.ο (κατ' όγκο) θυμεροσάλη)	1 x 100mL	10 x 100mL
Διάλυμα Ενζυμικού Υποστρώματος (περιέχει H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3.3'/5.5' τετραμεθυλο-βενζιδίνη)	1 x 30mL	10 x 30mL
Διάλυμα αναστολής ενζύμων (περιέχει 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 x 15mL	10 x 15mL

### **Υλικά Που Απαιτούνται (αλλά δεν παρέχονται)**

- Κλίβανος 37°C. Δεν απαιτείται CO<sub>2</sub>.
- Βαθμονομημένες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου για διανομή 10μL - 1000μL με αναλώσιμα ρύγχη.
- Βαθμονομημένη πολυκάναλη πιπέτα για διανομή 50μL και 100μL με αναλώσιμα ρύγχη.
- Συσκευή ανάδευσης μικροπλακών.
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό - 2L.
- Συσκευή πλύσης μικροπλακών (συνιστάται αυτόματο πλυντήριο).
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών με φίλτρο 450nm και φίλτρο αναφοράς 620 - 650nm.

## **Οδηγίες Φύλαξης**

### *Φιαλίδια Συλλογής Αίματος*

- Φυλάσσετε τα φιαλίδια συλλογής αίματος στους 4 - 25°C.

### *Αντιδραστήρια του Κιτ*

- Φυλάσσετε το κιτ στους 2° - 8°C.
- Πάντα να προφυλάσσετε το Διάλυμα Ενζυμικού Υποστρώματος από την άμεση έκθεση στον ήλιο.

### *Ανασυσταμένα και Αχρησιμοποίητα Αντιδραστήρια*

Για οδηγίες ανασύστασης των αντιδραστηρίων, παρακαλούμε βλέπε την Ενότητα 6 (σελ. 9).

- Ο ανασυσταμένος Βαθμονομητής Κιτ διατηρείται μέχρι και 3 μήνες όταν φυλάσσεται στους 2 - 8°C.
  - Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του Βαθμονομητή Κιτ.
- Εφόσον ανασυσταθεί, το αχρησιμοποίητο Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X πρέπει να φυλαχτεί στους 2 - 8°C και επίσης να χρησιμοποιηθεί εντός 3 μηνών.
  - Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του Σύζευγματος.
- Το Σύζευγμα Εργασίας πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 6 ωρών από την παρασκευή του.
- Το Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης Εργασίας μπορεί να φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι και 2 εβδομάδες.

## 4. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

### Προειδοποιήσεις

- Ένα αρνητικό αποτέλεσμα εξέτασης QFT δεν αποκλείει την πιθανότητα μόλυνσης από *M. tuberculosis* ή φυματίωση: τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορούν να οφείλονται στο στάδιο μόλυνσης (π.χ. όταν το δείγμα λήφθηκε πριν αναπτυχθεί κυτταρική ανοσοαπόκριση), σε συννοσηρές παθήσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, στον λανθασμένο χειρισμό των φιαλιδίων συλλογής αίματος μετά τη φλεβοπαρακέντηση, στην εσφαλμένη εκτέλεση της ανάλυσης ή σε άλλες ανοσολογικές μεταβλητές.
- Ένα θετικό αποτέλεσμα εξέτασης QFT δεν πρέπει να αποτελέσει την αποκλειστική ή καθοριστική βάση εξακρίβωσης της μόλυνσης από *M. tuberculosis*. Η εσφαλμένη εκτέλεση της ανάλυσης μπορεί να δώσει ψευδώς θετικά αποτελέσματα.
- Ένα θετικό αποτέλεσμα εξέτασης QFT πρέπει να ακολουθείται από παραπέρα ιατρική αποτίμηση και διαγνωστική αποτίμηση για ενεργό φυματίωση (π.χ. δείγμα AFB, ακτινογραφία θώρακα).
- Ενώ οι πρωτεΐνες ESAT-6, CFP-10 και TB7.7(p4) απουσιάζουν από όλα τα στελέχη BCG και τα περισσότερα γνωστά μη-φυματικά μυκοβακτηρίδια, είναι δυνατόν ένα θετικό αποτέλεσμα QFT να οφείλεται σε μόλυνση από *M. kansasii*, *M. szulgai* ή *M. marinum*. Αν υποψιάζεσθε τέτοια μόλυνση, πρέπει να γίνουν εναλλακτικές εξετάσεις.

## Προφυλάξεις

- **Για διαγνωστική χρήση in vitro.**
- **Επιβλαβές: Το Διάλυμα Ενζυμικού Υποστρώματος** περιέχει 3,3',5,5' τετρα-μεθυλ-βενζιδίνη που είναι επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης, όταν εισπνέεται και σε επαφή με το δέρμα. Ερεθίζει τα μάτια και το δέρμα. Μεταλλαξιογόνο. Να φοράτε γυαλιά ασφαλείας και γάντια και να το χειρίζεστε σαν πιθανό καρκινογόνο.
- **Επιβλαβές: Το Ανασχετικό Διάλυμα Enzyme** περιέχει H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> που είναι επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης, όταν εισπνέεται και σε επαφή με τα μάτια και το δέρμα. Να φοράτε γυαλιά ασφαλείας, γάντια και κανονικό προστατευτικό ρουχισμό εργαστηρίου. Αν έρθει σε επαφή με το δέρμα ή τα μάτια, ξεπλύνετε με άφθονο νερό και ζητήστε ιατρική συμβουλή.
- **Επιβλαβές: Ο Βαθμονομητής IFN-γ και το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X** μπορούν να προκαλέσουν δυσφορία σε περίπτωση κατάποσης και να προκαλέσουν ερεθισμό στο δέρμα. Να φοράτε γυαλιά ασφαλείας και κανονικό προστατευτικό ρουχισμό εργαστηρίου.
- **Χειρίζεστε το ανθρώπινο αίμα σαν να είναι ενδεχομένως μολυσματικό.** Ακολουθήστε τις σχετικές κατευθυντήριες οδηγίες για τον χειρισμό του αίματος.
- **Η θιμεροσάλη** χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε ορισμένα αντιδραστήρια. Μπορεί να είναι τοξική σε περίπτωση κατάποσης, όταν εισπνέεται και σε επαφή με το δέρμα.
- **Το Πράσινο Αραιωτικό** περιέχει κανονικό ορό ποντικού και καζεΐνη, που μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις. Αποφύγετε την επαφή με το δέρμα.
- Η μη συμμόρφωση με τις οδηγίες του Ενθέτου Προϊόντος μπορεί να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα. Παρακαλούμε διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες πριν από τη χρήση.
- Μην χρησιμοποιήσετε το κιτ αν οποιαδήποτε φιάλη αντιδραστηρίων φέρει ίχνη βλάβης ή διαρροής πριν από τη χρήση.
- Μην αναμειγνύετε και μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια ELISA προερχόμενα από διαφορετικές παρτίδες κιτ QFT .
- Η απόρριψη αχρησιμοποίητων αντιδραστηρίων και βιολογικών δειγμάτων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους τοπικούς, πολιτειακούς και εθνικούς κανονισμούς.
- Μην χρησιμοποιήσετε τα φιαλίδια συλλογής αίματος ή το κιτ ELISA μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Βεβαιωθείτε ότι ο εργαστηριακός εξοπλισμός όπως είναι οι συσκευές πλύσης και ανάγνωσης μικροπλακών έχουν βαθμονομηθεί / επικυρωθεί για χρήση.

## 5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

### Συλλογή αίματος

Το QFT χρησιμοποιεί τα παρακάτω φιαλίδια συλλογής:

1. Μηδενικός Έλεγχος (γκρίζο καπάκι) (για υψόμετρα έως 810 μέτρα)
2. Αντιγόνο Φυματίωσης (Κόκκινο καπάκι) (για υψόμετρα έως 810 μέτρα)
3. Έλεγχος Μιτογόνου - προαιρετικό (μοβ καπάκι) (για υψόμετρα έως 810 μέτρα)
4. Μηδενικός Έλεγχος (γκρίζο καπάκι με κίτρινο δακτυλίδι) (για υψόμετρα μεταξύ 1020 και 1.875 μέτρων)
5. Αντιγόνο Φυματίωσης (κόκκινο καπάκι με κίτρινο δακτυλίδι) (για υψόμετρα μεταξύ 1020 και 1.875 μέτρων)
6. Έλεγχος Μιτογόνου - προαιρετικό (μοβ καπάκι με κίτρινο δακτυλίδι) (για υψόμετρα μεταξύ 1020 και 1.875 μέτρων)

Τα αντιγόνα δημιουργούν επίστρωση στα εσωτερικά τοιχώματα των φιαλιδίων συλλογής αίματος, συνεπώς το περιεχόμενο των φιαλιδίων πρέπει απαραίτητα να αναμιχθεί καλά με το αίμα. Τα φιαλίδια πρέπει να τοποθετηθούν σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C το συντομότερο δυνατόν, το αργότερο εντός 16 ωρών από τη συλλογή.

Η παρακάτω διαδικασία θα δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα:

1. Για κάθε άτομο συλλέξτε 1mL αίμα με φλεβοπαρακέντηση κατευθείαν σε καθένα από τα φιαλίδια συλλογής αίματος QFT . Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να διεξάγεται από έμπειρο φλεβοτόμο.

- Για υψόμετρα έως 810 μέτρα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα QFT Standard φιαλίδια συλλογής αίματος. Σε υψόμετρα άνω των 1020 μέτρων πρέπει να χρησιμοποιούνται τα ειδικά για μεγάλα υψόμετρα QFT φιαλίδια συλλογής αίματος

Στη περίπτωση που χρησιμοποιούνται QFT φιαλίδια συλλογής αίματος εκτός των ως άνω ορίων υψόμετρου ή όταν η λήψη αίματος αποφέρει μικρή ποσότητα αίματος, το αίμα μπορεί να συλλεχθεί διά της χρησιμοποίησης μίας σύριγγας και να μεταφερθεί από 1mL στο καθένα από τα τρία φιαλίδια. Για λόγους ασφαλείας ο καλλίτερος τρόπος για να γίνει αυτό είναι να βγει η βελόνα της σύριγγας, εξασφαλίζοντας έτσι τις κατάλληλες διαδικασίες ασφαλείας, να αφαιρεθούν τα καπάκια από τα τρία φιαλίδια QFT και να προστεθεί από 1mL σε κάθε φιαλίδιο (μέχρι το μαύρο σημείο στην πλευρά της ετικέτας του φιαλιδίου). Τοποθετήστε ξανά τα καπάκια και κλείστε τα ασφαλώς και ανακατέψτε το περιεχόμενο των φιαλιδίων, όπως περιγράφεται παρακάτω.

- Επειδή τα φιαλίδια 1mL λαμβάνουν το αίμα σχετικά αργά, παρακαλείσθε να κρατήσετε το φιαλίδιο στη βελόνα για 2-3 δευτερόλεπτα παραπάνω από όταν θα φαίνεται πως έχει γεμίσει, για να εξασφαλίσετε τη λήψη του σωστού όγκου.

*Το μαύρο σημείο στην πλευρά του φιαλιδίου δείχνει τον όγκο πληρότητας 1mL. Τα φιαλίδια συλλογής αίματος QFT έχουν ελεγχθεί για όγκους από 0,8 - 1,2mL. Αν το επίπεδο του αίματος σε οποιοδήποτε φιαλίδιο δεν προσεγγίζει τη γραμμή πληρότητας, συνιστάται η λήψη άλλου δείγματος αίματος.*

- Αν η αιμοληψία γίνεται μέσω βελόνας-πεταλούδας, πρέπει να χρησιμοποιηθεί άδειο φιαλίδιο για να σιγουρευτείτε ότι ο σωλήνας είναι γεμάτος αίμα, πριν τοποθετηθούν επάνω της τα φιαλίδια QFT .

2. Αμέσως μόλις γεμίσουν τα φιαλίδια, **ανακινήστε τα** δέκα (10) φορές μόνο τόσο σταθερά όσο χρειάζεται για να σιγουρευτείτε, ότι **ολόκληρη η εσωτερική επιφάνεια του φιαλιδίου** έχει επικαλυφθεί με αίμα, ώστε να διαλυτοποιηθούν αντιγόνα στα τοιχώματα των φιαλιδίων.
  - Κατά την πλήρωση των φιαλιδίων με αίμα, η θερμοκρασία τους θα πρέπει να είναι στους 17-25° C.
  - Η πολύ έντονη ανακίνηση μπορεί να προξενήσει διάσπαση στην γέλη και θα μπορούσε να επιφέρει παρεκκλίνοντα αποτελέσματα.
3. Τοποθετήσετε ετικέτες στα φιαλίδια.
4. Τα φιαλίδια πρέπει να μεταφερθούν σε κλίβανο με θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  το συντομότερο δυνατόν, το αργότερο εντός 16 ωρών από τη συλλογή. Πριν από την επώαση διατηρείστε τα φιαλίδια σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Μην φυλάξετε τα δείγματα αίματος σε ψυγείο ή κατάψυξη!

## 6. ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

### Πρώτο Στάδιο - Επώαση αίματος και λήψη πλάσματος

#### Παρεχόμενα Υλικά

Φιαλίδια συλλογής αίματος QFT (Βλέπε Ενότητα 3).

#### Υλικά που απαιτούνται (αλλά δεν παρέχονται)

Βλέπε Ενότητα 3.

#### Διαδικασία

1. Αν το αίμα δεν επωαστεί αμέσως μετά τη λήψη του, η εκ νέου ανάμειξη των φιαλιδίων πρέπει να πραγματοποιηθεί αμέσως πριν από την επώαση αναστρέφοντάς τα 10 φορές.
2. Τα φιαλίδια επωάζονται **ΟΡΘΙΑ** στους 37°C για 16 - 24 ώρες. Ο κλίβανος δεν χρειάζεται CO<sub>2</sub> ή να είναι υγρός.
3. Μετά την επώαση στους 37°C, τα φιαλίδια συλλογής αίματος μπορούν να διατηρηθούν στους 4 - 27°C μέχρι και 3 ημέρες πριν τη φυγοκέντρησή τους.
4. Μετά την επώαση των φιαλιδίων στους 37°C, η λήψη του πλάσματος διευκολύνεται με τη φυγοκέντρωση των φιαλιδίων για 15 λεπτά σε 2000 - 3000 RCF (g). Το βύσμα γέλης διαχωρίζει τα κύτταρα από το πλάσμα. Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να επαναληφθεί η φυγοκέντρωση σε υψηλότερη ταχύτητα.
  - Είναι δυνατόν να γίνει λήψη του πλάσματος χωρίς φυγοκέντρωση, αλλά απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αφαιρεθεί το πλάσμα χωρίς να στροβιλισθούν τα κύτταρα.
5. Παρακαλείστε να αποφεύγετε οπωσδήποτε μετά την φυγοκέντρωση και πριν από την λήψη του πλάσματος να χρησιμοποιείτε πιπέτα στα δείγματα ή να αναμιγνύετε το πλάσμα. Χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή για να μην στροβιλίζεται το υλικό στην επιφάνεια της γέλης.
  - Παρακαλείστε να χρησιμοποιείτε πάντοτε πιπέτα για την λήψη του δείγματος πλάσματος!
  - Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να μεταφερθούν κατευθείαν από τα φυγοκεντρισμένα φιαλίδια συλλογής αίματος στην πλάκα QFT ELISA· αυτό ισχύει και όταν χρησιμοποιούνται αυτόματοι σταθμοί εργασίας ELISA.
  - Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να αποθηκευτούν έως και 28 ημέρες στους 2 - 8°C· μετά την λήψη του πλάσματος και για μεγαλύτερο διάστημα στους -20°C.

## Δεύτερο Στάδιο - Ανάλυση ELISA Ανθρώπινης IFN-γ

### Παρεχόμενα Υλικά

Κιτ QFT ELISA (Βλέπε Ενότητα 3).

### Υλικά που απαιτούνται (αλλά δεν παρέχονται)

Βλέπε Ενότητα 3.

### Διαδικασία

1. Φέρετε όλα τα δείγματα πλάσματος και τα αντιδραστήρια, εκτός από το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X, σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) πριν από τη χρήση. Αφήσετε τα να ισορροπήσουν με τη θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 60 λεπτά.
2. Αφαιρέστε τις μη απαιτούμενες ταινίες από το πλαίσιο στήριξης, ξανασφραγίστε τις στη σακούλα και φυλάξτε τις στο ψυγείο μέχρι να χρειαστούν.

Επιλέξτε τουλάχιστον μια ταινία για τους Βαθμονομητές QFT και επαρκείς ταινίες για τον αριθμό ατόμων που εξετάζονται (βλ. Εικόνες 2A & 2B για εξετάσεις με δύο και τρία φιαλίδια αντίστοιχα). Μετά από τη χρήση κρατήστε το πλαίσιο στήριξης και το καπάκι για να τα χρησιμοποιήσετε με τις υπόλοιπες ταινίες.

3. Ανασυστήσετε τον λυοφιλοποιημένο Βαθμονομητή Κιτ με τον όγκο απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού που εμφανίζεται στην ετικέτα της φιάλης Βαθμονομητή. Αναδεύσετε απαλά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού και να επιτευχθεί πλήρης διαλυτότητα. Η ανασύσταση του Βαθμονομητή στον καθορισμένο όγκο θα παράγει διάλυμα συγκέντρωσης 8,0 IU/mL.

**Σημείωση: Ο όγκος ανασύστασης του Βαθμονομητή Κιτ διαφέρει ανάλογα με το βάρος!**

Χρησιμοποιήστε τον ανασυσταμένο Βαθμονομητή Κιτ για την παραγωγή μια σειράς διαλύματος IFN-γ σε Πράσινο Αραιωτικό (ΠΑ)σε αναλογία 1 προς 4 – βλ. Εικόνα 1. Το S1 (Βαθμονομητής 1) περιέχει 4 IU/mL, το S2 (Βαθμονομητής 2) περιέχει 1 IU/mL, το S3 (Βαθμονομητής 3) περιέχει 0,25 IU/mL, και το S4 (Βαθμονομητής 4) περιέχει 0 IU/mL (μόνο ΠΑ). Οι βαθμονομητές πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον εις διπλούν.

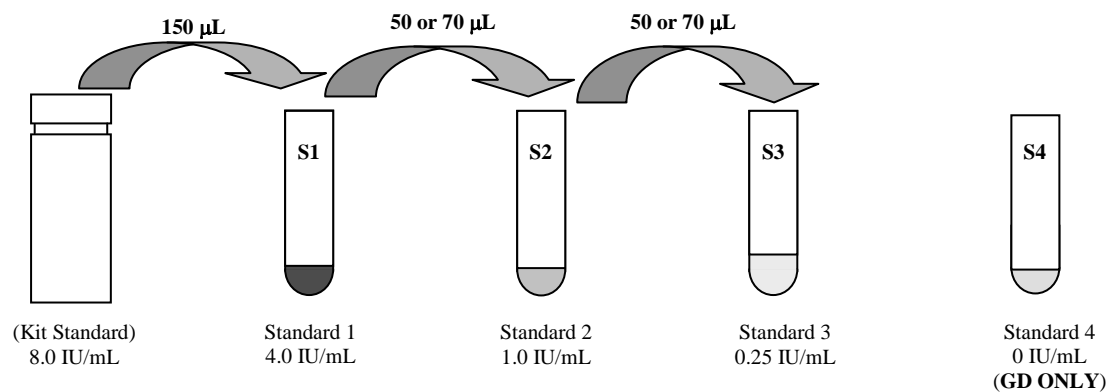
#### ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ΕΙΣ ΔΙΠΛΟΥΝ

- a. Προσδιορίσετε 4 φιαλίδια με ετικέτες "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Προσθέσετε **150μL** ΠΑ στα S1, S2, S3, S4.
- c. Προσθέσετε **150μL** Βαθμονομητή Κιτ στο S1 και αναμείξτε καλά.
- d. Μεταφέρετε **50μL** από το S1 στο S2 και αναμείξτε καλά.
- e. Μεταφέρετε **50μL** από το S2 στο S3 και αναμείξτε καλά.
- f. Το ΠΑ από μόνο του αποτελεί τον μηδενικό βαθμονομητή (S4).

#### ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ΕΙΣ ΤΡΙΠΛΟΥΝ

- a. Προσδιορίσετε 4 φιαλίδια με ετικέτες "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Προσθέσετε **150μL** ΠΑ στο S1.
- c. Προσθέσετε **210μL** ΠΑ στα S2, S3, S4.
- d. Προσθέσετε **150μL** Βαθμονομητή Κιτ στο S1 και αναμείξτε καλά
- e. Μεταφέρετε **70μL** από το S1 στο S2 και αναμείξτε καλά.
- f. Μεταφέρετε **70μL** από το S2 στο S3 και αναμείξτε καλά.
- g. Το ΠΑ από μόνο του αποτελεί τον μηδενικό βαθμονομητή (S4).

### ΕΙΚΟΝΑ 1. Προετοιμασία Καμπύλης Βαθμονόμησης



- Παρασκευάστε φρέσκα διαλύματα του Βαθμονομητή Κιτ για κάθε ανάλυση ELISA.
4. Ανασυστήσετε το λυοφιλοποιημένο Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X με 0,3mL απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Αναδεύσετε απαλά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού και να επιτευχθεί η πλήρης διαλυτότητα του Συζεύγματος.

Το σύζευγμα εργασίας παρασκευάζεται με τη διάλυση του απαιτούμενου ποσού λυοφιλοποιημένου Συμπυκνωμένου Συζεύγματος 100X σε Πράσινο Αραιωτικό όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1 - Παρασκευή Συζεύγματος.

### ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Παρασκευή Συζεύγματος

ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΑΙΝΙΩΝ	ΟΓΚΟΣ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ 100X	ΟΓΚΟΣ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΑΡΑΙΩΤΙΚΟΥ
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

- Αναδεύσετε καλά αλλά απαλά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού.
  - Φυλάξτε το εναπομείνον Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X στους 2 - 8°C αμέσως μετά τη χρήση.
  - Χρησιμοποιείτε μόνο Πράσινο Αραιωτικό.
5. Για τα δείγματα πλάσματος που συλλέγονται από τα φιαλίδια συλλογής αίματος και στη συνέχεια, καταψύχονται ή αποθηκεύονται για περισσότερες από 24 ώρες πριν από την ανάλυση, η ανάμειξη να γίνεται ενδεδειγμένα πριν από την τοποθέτησή τους στην θέση ELISA.

Εάν τα δείγματα πλάσματος πρέπει να τοποθετηθούν απευθείας από τα φυγοκεντρισμένα φιαλίδια QFT, θα πρέπει να αποφεύγεται η οποιαδήποτε ανάμειξη του πλάσματος

6. Πριν από την ανάλυση, τα πλάσματα πρέπει να αναμειχθούν για να εξασφαλιστεί η ίση κατανομή της IFN-γ σε ολόκληρο το δείγμα.

7. Διανείμετε 50μL φρέσκου παρασκευασμένου συζεύγματος εργασίας στις απαιτούμενες θέσεις ELISA με πολυκάναλη πιπέτα.
8. Διανείμετε 50μL δειγμάτων πλάσματος προς εξέταση στις κατάλληλες θέσεις με πολυκάναλη πιπέτα (Βλ. προτεινόμενη διάταξη πλάκας παρακάτω - Εικόνες 2A & 2B). Τέλος, προσθέστε 50μL από τον κάθε Βαθμονομητή 1 έως 4.

**ΕΙΚΟΝΑ 2Α. Προτεινόμενη Διάταξη Δειγμάτων για τα Φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου και Αντιγόνου Φυματίωσης (44 εξετάσεις ανά πλάκα )**

	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 (Βαθμονομητής 1), S2 (Βαθμονομητής 2), S3 (Βαθμονομητής 3), S4 (Βαθμονομητής 4).
- 1N (Δείγμα 1. Πλάσμα Μηδενικού Ελέγχου), 1A (Δείγμα 1. Πλάσμα Αντιγόνου Φυματίωσης).

**ΕΙΚΟΝΑ 2B. Προτεινόμενη Διάταξη Δειγμάτων για τα Φιαλίδια Μηδενικού Ελέγχου, Αντιγόνου Φυματίωσης και Μιτογόνου (28 εξετάσεις ανά πλάκα)**

	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 (Βαθμονομητής 1), S2 (Βαθμονομητής 2), S3 (Βαθμονομητής 3), S4 (Βαθμονομητής 4).
- 1N (Δείγμα 1. Πλάσμα Μηδενικού Ελέγχου), 1A (Δείγμα 1. Πλάσμα Αντιγόνου Φυματίωσης), 1M (Δείγμα 1. Πλάσμα Ελέγχου Μιτογόνου).

9. Αναδεύσετε το σύζευγμα και τα δείγματα πλάσματος/βαθμονομητές καλά σε συσκευή ανάδευσης μικροπλακών για 1 λεπτό.
10. Σκεπάστε κάθε πλάκα με καπάκι και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) για  $120 \pm 5$  λεπτά.
  - Αποφύγετε την άμεση έκθεση των πλακών στον ήλιο κατά την επώαση.
11. Κατά τη διάρκεια της επώασης, αραιώστε το Συμπυκνωμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 20X σε αποιονισμένο ή απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1 προς 19 και αναδεύσετε καλά. Υπάρχει αρκετό Συμπυκνωμένο Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 20X για την παραγωγή 2L ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης εργασίας.

Πλύνετε τις θέσεις με **400μL** ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης εργασίας για τουλάχιστον 6 κύκλους. Συνιστάται η χρήση αυτόματου πλυντηρίου πλακών.

- Η προσεκτική έκπλυση είναι πολύ σημαντική για την απόδοση της ανάλυσης. Σιγουρευτείτε ότι κάθε θέση είναι **γεμισμένη μέχρι πάνω** με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης σε κάθε κύκλο. Συνιστάται μια περίοδος διαποτισμού 5 δευτερολέπτων ανάμεσα σε κάθε κύκλο.
  - Προσθέστε κανονικό εργαστηριακό απολυμαντικό στη δεξαμενή εκροής και ακολουθήστε τις καθιερωμένες διαδικασίες απολύμανσης δυνητικά μολυσματικού υλικού.
11. Αδειάστε τις πλάκες και κτυπήστε τις ανάποδα πάνω σε απορροφητικό χαρτί για να απομακρυνθεί το υπολειμματικό ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Προσθέστε 100μL Διαλύματος Ενζυμικού Υποστρώματος σε κάθε θέση και αναδεύσετε καλά σε συσκευή ανάδευσης μικροπλακών.
  12. Σκεπάστε κάθε πλάκα με καπάκι και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) για 30 λεπτά.
    - Αποφύγετε την άμεση έκθεση των πλακών στον ήλιο κατά την επώαση.
  13. Μετά από την 30λεπτη επώαση, προσθέστε 50μL of Ανασχετικού Διαλύματος σε κάθε θέση και αναμειξτε.
    - Το Ανασχετικό Διάλυμα πρέπει να προστεθεί στις θέσεις με την ίδια σειρά και σε περίπου τα ίδια χρονικά διαστήματα με το υπόστρωμα στο βήμα 11.
  14. Μετρήστε την Οπτική Πυκνότητα (ΟΠ) κάθε θέσης εντός 5 λεπτών από την ανάσχεση της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών με φίλτρο 450nm και φίλτρο αναφοράς 620nm - 650nm. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται με τις τιμές ΟΠ.

## 7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Το Λογισμικό Ανάλυσης QFT για την ανάλυση ακατέργαστων δεδομένων και τον υπολογισμό αποτελεσμάτων διατίθεται από τη Cellestis. (ελέγξτε εάν χρησιμοποιείται η πιο πρόσφατη έκδοση του λογισμικού).

Το λογισμικό κάνει μια αποτίμηση του Ποιοτικού Ελέγχου της ανάλυσης, παράγει καμπύλη βαθμονόμησης και δίνει αποτέλεσμα εξέτασης για κάθε άτομο, όπως περιγράφεται λεπτομερώς στην ενότητα Ερμηνείας Αποτελεσμάτων.

Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιήσετε το Λογισμικό Ανάλυσης QFT , τα αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν με την παρακάτω μέθοδο:

### **Προετοιμασία Καμπύλης Βαθμονόμησης**

*(σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιηθεί το Λογισμικό Ανάλυσης QFT )*

Υπολογίστε τις μέσες τιμές ΟΠ των επαναλήψεων Βαθμονομητή Kit σε κάθε πλάκα.

Κατασκευάστε μια λογαριθμική βαθμονομική καμπύλη  $\log_{(e)}-\log_{(e)}$  με γραφική παράσταση των βαθμονομικών τιμών  $\log_{(e)}$  της μέσης ΟΠ (άξονας y) έναντι των τιμών  $\log_{(e)}$  της συγκέντρωσης IFN- $\gamma$  στους βαθμονομητές σε IU/mL (άξονας x), χωρίς να υπολογίσετε τον μηδενικό βαθμονομητή. Υπολογίστε την καλύτερη γραμμή της καμπύλης βαθμονόμησης μέσω παλινδρομικής ανάλυσης.

Χρησιμοποιήστε την καμπύλη βαθμονόμησης για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση IFN- $\gamma$  (IU/mL) σε κάθε δείγμα πλάσματος προς εξέταση, με την τιμή ΟΠ κάθε δείγματος.

Οι υπολογισμοί αυτοί μπορούν να γίνουν με τα λογισμικά πακέτα που διατίθενται με συσκευές ανάγνωσης μικροπλακών, και με κανονικά προγράμματα λογιστικών φύλλων ή στατιστικής (π.χ. Microsoft Excel). Συνιστάται η χρήση αυτών των πακέτων για τον υπολογισμό της ανάλυσης παλινδρόμησης και του συντελεστή διακύμανσης (%CV) των βαθμονομητών, και του συντελεστή συσχέτισης (r) της καμπύλης βαθμονόμησης.

## Ποιοτικός Έλεγχος της Εξέτασης

Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων της εξέτασης εξαρτάται από την προετοιμασία ακριβούς καμπύλης βαθμονόμησης. Συνεπώς τα αποτελέσματα των βαθμονομητών πρέπει να εξεταστούν πριν από την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δειγμάτων.

Για να είναι έγκυρη η ανάλυση ELISA:

- **Η μέση τιμή ΟΠ του Βαθμονομητή 1 πρέπει να είναι  $\geq 0,600$ .**
- **Το ποσοστό CV σε % επί των τιμών αντιγράφων ΟΠ των Βαθμονομητών 1 και 2 πρέπει να είναι  $\leq 15\%$ .**
- **Οι τιμές αντιγράφων ΟΠ των Βαθμονομητών 3 και 4 δεν πρέπει να παρουσιάσουν απόκλιση πέραν των 0,040 μονάδων οπτικής πυκνότητας από τον μέσο όρο τους.**
- **Ο συντελεστής συσχέτισης (r) που υπολογίζεται από τις μέσες τιμές απορρόφησης των Βαθμονομητών πρέπει να είναι  $\geq 0,98$ .**

Το Λογισμικό Ανάλυσης QFT υπολογίζει και αναφέρει αυτές τις παραμέτρους ποιοτικού ελέγχου.

Αν δεν ισχύουν τα παραπάνω κριτήρια, η ανάλυση είναι άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.

- **Η μέση τιμή ΟΠ του Μηδενικού Βαθμονομητή (Πράσινο Αραιωτικό) πρέπει να είναι  $\leq 0,150$ . Αν η μέση τιμή ΟΠ είναι  $> 0,150$ , πρέπει να εξεταστεί η διαδικασία έκπλυσης πλακών.**

## Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα QFT ερμηνεύονται ακολουθώντας τα παρακάτω κριτήρια:

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Η διάγνωση ή ο αποκλεισμός της φυματίωσης και η αποτίμηση της πιθανότητας λανθάνουσας φυματίωσης, απαιτεί έναν συνδυασμό επιδημιολογικών, ιστορικών, ιατρικών και διαγνωστικών διαπιστώσεων που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων QFT .

### ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΟ ΦΙΑΛΙΔΙΩΝ ΜΗΔΕΝΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

Μηδενικό [IU/mL]	Αντιγόνο Φυματίωσης μείον Μηδενικό [IU/mL]	Αποτελέσματα QFT	Αναφορά/Ερμηνεία
≤ 8,0	< 0,35	Αρνητικό	Μόλυνση <i>M. tuberculosis</i> ΑΠΙΘΑΝΗ
	≥ 0,35 και < 25% Μηδενικής τιμής		
	≥ 0,35 και ≥ 25% Μηδενικής τιμής	Θετικό <sup>1</sup>	Μόλυνση <i>M. tuberculosis</i> πιθανή
> 8,0 <sup>2</sup>	Οτιδήποτε	Διφορούμενο <sup>3</sup>	Διφορούμενα αποτελέσματα για αποκρισιμότητα Αντιγόνου Φυματίωσης

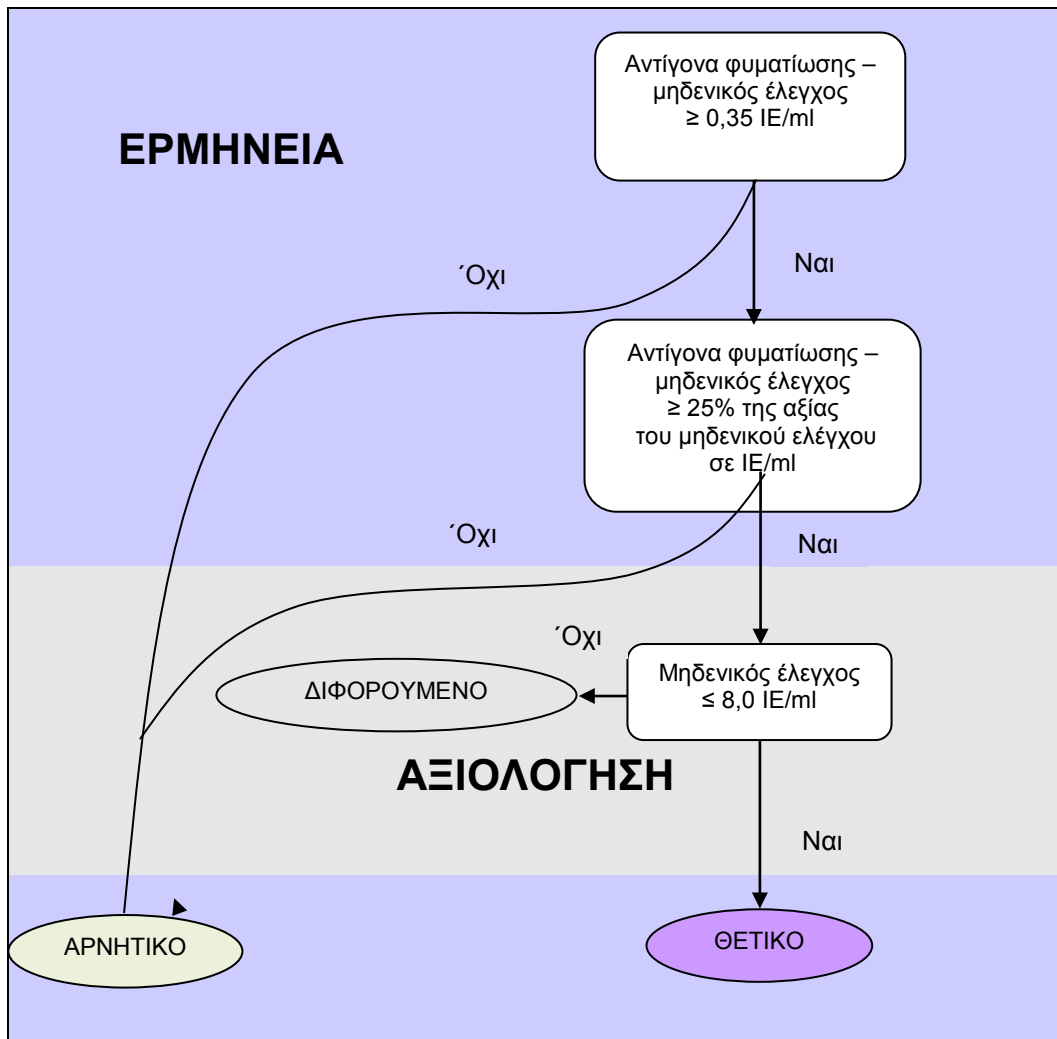
<sup>1</sup> Όπου δεν υπάρχει υποψία μόλυνσης από *M. tuberculosis*, τα αρχικά θετικά αποτελέσματα μπορούν να επαληθευθούν με την επανεξέταση εις διπλούν των αρχικών δειγμάτων πλάσματος με την ανάλυση ELISA QFT. Αν η επανεξέταση ενός ή και των δύο αντιγράφων είναι θετική, το άτομο πρέπει να θεωρηθεί θετικό για την εξέταση.

<sup>2</sup> Στις κλινικές μελέτες λιγότεροι από 0,25% των εξεταζόμενων είχαν επίπεδα IFN-γ > 8,0 IU/mL στον Μηδενικό Έλεγχο.

<sup>3</sup> Βλέπε την ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων για πιθανές αιτίες.

Το ύψος του μετρούμενου επιπέδου IFN-γ δεν μπορεί να συσχετισθεί με το στάδιο ή τον βαθμό της μόλυνσης, την έκταση της ανοσοποιητικής αντιδραστικότητας ή την πιθανότητα ανάπτυξης της ενεργού νόσου.

**ΕΙΚΟΝΑ 3. ΕΡΜΗΝΕΥΤΙΚΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΡΟΗΣ (ΣΕ ΧΡΗΣΗ ΦΙΑΛΙΔΙΩΝ ΜΗΔΕΝΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ)**



**ΧΡΗΣΗ ΦΙΑΛΙΔΙΩΝ ΜΗΔΕΝΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ, ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ & ΜΙΤΟΓΟΝΟΥ**

Μηδενικό [IU/mL]	Αντιγόνο Φυματίωσης μείον Μηδενικό [IU/mL]	Μιτογόνο μείον Μηδενικό [IU/mL] <sup>1</sup>	Αποτελέσματα QFT	Αναφορά/Ερμηνεία
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	<b>Αρνητικό</b>	Μόλυνση <i>M. tuberculosis</i> ΑΠΙΘΑΝΗ
	≥ 0,35 και < 25% Μηδενικής τιμής	≥ 0,5		
	≥ 0,35 και ≥ 25% Μηδενικής τιμής	Οτιδήποτε	<b>Θετικό<sup>2</sup></b>	Μόλυνση <i>M. tuberculosis</i> πιθανή
	< 0,35	< 0,5	<b>Διφορούμενο<sup>3</sup></b>	Διφορούμενα αποτελέσματα για αποκρισμότητα Αντιγόνου Φυματίωσης
≥ 0,35 και < 25% Μηδενικής τιμής	< 0,5			
> 8,0 <sup>4</sup>	Οτιδήποτε	Οτιδήποτε		

<sup>1</sup> Οι αποκρίσεις στον θετικό έλεγχο Μιτογόνου (και μερικές φορές και στο Αντιγόνο Φυματίωσης) είναι συχνά εκτός των ορίων της συσκευής ανάγνωσης μικροπλακών. Αυτό δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της εξέτασης.

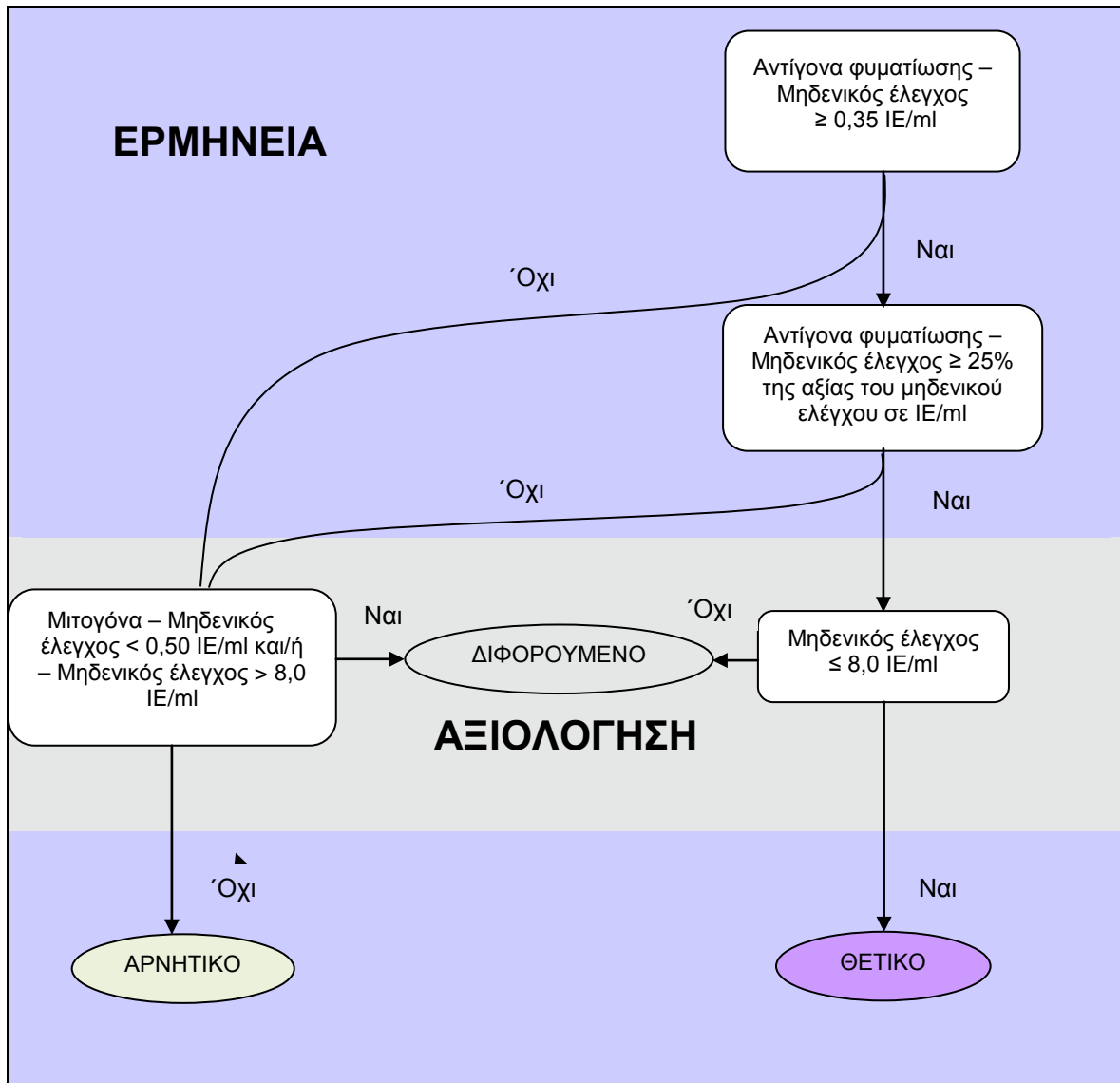
<sup>2</sup> Όπου δεν υπάρχει υποψία μόλυνσης από *M. tuberculosis*, τα αρχικά θετικά αποτελέσματα μπορούν να επαληθευθούν με την επανεξέταση εις διπλούν των αρχικών δειγμάτων πλάσματος με την ανάλυση ELISA QFT . Αν η επανεξέταση ενός ή και των δύο αντιγράφων είναι θετική, το άτομο πρέπει να θεωρηθεί θετικό για την εξέταση.

<sup>3</sup> Βλέπε την ενότητα Αντιμετώπισης Προβλημάτων για πιθανές αιτίες.

<sup>4</sup> Στις κλινικές μελέτες λιγότεροι από 0,25% των εξεταζόμενων είχαν επίπεδα IFN-γ > 8,0 IU/mL στον Μηδενικό Έλεγχο.

Το ύψος του μετρούμενου επιπέδου IFN-γ δεν μπορεί να συσχετισθεί με το στάδιο ή τον βαθμό της μόλυνσης, το επίπεδο ανοσοαντίδρασης ή την πιθανότητα ανάπτυξης της ενεργού νόσου.

**ΕΙΚΟΝΑ 4. Ερμηνευτικό Διάγραμμα Ροής ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΙΑΛΙΔΙΩΝ ΜΗΔΕΝΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ, ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ & ΜΙΤΟΓΟΝΟΥ**



## 8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Τα αποτελέσματα της εξέτασης QFT πρέπει να χρησιμοποιηθούν παράλληλα με το επιδημιολογικό ιστορικό και την τρέχουσα ιατρική κατάσταση του ατόμου, καθώς και άλλες διαγνωστικές αποτιμήσεις.

Άτομα με τιμές Μηδενικού Ελέγχου άνω των 8 IU/mL ταξινομούνται ως “διφορούμενοι” επειδή μια απόκριση 25% παραπάνω στα Αντιγόνα Φυματίωσης πιθανόν να είναι έξω από τα μετρήσιμα όρια της εξέτασης.

Τα αναξιόπιστα ή ασαφή αποτελέσματα μπορούν να οφείλονται σε:

- Αποκλίσεις από τη διαδικασία που περιγράφεται στο Έντυπο Προϊόντος,
- Υπερβολικά επίπεδα IFN- $\gamma$  στο κυκλοφοριακό ή παρουσία ετερόφιλων αντισωμάτων,
- Παρέλευση άνω των 16 ωρών από τη λήψη του δείγματος αίματος μέχρι την επώαση στους 37°C

## 9. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### Κλινικές Μελέτες

Καθώς δεν υπάρχει καθιερωμένη εξέταση για τη μόλυνση από λανθάνουσα φυματίωση, η ευαισθησία και η ειδικότητα του QFT δεν μπορούν να αποτιμηθούν πρακτικά. Η ευαισθησία του QFT καθορίστηκε κατά προσέγγιση με τη αποτίμηση των ψευδών θετικών αποτελεσμάτων σε άτομα χαμηλού κινδύνου (χωρίς γνωστούς παράγοντες κινδύνου) μόλυνσης από φυματίωση. Η ευαισθησία καθορίστηκε κατά προσέγγιση με τη αποτίμηση ομάδων ασθενών με ενεργό νόσο φυματίωσης επαληθευμένη μέσω καλλιέργειας.

#### **Ειδικότητα**

Σε μια μελέτη στις ΗΠΑ με 866 εθελοντές, το αίμα λήφθηκε για ανάλυση με QFT και παράλληλα έγινε ανίχνευση φυματικής μόλυνσης με φυματινοαντίδραση (TST). Οι δημογραφικές πληροφορίες και οι παράγοντες κινδύνου φυματίωσης καθορίστηκαν με μια καθιερωμένη επισκόπηση που ήταν έγκυρη όταν έγινε η εξέταση. Από 432 εθελοντές χωρίς γνωστούς παράγοντες κινδύνου μόλυνσης από *M. tuberculosis*, διατέθηκαν αποτελέσματα 391 αναλύσεων QFT και TST. Κανένας δεν είχε εμβολιαστεί με BCG. Μια δεύτερη μελέτη ειδικότητας έγινε με QFT σε άτομα χαμηλού κινδύνου στην Ιαπωνία, περίπου 90% εκ των οποίων είχαν εμβολιαστεί με BCG. Τα αποτελέσματα των δύο μελετών ειδικότητας παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

#### **Πίνακας 2. Ειδικότητα QFT : Αποτελέσματα από άτομα χωρίς αναφερόμενο κίνδυνο μόλυνσης από *M. tuberculosis*.**

\*Χρήση επάρματος 10mm TST σε άτομα που δεν είχαν εμβολιαστεί με BCG. Η εκτίμηση ειδικότητας TST είναι 99,1% με έπαρμα 15mm.

STUDY	BCG Status % Vaccinated	Total tested	No. QFT Indeterminate	No. QFTPositive / No. Valid Tests	QFT Specificity (95% CI)	No. TST Positive / No. tested	TST* Specificity (95% CI)
ΗΠΑ (αδημοσίευτο)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (98-100)	6 / 391	97-99 % (97-99)
Ιαπωνία <sup>15</sup>	~90%	168	6	2 / 162	98,8% (95-100)	-	-
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	-	<b>559</b>	<b>7/559 (1.3%)</b>	<b>5 / 552</b>	<b>99,1% (98-100)</b>	-	-

#### **Ευαισθησία στην ενεργό φυματίωση**

Άτομα ύποπτα για φυματίωση από τις ΗΠΑ, την Αυστραλία και την Ιαπωνία, που ακολούθως επαληθεύθηκε μέσω καλλιέργειας ότι παρουσίαζαν μόλυνση από *M. tuberculosis*, εξετάστηκαν για να αποτιμηθεί η ευαισθησία του QFT. Όσο δεν υπάρχει καθιερωμένη εξέταση για μόλυνση από λανθάνουσα φυματίωση, η μικροβιολογική καλλιέργεια *M. tuberculosis* αποτελεί κατάλληλο υποκατάστατο, εφόσον οι νοσούντες ασθενείς είναι μολυσμένοι εξ' ορισμού. Οι ασθενείς είχαν κάνει κάτω από 8 ημέρες θεραπείας πριν τη λήψη αίματος για εξέταση με QFT.

Ο Πίνακας 3 συνοψίζει τα αποτελέσματα των τριών ομάδων ασθενών με θετική καλλιέργεια *M. tuberculosis*. Η συνολική ευαισθησία του QFT προς την ενεργό φυματίωση ήταν 89% (157/177).

**Πίνακας 3. QFT : Άτομα με μόλυνση *M. tuberculosis* που επαληθεύθηκε με καλλιέργεια.**

STUDY	No. QFT Positive / No. Valid Tests	QFT Sensitivity (95% CI)
Ασθενείς με φυματίωση στην Ιαπωνία <sup>15</sup>	86 / 92	93% (86-97%)
Αυστραλία	24 / 27	89% (70-97%)
ΗΠΑ	47 / 58	81% (68-90%)
<b>ΣΥΝΟΛΟ</b>	<b>157 / 177</b>	<b>89% (83-93%)</b>

#### Διάγνωση Λανθάνουσας Φυματίωσης

Έχει δημοσιευθεί αριθμός μελετών πάνω στην απόδοση του QFT σε διάφορους πληθυσμούς εκτεθειμένους σε λανθάνουσα φυματίωση. Τα κύρια αποτελέσματα ορισμένων επιλεγμένων μελετών παρατίθενται στον Πίνακα 4.

**Table 4. Επιλεγμένες δημοσιευμένες μελέτες πάνω στο QFT σε πληθυσμούς εκτεθειμένους σε λανθάνουσα φυματίωση.**

ΜΕΛΕΤΗ	Σύνολο Εξετασθέντων	Αποτελέσματα και Διαπιστώσεις
HCW στην Ινδία (Pai <i>et al</i> 2005) <sup>26</sup>	726	Περιβάλλον πολύ υψηλών ποσοστών φυματίωσης, 40% θετικό QFT πβ. 41% θετικό TST στα 10mm. Υψηλή συμφωνία TST, καμία επίδραση BCG από τις δύο πλευρές. Και οι δύο εξετάσεις σχετίστηκαν με παράγοντες κινδύνου ηλικίας και περιόδου εργασίας στον τομέα υγείας.
HIV στη Δανία (Brock <i>et al</i> 2006) <sup>5</sup>	590	Η συνολική διάδοση λανθάνουσας φυματίωσης με QFT ήταν 4,6% (27/590) σε άτομα με HIV λοίμωξη. Τα θετικά αποτελέσματα συνδέονταν με κίνδυνο φυματίωσης. Δύο άτομα με θετικό QFT προχώρησαν σε ενεργό φυματίωση εντός ενός έτους. Τα διαφορούμενα αποτελέσματα συσχετιζόνταν σημαντικά με CD4 <100 / μL.
Νοσηλεύομενα Παιδιά (Dogra <i>et al</i> 2006) <sup>12</sup>	105	Παιδιά ύποπτα για φυματίωση ή με ιστορικό επαφής με τη νόσο εξετάστηκαν με QFT και TST. 10,5% θετικό QFT πβ. 9,5% θετικό TST στα 10mm. Η συμφωνία των εξετάσεων ήταν 95,2% συνολικά και 100% στα μη BCG εμβολιασμένα άτομα.
Γερμανικές Επαφές (Diel <i>et al</i> 2006) <sup>11</sup>	309	Εξετάστηκαν στενές επαφές 15 διαφορετικών περιπτώσεων δείκτη. Οι 51% είχαν εμβολιασθεί με BCG, 27% ήταν γεννημένοι στο εξωτερικό. 70% των BCG εμβολιασμένων και 18% των μη εμβολιασμένων ήταν TST θετικοί (5mm), ενώ 9% και 11% ήταν QFT θετικοί αντίστοιχα. Το QFT συνδεόταν με κίνδυνο φυματίωσης. Το TST συνδεόταν μόνο με BCG εμβολιασμό.

Υπάρχουν πολλές ακόμη δημοσιεύσεις που περιγράφουν την απόδοση της λιγότερο ευαίσθητης εκδοχής υγρού αντιγόνου QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold (ο πρόδρομος του QFT) και της εξέτασης QFT. Οι μελέτες αυτές συμπεριλαμβάνουν την εφαρμογή των εξετάσεων σε άτομα που είχαν έρθει σε επαφή με περιπτώσεις ενεργούς φυματίωσης,<sup>9, 11, 19, 25</sup> παιδιά<sup>6-10, 25, 28</sup>, άτομα με HIV λοίμωξη<sup>2, 5, 20</sup>, εργαζόμενους στον τομέα υγείας<sup>13, 26, 32</sup>, ανοσοκατασταλαμένα άτομα<sup>4, 22, 23, 27, 30, 31</sup>, καθώς και υπόπτους φυματίωσης<sup>7, 8, 10, 18</sup> και άτομα χαμηλού κινδύνου<sup>15</sup>.

#### Επαναληψιμότητα και επίδραση του TST σε μετέπειτα εξετάσεις QFT

Ως μέρος της μελέτης ειδικότητας στις ΗΠΑ, μια υποομάδα εθελοντών εξετάστηκε για δεύτερη φορά από 4 με 5 εβδομάδες μετά από την αρχική εξέταση QFT και TST. Τα αποτελέσματα QFT για 260 εθελοντές ήταν διαθέσιμα και στις δύο χρονικές στιγμές και το επίπεδο συμφωνίας ήταν 99,6% (259/260). Η προηγούμενη εξέταση TST δεν επέφερε θετικές αποκρίσεις QFT.

## 10. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

### Διφορούμενα Αποτελέσματα

Τα διφορούμενα αποτελέσματα είναι ασυνήθιστα και ίσως να οφείλονται στο ανοσοποιητικό σύστημα του εξεταζόμενου, αλλά ίσως να οφείλονται και σε αριθμό τεχνικών παραγόντων:

- Παρέλευση άνω των 16 ωρών από τη λήψη αίματος μέχρι την επώαση στους 37°C
- Φύλαξη αίματος εκτός των προτεινόμενων ορίων θερμοκρασίας (22°C ± 5°C)
- Ανεπαρκής ανάμειξη των φιαλιδίων συλλογής αίματος
- Ανεπαρκής έκπλυση της πλάκας ELISA

Αν υποψιάζεστε την ύπαρξη τεχνικών προβλημάτων κατά τη λήψη ή τον χειρισμό δειγμάτων αίματος, επαναλάβετε ολόκληρη την εξέταση QFT με νέο δείγμα. Αν υποψιάζεστε ότι έγινε ανεπαρκής έκπλυση ή άλλη απόκλιση από τη διαδικασία κατά την ανάλυση ELISA, επαναλάβετε την εξέταση του διεγερμένου πλάσματος. Διφορούμενα αποτελέσματα που οφείλονται σε χαμηλές τιμές Μιτογόνου ή υψηλές τιμές Μηδενικού Ελέγχου δεν αναμένεται να αλλάξουν κατά την επανάληψη, εκτός εάν υπήρξε σφάλμα κατά την ανάλυση ELISA. Τα διφορούμενα αποτελέσματα πρέπει να αναφέρονται. Ο ιατρός μπορεί να λάβει άλλο δείγμα ή να εκτελέσει άλλες διαδικασίες, όπως κρίνει κατάλληλο.

### Πηγμένα Δείγματα Πλάσματος

Αν εμφανιστούν πηγμένα ινικών πρωτεϊνών κατά την μακροπρόθεσμη φύλαξη δειγμάτων πλάσματος, πρέπει να φυγοκεντρίθουν τα δείγματα ώσπου να κατακαθίσει το ίζημα. Αυτό διευκολύνει την αναρρόφηση του πλάσματος με πιπέτα.

## Αντιμετώπιση Προβλημάτων ELISA

### Ακαθόριστη Ανάπτυξη Χρώματος

ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ	ΛΥΣΗ
Ανεπαρκής έκπλυση πλάκας.	Πλύνετε την πλάκα με 400μL/θέση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Ίσως να απαιτηθούν πάνω από 6 κύκλοι πλύσης ανάλογα με το διάλυμα πλύσης. Συνιστάται περίοδος διαποτισμού τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων ανάμεσα σε κάθε κύκλο.
Επιμόλυνση θέσεων ELISA.	Προσέξτε όταν χρησιμοποιείτε πιπέτα και κατά την ανάμειξη του δείγματος για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης.
Ληγμένο Kit / Συστατικά.	Σιγουρευτείτε ότι δεν έχει περάσει η ημερομηνία λήξης του kit. Χρησιμοποιείστε τον ανασκευασμένο Βαθμονομητή και το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X εντός 3 μηνών από την ημερομηνία κατασκευής.
Μόλυνση Διαλύματος Ενζυμικού Υποστρώματος.	Απορρίψτε το υπόστρωμα αν δείτε μπλε χρωματισμό. Χρησιμοποιείτε καθαρές δεξαμενές αντιδραστηρίων.
Ανάμειξη του πλάσματος σε φιαλίδια φυγοκέντρησης πριν από την συλλογή.	Βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα πλάσματος συλλέγονται προσεκτικά από πάνω από την γέλη <b>χωρίς πιπέτα πάνω και κάτω και φροντίζοντας να μην στροβιλίζεται</b> το υλικό στην επιφάνεια της γέλης.

### Χαμηλές Ενδείξεις Οπτικής Πυκνότητας στους Βαθμονομητές

ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ	ΛΥΣΗ
Σφάλμα διάλυσης βαθμονομητή.	Εξασφαλίστε τη σωστή παρασκευή διαλυμάτων Βαθμονομητή Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του Ενθέτου Προϊόντος.
Σφάλμα χρήσης πιπέτας.	Σιγουρευτείτε ότι οι πιπέτες είναι βαθμονομημένες και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
Υπερβολικά χαμηλή θερμοκρασία επώασης.	Η ELISA επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, στους 17- 27°C.
Υπερβολικά σύντομος χρόνος επώασης.	Η πλάκα με το σύζευγμα, τους βαθμονομητές και τα δείγματα πρέπει να επωαστεί για 120 ± 5 λεπτά. Το Διάλυμα Ενζυμικού Υποστρώματος επωάζεται στην πλάκα για 30 λεπτά.
Χρήση λάθους φίλτρου συσκευής ανάγνωσης πλακών.	Η πλάκα πρέπει να διαβάζεται στα 450nm με φίλτρο αναφοράς 620 – 650nm.
Υπερβολικά κρύα αντιδραστήρια.	Όλα τα αντιδραστήρια, με εξαίρεση το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X, πρέπει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν την έναρξη της ανάλυσης. Αυτό χρειάζεται περίπου μία ώρα.
Ληγμένο Kit / Συστατικά.	Βεβαιωθείτε ότι δεν έχει περάσει η ημερομηνία λήξης του kit. Χρησιμοποιείστε τον ανασκευασμένο Βαθμονομητή και το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X εντός 3 μηνών από την ημερομηνία κατασκευής.

Υψηλό Υπόβαθρο

<b>ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ</b>	<b>ΛΥΣΗ</b>
Ανεπαρκής έκπλυση πλάκας.	Πλύνετε την πλάκα με 400μL/θέση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Ίσως να απαιτηθούν πάνω από 6 κύκλοι πλύσης ανάλογα με το διάλυμα πλύσης. Συνιστάται περίοδος διαποτισμού τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων ανάμεσα σε κάθε κύκλο.
Υπερβολικά υψηλή θερμοκρασία επώασης.	Η ELISA επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, στους 17- 27°C.
Ληγμένο Kit / Συστατικά.	Βεβαιωθείτε ότι δεν έχει περάσει η ημερομηνία λήξης του kit. Χρησιμοποιείστε τον ανασκευασμένο Βαθμονομητή και το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X εντός 3 μηνών από την ημερομηνία κατασκευής.
Μόλυνση Διαλύματος Ενζυμικού Υποστρώματος.	Απορρίψτε το υπόστρωμα αν δείτε μπλε χρωματισμό. Χρησιμοποιείτε καθαρές δεξαμενές αντιδραστηρίων.

Μη Γραμμική Καμπύλη Βαθμονομητή και Διακύμανση Επαναλήψεων

<b>ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ</b>	<b>ΛΥΣΗ</b>
Ανεπαρκής έκπλυση πλάκας.	Πλύνετε την πλάκα με 400μL/θέση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Ίσως να απαιτηθούν πάνω από 6 κύκλοι πλύσης ανάλογα με το διάλυμα πλύσης. Συνιστάται περίοδος διαποτισμού τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων ανάμεσα σε κάθε κύκλο.
Σφάλμα διάλυσης βαθμονομητή.	Εξασφαλίστε τη σωστή παρασκευή διαλυμάτων Βαθμονομητή σύμφωνα με τις οδηγίες του Ενθέτου Προϊόντος.
Ανεπαρκής ανάμειξη.	Αναδεύσετε καλά τα αντιδραστήρια γυρίζοντάς τα ή με απαλό στροβιλισμό πριν την τοποθέτησή τους στην πλάκα.
Ασυνεπής τεχνική χρήσης πιπέτας ή διακοπή κατά την εγκατάσταση της ανάλυσης.	Η πρόσθεση δειγμάτων και βαθμονομητών πρέπει να γίνει με αδιάκοπο ρυθμό. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να προετοιμαστούν πριν από την έναρξη της ανάλυσης.

Το βίντεο της εξεταστικής διαδικασίας και οι λύσεις στα περισσότερα τεχνικά προβλήματα υπάρχουν στο CD-ROM Πληροφοριών Προϊόντος και Τεχνικού Οδηγού που διατίθεται δωρεάν από τη Cellestis ή μέσω του προμηθευτή σας.

## 11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A comprehensive list of QFT references is located on gnowee™ - the QuantiFERON reference library, available at [www.gnowee.ne](http://www.gnowee.ne)

1. **Andersen, P., et al.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. **Balcells, M.E., et al.** A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis.* 2008. 12; 645-52.
3. **Bartalesi, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2009. 33;586-93.
4. **Bocchino, M., et al.** Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008. 27; 907-13.
5. **Brock, I., et al.** Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res.* 2006. 7; 56.
6. **Chun, J.K., et al.** The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008. 62; 389-94.
7. **Connell, T.G., et al.** A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. **Detjen, A.K., et al.** Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007. 45; 322-8.
9. **Diel, R., et al.** Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2009. 135; 1010-8.
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- $\gamma$  assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2009. 198; 33-7.
17. **Kang, Y.A., et al.** Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA.* 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.

22. **Manuel, O., et al.** Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007. 7; 2797-801.
23. **Matulis, G., et al.** Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann Rheum Dis.* 2007. 67; 84-90.
24. **Mirtskhulava, V., et al.** Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 513-519.
25. **Nakaoka, H., et al.** Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis.* 2006. 12; 1383-8.
26. **Pai, M., et al.** Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-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. ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ

Για την τεχνική υπηρεσία παρακαλούμε επικοινωνήστε με:

Cellestis International Pty Ltd: Τηλ: +61 3 8527 3500  
 Fax: +61 3 9568 6623  
 Email: [techsupport@cellestis.com](mailto:techsupport@cellestis.com)

Cellestis GmbH: Τηλ: +49 6151 428 59 - 0  
 (Europe) Fax: +49 6151 428 59 - 110  
 Email: [techsupport@cellestis.com](mailto:techsupport@cellestis.com)

Ιστοσελίδα: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Άλλες χώρες:

Χώρα	Αριθμός χωρίς επιβάρυνση
Αυστραλία	9001 5776
Αυστρία	0800 8020034
Βέλγιο	0800 75351
Γαλλία	0800911164
Γερμανία	0800 182 7452
Ιρλανδία	1800 550 417
Ολλανδία	0800 022 5340
Νέα Ζηλανδία	0800 44240
Ελβετία	0800 561 802
Ηνωμένο Βασίλειο	0800 680 0630

### 13. ΣΥΝΤΟΜΕΥΜΕΝΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

#### ΣΤΑΔΙΟ 1 – ΕΠΩΑΣΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

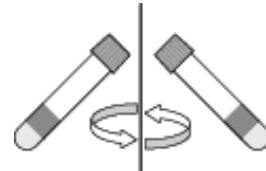
1. Συλλέξτε το αίμα του ασθενούς με τα φιαλίδια συλλογής αίματος και αναμίξτε τα **ανακινώντας τα δέκα (10) φορές** μόνο τόσο σταθερά όσο χρειάζεται για να σιγουρευτείτε ότι **ολόκληρη η εσωτερική επιφάνεια του φιαλιδίου έχει επικαλυφθεί με αίμα**, ώστε να διαλυτοποιηθούν αντιγόνα στα τοιχώματα των φιαλιδίων.



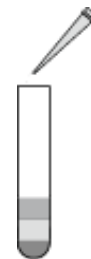
2. Τα φιαλίδια επώάζονται **ΟΡΘΙΑ** στους 37°C για 16 - 24 ώρες.



3. Μετά την επώαση, φυγοκεντρήστε τα φιαλίδια για 5-15 λεπτά σε 2000 - 3000 RCF (g) για τον διαχωρισμό του πλάσματος από τα ερυθρά αιμοσφαίρια.

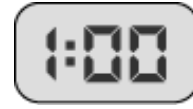


4. Μετά την φυγοκέντρηση λαμβάνετε το πλάσμα με την πιπέτα. Παρακαλείστε να δίνετε ιδιαίτερη προσοχή πριν από την λήψη να μην χρησιμοποιείτε πιπέτα σε καμία περίπτωση ή να μην αναμιγνύετε το πλάσμα.



## ΣΤΑΔΙΟ 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

1. Φέρετε όλα τα συστατικά ELISA, εκτός από το Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X, σε θερμοκρασία δωματίου και αφήστε τα να ισορροπήσουν για τουλάχιστον 60 λεπτά.

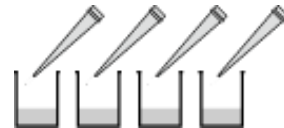


2. Ανασκευάστε τον Βαθμονομητή Κιτ στα 8.0 IU/mL με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Παρασκευάστε τέσσερα (4) διαλύματα βαθμονομητή.

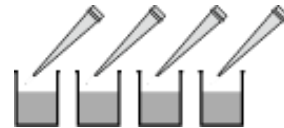


3. Ανασκευάστε το λυοφιλοποιημένο Συμπυκνωμένο Σύζευγμα 100X με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

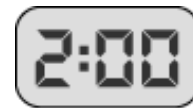
4. Παρασκευάστε σύζευγμα εργασίας με Πράσινο Αραιωτικό και προσθέστε 50 $\mu$ L σε κάθε θέση.



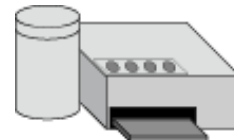
5. Προσθέστε 50 $\mu$ L δειγμάτων πλάσματος προς εξέταση και 50 $\mu$ L βαθμονομητών στις κατάλληλες θέσεις. Αναδεύσετε σε συσκευή ανάδευσης.



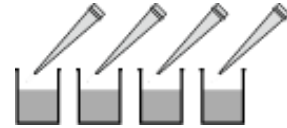
6. Επώαστε για 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



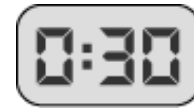
7. Πλύνετε τις θέσεις τουλάχιστον 6 φορές με 400 $\mu$ L/θέση ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης



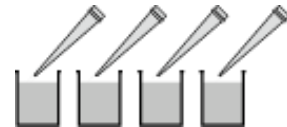
8. Προσθέστε 100μL Διαλύματος Ενζυμικού Υποστρώματος στις θέσεις. Αναδεύσετε σε συσκευή ανάδευσης.



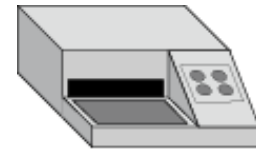
9. Επωάστε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



10. Προσθέστε 50μL Ανασχετικού Διαλύματος σε όλες τις θέσεις. Αναδεύσετε σε συσκευή ανάδευσης.



11. Ανάγνωση αποτελεσμάτων στα 450nm με φίλτρο αναφοράς 620 - 650nm.



12. Ανάλυση αποτελεσμάτων



## 14. ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ

Οι σημαντικές αλλαγές στην παρούσα έκδοση (05990301G – Ιούλιος 2011) που έγιναν στις σημειώσεις που συνοδεύουν τη συσκευασία QFT συνοψίζονται στην παρακάτω ταμπέλλα:

Κεφάλαιο	Σελίδα	Αλλαγές
5. Συλλογή και χειρισμός δειγμάτων	9	Τροποποίηση διαδικασίας ανακίνησης φιαλιδίου.
6. Οδηγίες χρήσης	10	Τροποποίηση διαδικασιών χειρισμού των φιαλιδίων που περιέχουν αίμα.
6. Οδηγίες χρήσης	12	Τροποποίηση διαδικασιών χειρισμού των δειγμάτων πλάσματος.
10. Τεχνικές πληροφορίες	23	Προσθήκη: «Ανάμειξη του πλάσματος σε φιαλίδια φυγοκέντρησης πριν από την συλλογή».
12. Τεχνική υπηρεσία	26	Νέα ηλεκτρονική διεύθυνση για την Τεχνική Υπηρεσία.



Παρασκευάζεται για την:  
Cellestis Limited (Australia) και Cellestis GmbH (Europe)  
1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia  
Τηλ. (Aust) +61 3 8527 3500, (Europe) +49 6151 428 59-0  
E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)  
Ιστοσελίδα: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Αρ. εγγράφου 05990301G  
Ιούλιος 2011



EC	REP
----	-----

MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Αννόβερο, Γερμανία