

QuantiFERON[®] -TB **Gold**

Az ESAT-6, CFP-10 és TB7.7(p.4) peptid antigének
kiváltotta IFN-gamma termelés
vizsgálata teljes vérben

HASZNÁLATI
ÚTMUTATÓ

In vitro diagnosztikum



TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|----|
| 1. FELHASZNÁLÁSI TERÜLET | 2 |
| 2. A VIZSGÁLAT ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MAGYARÁZATA | 2 |
| A vizsgálat alapjai | 3 |
| A vizsgálathoz szükséges idő | 3 |
| 3. REAGENSEK ÉS TÁROLÁSUK | 4 |
| Szükséges anyagok, amelyeket a készlet nem tartalmaz | 5 |
| Tárolás | 5 |
| Vérvételi csövek | 5 |
| A készlet reagensei | 5 |
| Beoldott és fel nem használt reagensek | 5 |
| 4. ÓVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZETETÉSEK | 6 |
| Óvintézkedések | 6 |
| Figyelmeztetések | 7 |
| 5. MINTA VÉTELE ÉS KEZELÉSE | 8 |
| 6. ALKALMAZÁSI ÚTMUTATÓ | 9 |
| 1. LÉPÉS: A vér inkubálása és a plazma elválasztása | 9 |
| 2. LÉPÉS Humán IFN- γ ELISA | 10 |
| 7. SZÁMÍTÁSOK ÉS A TESZT ÉRTÉKELÉSE | 13 |
| A standard görbe létrehozása | 13 |
| A vizsgálat minőségellenőrzése | 14 |
| Az eredmények értékelése | 15 |
| 8. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI | 19 |
| 9. MŰKÖDÉSI JELLEMZŐK | 19 |
| 10. TECHNIKAI INFORMÁCIÓ | 21 |
| Nem egyértelmű eredmények | 21 |
| Alvadékos plazmaminták | 21 |
| ELISA hibaelhárítás | 22 |
| A specifikus színreakció | 22 |
| Alacsony OD értékek a standardoknál | 22 |
| Magas háttérszíneződés | 23 |
| Nem lineáris standard görbe és eltérés a replikátumok között | 23 |
| 11. IRODALOMJEGYZÉK | 24 |
| 12. MŰSZAKI SZOLGÁLAT | 25 |
| 13. VIZSGÁLATI ELJÁRÁS (RÖVIDEN) | 26 |
| 14. FONTOS MÓDOSÍTÁSOK | 29 |

1. FELHASZNÁLÁSI TERÜLET

A QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT®) olyan *in-vitro* diagnosztikai teszt, amely heparinnal alvadásgátolt teljes vérben a sejteket ESAT-6, CFP-10 és TB7.7(p4) proteinek hatásával rendelkező peptid koktéllal stimulálja. Az Interferon- γ (IFN- γ) ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-módszerrel történő kimutatása a *Mycobacterium tuberculosis* fertőzéshez társuló peptid antigénnel szembeni *in vitro* válaszreakción alapzik.

A QFT a *M. tuberculosis*-fertőzés (és az azzal járó aktív betegség) közvetett kimutatására alkalmas teszt. A vizsgálat eredményeit a kockázati tényezőkkel, a radiológiai vizsgálatok és egyéb, orvosi és diagnosztikus vizsgálatok eredményeivel együtt kell értékelni.

2. A VIZSGÁLAT ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS MAGYARÁZATA

A tuberculosis (Tb) fertőző betegség, amelyet a *M. tuberculosis* komplexbe tartozó mikroorganizmusok (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) okoznak. A légúti tuberculosisban szenvedő betegek a fertőzést általában cseppfertőzéssel terjesztik. Egy újonnan fertőződött egyén heteken, vagy hónapokon belül megbetegedhet tuberculosisban, bár a legtöbb esetben a fertőzött személynek nincsenek panaszai. Néhány betegnél a tuberculosis fertőzés látens formában (LTBI) perzisztál, nem fertőző, tünetmentes megbetegedésként, amely hónapokkal vagy évekkel később vezethet tuberculosishoz. Az LTBI felismerésének a fő célja az, hogy mérlegelni lehessen a gyógyszeres kezelést a tuberculosis megelőzése érdekében. Nemrégben még csak a tuberculin bőrteszt (tuberculin skin test, TST) volt az egyedüli rendelkezésre álló módszer az LTBI diagnosztizálására. A tuberculinnal szembeni bőrérzékenység a fertőzést követő 2-10 héten belül alakul ki. Ugyanakkor egyes fertőzött betegek nem reagálnak a tuberculinra, pl. azok, akiknél más megbetegedések miatt immunszuppresszió áll fenn. De vannak olyanok is, akiknél nem ismert ilyen zavar, mégsem lép fel reakció. Ennek az ellenkezője is előfordul. Vannak, akiknél ugyan valószínűtlen a *M. tuberculosis* fertőzöttség, de mégis érzékenyek a tuberculinra és a Calmette-Guérin bacillussal (BCG) történő oltás, a nem a *M. tuberculosis* komplexbe tartozó *Mycobacterium*-fertőzés után, vagy egyéb, ismeretlen tényezők miatt a tuberculin-bőrteszt eredménye pozitív lesz.

Az LTBI-t meg kell különböztetni a tuberculosis betegségtől, amely általában a tüdőt és az alsó légutakat támadja meg, de más szervrendszereket is érinthet, és bejelentés-köteles. A tuberculosis a kórtörténet, valamint a fizikális, radiológiai, szövettani és mikrobiológiai vizsgálatok eredményeinek összessége alapján diagnosztizálják.

A QFT teszt egy olyan vizsgálat, melynek célja a *Mycobacterium*-proteinek hatását szimuláló peptid-antigénnel szembeni sejtközvetített immunitás (CMI) kimutatása. Ezek a proteinek (ESAT-6, CFP-10 és TB7.7(p4)) egyik BCG törzsben és a legtöbb nem-tuberculosis *Mycobacterium*-ban sincsenek jelen, kivéve a *M. kansasii*, *M. szulgai* és az *M. marinum* törzseket.¹ Az *M. tuberculosis* komplex tagjaival (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) fertőződött betegek vérében általában vannak olyan limfociták, amelyek ezeket az antigéneket és más *Mycobacterium*-antigéneket felismerik. Ebben a felismerési folyamatban IFN- γ citokin keletkezik és szabadul fel. A vizsgálat az IFN- γ kimutatásán, majd mennyiségének meghatározásán alapzik.

A QFT tesztben alkalmazott antigének olyan peptidkoktélt alkotnak, amely az ESAT-6, CFP-10 és a TB7.7(p4) fehérjék hatását szimulálja. Számos tanulmány kimutatta, hogy ezek a peptid antigének az *M. tuberculosis*-sal fertőzött betegektől származó T-sejtekben stimulálják az IFN- γ reakciót. De általában nem teszik ezt a nem fertőződött, vagy BCG-vel oltott, de LTBI kockázati csoportba nem tartozó egyének T-sejtjeiben.¹⁻³² Ugyanakkor azok az orvosi kezelések, vagy megbetegedések, amelyek csökkentik az immunrendszer működését, potenciálisan csökkenthetik az IFN- γ termelést is. Egyéb típusú *Mycobacterium*-fertőzésben szenvedő betegek is érzékenyek lehetnek az ESAT-6, CFP-10 és TB7.7(p4) proteinekre, mivel az ezeket kódoló gének jelen vannak az *M. kansasii*, *M. szulgai* és az *M. marinum*^{1,23} törzsekben is. A QFT teszt ezért hasznos segítséget jelent a betegeknél az *M. tuberculosis* komplex fertőzés diagnosztizálására. A pozitív eredmény alátámasztja a tuberculosis betegség diagnózisát; ugyanakkor egyéb *Mycobacterium*-törzsek (pl. *M. kansasii*) okozta fertőzések szintén pozitív eredményekhez vezethetnek. A tuberculosis betegség megerősítésére vagy kizárására további orvosi és diagnosztikai vizsgálatok is szükségesek.

A vizsgálat alapjai

A QFT rendszer speciális vérvételi csöveket tartalmaz, a teljes vért ezekbe kell levenni. A levett vért a csövekben 16–24 órán át inkubálják, ezt követően a plazmát elkülönítik és vizsgálják a peptid antigének elleni reakcióként létrejövő IFN- γ jelenlétét.

A QFT teszt végzése két lépésből áll. Először teljes vért vesznek a különböző QFT vérvételi csövekbe. Ide tartozik egy Nil kontroll, egy TB Antigen és opcionálisan egy Mitogen cső.

A Mitogen cső a QFT teszt során pozitív kontrollként használható. Alkalmazása különösen akkor javasolt, amikor kétséges az egyén immunrendszerének állapota. A Mitogen cső segítségével az is ellenőrizhető, hogy a vér kezelése és inkubálása megfelelő volt-e.

A csöveket minél előbb, de feltétlenül a vérvételtől számított 16 órán belül, 37°C-on inkubálni kell. A 16-24 órás inkubálás után a csöveket centrifugálják, elválasztják a plazmát, és az IFN- γ (NE/ml) mennyiségét ELISA módszerrel megméri.

A tesztet IFN- γ reakció szempontjából akkor tekintik pozitívnak, ha a TB Antigen csőben az IFN- γ szignifikánsan a Nil csőben mért (IFN- γ NE/ml) értéke fölötti. Ha alkalmazzák, a Mitogen cső plazmamintája IFN- γ pozitív kontrollként szolgál minden vizsgált minta esetében. Ha a Mitogénre adott reakció alacsony (<0,5 NE/ml), ez nem egyértelmű eredményt jelez akkor, ha a vérminta negatív reakciót mutat a TB antigénekre. Ez akkor is előfordulhat, ha nincs elegendő limfocita vagy csökkent a limfocita-aktivitás a helytelen mintakezelés, vérvétel vagy a Mitogen cső nem megfelelő felrázása miatt, vagy, ha a beteg limfocitái nem képesek az IFN- γ termelésre. A Nil minta alapján az aspecifikus háttér, a heterofil antitest-kötődések⁷, vagy a vérmintában aspecifikusan termelődő IFN- γ határozható meg. A Nil csőben mért IFN- γ szintet kivonják a TB Antigen csőben és (amennyiben használják) a Mitogen csőben mért IFN- γ szintből.

A vizgálathoz szükséges idő

A QFT teszt elvégzéséhez szükséges idő megközelítőleg a következő; egyúttal jelezzük az egyszerre több minta vizsgálatához szükséges időt Batch üzemmódban is:

37°C-on a vérvételi csövek inkubálása: 16-24 óra

ELISA: Kb. 3 óra egy ELISA lemezhez

- < 1 óra laboratóriumi munka
- lemezenként további 10–15 perc

3. REAGENSEK ÉS TÁROLÁSUK

Tuberculosis- és kontroll antigén vérvételi csövek

Rendelési szám: T0590-0301

- | | |
|--------------------------------------|------------|
| 1. Nil kontroll cső (szürke kupak) | 100 db cső |
| 2. Tb Antigen cső (vörös kupak) | 100 db cső |
| 3. Mitogen kontroll cső (lila kupak) | 100 db cső |

MEGJEGYZÉS: A csövek a következő kiszerezésben is kaphatók:

100 db Nil kontroll cső + 100 db Tb Antigen cső (rend. .sz. T0590-0201)

100 db Mitogen kontroll cső (rend. sz. T0593-0201)

Magas fekvésű területeken használandó csövek:

Rend. sz. T0590-0501: (nagy magasságban) 100 db Nil kontroll cső, 100db Tb Antigen cső

Rend. sz. T0590-0505: (nagy magasságban) 100 db Nil kontroll cső, 100db Tb Antigen és 100 db Mitogen kontroll cső

Rend. sz. T0593-0501: (nagy magasságban) 100 db Mitogen kontroll cső

ELISA-komponensek

| ELISA-komponensek | Rend. sz. : 0594-0201 | Rend. sz.: 0594-0501 |
|--|---|---|
| | 2 lemezes készlet | Reference Lab Pack (Referencia Laboratórium csomagolás) |
| Mikrotitráló csíkok, anti-humán IFN- γ monoklonális antitest (egér) bevonattal | 2 x 96 mintahelyes lemez | 20 x 96 mintahelyes lemez |
| Humán IFN- γ standard, liofilizált (rekombináns humán-IFN- γ -t, marha-kazeint és 0,01 % tiomerzált tartalmaz) | 1 ampula (8 NE/ml rekonstituálás után) | 10 ampula (8 NE/ml rekonstituálás után) |
| Zöld hígító oldat (marha-kazeint, normál egérszérumot és 0,01 % tiomerzált tartalmaz) | 1 x 30 ml | 10 x 30 ml |
| Konjugátum (100-szoros töménységű), liofilizált (anti-humán IFN- γ (egér) HRP; 0,01% tiomerzált tartalmaz) | 1 x 0.3ml (rekonstituálás után) | 10 x 0,3 ml (rekonstituálás után) |
| Mosópuffer (20-szoros töménységű) (pH 7,2; 0,01 % tiomerzált tartalmaz) | 1 x 100 ml | 10 x 100 ml |
| Enzim szubsztrát oldat (H_2O_2 , 3,3',5,5' tetrametilbenzidint tartalmaz) | 1 x 30 ml | 10 x 30 ml |
| Enzim stop (leállító) oldat (0,5M H_2SO_4 -t tartalmaz) | 1 x 15 ml | 10 x 15 ml |

Szükséges anyagok, amelyeket a készlet nem tartalmaz

- 37 °C inkubátor; CO₂ nem szükséges.
- Kalibrált, különböző térfogatú (10 µl-1000 µl) pipetták, egyszerhasználatos hegygel
- Kalibrált, 50 µl és 100 µl bemérésére alkalmas többcsatornás pipetta, egyszerhasználatos hegygel
- Mikrotitráló lemez rázókészülék
- Ionmentes vagy desztillált víz (2 liter)
- Mikrotitráló lemezmosó (lehetőleg automata)
- Mikrotitráló lemezolvasó 450 nm-es szűrővel és 620-650 nm referenciaszűrővel

Tárolás

Vérvételi csövek

- A vérvételi csöveket tárolja 4 °C - 25 °C-on.

A készlet reagensei

- Tárolja a készletet 2 °C – 8 °C-on.
- Az enzim szubsztrát oldatot óvja a közvetlen napfénytől.

Beoldott és fel nem használt reagensek

A reagensek rekonstituálására vonatkozó útmutatót lásd „A reagensek előkészítése “ című 6. fejezetben.

- A 2°C-8°C-on tárolt Kit Standard a rekonstituálástól számított 3 hónapon belül használható fel.
 - *Jegyezze fel a Kit Standard rekonstituálásának időpontját.*
- A rekonstituálás után a fel nem használt tömény (100x) konjugátumot továbbra is 2°C-8°C-on kell tárolni és szintén 3 hónapon belül fel kell használni.
 - *Jegyezze fel a konjugátum rekonstituálásának időpontját.*
- A használatra kész konjugátumot az előkészítéstől számított 6 órán belül fel kell használni.
- A használatra kész mosó puffer szobahőmérsékleten 2 hétig tartható el.

4. ÓVINTÉZKEDÉSEK ÉS FIGYELMEZTETÉSEK

Óvintézkedések

- A negatív QFT teszteredmény nem zárja ki az *M. tuberculosis* fertőzést, vagy a tuberculosis betegséget: álnegatív eredményhez vezethet a fertőzés stádiuma (pl. a mintavétel a sejtes immunválasz kialakulása előtt történt), egyéb betegség, amely befolyásolja az immunfunkciót; a vérvételi csövek helytelen kezelése a vérvételt követően, a módszer helytelen végzése, vagy egyéb, az immunrendszert érintő eltérések.
- Nem lehet egyedül és kizárólag csak a pozitív QFT teszteredményre alapozni a *M. tuberculosis* fertőzés diagnózisát. A módszer helytelen végzése álpozitív eredményt okozhat.
- Ha a QFT teszt eredménye pozitív, akkor további orvosi és diagnosztikai vizsgálatokra (pl. AFB köpetvizsgálat és tenyésztés, mellkas-röntgen) van szükség az aktív tuberculosis betegség kimutatására.
- Míg az ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4) egyetlen BCG törzsben, és a legtöbb ismert nem tuberculosis mycobaktériumban sincs jelen, addig lehet, hogy a QFT teszt pozitív eredményének oka *M. kansasii*, *M. szulgai* vagy *M. marinum* fertőzés. Ha fennáll ezeknek a fertőzéseknek a gyanúja, alternatív tesztmódszereket kell alkalmazni.

Figyelmeztetések

- A diagnosztikum csak *in vitro* alkalmazható.
- **Veszélyes:** Az **enzim szubsztrát oldat** 3,3',5,5' tetrametil-benzidint tartalmaz, amelynek lenyelése, belégzése, érintése veszélyes. Bőrre és szemre irritáló hatású. Mutagén hatású. Viseljen védőszemüveget, laboratóriumi védőkesztyűt, és kezelje az oldatot potenciálisan rákkeltő anyagként.
- **Veszélyes:** Az **enzim stop reagens** H₂SO₄-et tartalmaz, amelynek lenyelése, belégzése, szemmel és bőrrel való érintkezése veszélyes. Viseljen védőszemüveget, laboratóriumi védőkesztyűt és laboratóriumban használatos védőruházatot. Ha a gátlóoldat szembe, vagy bőrre jut, öblítse le bőven vízzel, és forduljon orvoshoz.
- **Veszélyes:** Az **IFN-γ Standard és a 100x töménységű konjugátum** lenyelve rosszulletet okozhat, a bőrre kerülve irritálhatja a bőrt. Viseljen védőkesztyűt és laboratóriumban használatos védőruházatot.
- **A humán vérmintát mindig potenciálisan fertőzőként kezelje!** Tartsa be a vér kezelésére vonatkozó utasításokat!
- Néhány reagens **thimerosal** tartósítószeret tartalmaz. A thimerosal lenyelése, belégzése, érintése mérgező hatást válthat ki.
- A **zöld hígító oldat** normál egérszérumot és kazeint tartalmaz; ezek az anyagok allergiás reakciót válthatnak ki. Kerülje a bőrrel való érintkezést.
- A Használati útmutatóban leírt eljárástól és instrukcióktól való eltérés hibás eredményekhez vezethet. Kérjük, hogy használat előtt figyelmesen olvassa el az útmutatót.
- Ne használja fel a reagens-készletet, ha a benne levő egy vagy több reagens üvege sérült vagy szivárog.
- Ne keverje össze, vagy használjon fel eltérő gyártási számú QFT kitekből származó ELISA reagenseket ennek a csomagolásnak a komponenseivel.
- A fel nem használt reagenseket és biológiai mintákat a helyi és országos előírásoknak megfelelően távolítsa el.
- A vérvételi csöveket és az ELISA készlet komponenseit a lejáratú idő eltelté után nem szabad felhasználni.
- Alkalmazás előtt győződjön meg róla, hogy a laboratóriumi készülékek, a lemezmosó és az olvasó kalibrálva és validálva vannak.

5. MINTA VÉTELE ÉS KEZELÉSE

A QFT teszt a következő vérvételi csöveket tartalmazza:

1. Nil kontroll (szürke kupak fehér gyűrűvel) (810 m feletti tengerszint feletti magasságig)
2. Tb Antigen (vörös kupak fehér gyűrűvel) (810 m feletti tengerszint feletti magasságig)
3. Mitogen kontroll - opcionális (lila kupak fehér gyűrűvel) (810 m feletti tengerszint feletti magasságig)
4. Nil kontroll (szürke kupak sárga gyűrűvel) (1020 m-től 1875 m-ig terjedő tengerszint feletti magasságig)
5. Tb Antigen (vörös kupak sárga gyűrűvel) (1020 m-től 1875 m-ig terjedő tengerszint feletti magasságig)
6. Mitogen kontroll - opcionális (lila kupak sárga gyűrűvel) (1020 m-től 1875 m-ig terjedő tengerszint feletti magasságig)

Az antigének a vérvevő cső belső falára vannak rászárítva. Fontos tehát, hogy a vérminta alaposan elkeveredjen cső tartalmával. A csöveket minél hamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül inkubátorba (37 °C) kell helyezni.

Az optimális eredmények elérése érdekében a következő utasításokat kell betartani:

1. Betegenként a QFT minden egyes vérvételi csövébe vegyen le 1 ml vénás vért. A vérvételt csak kiképzett egészségügyi személyzet (phlebotomist) végezheti.

- 810 m magasságig a QFT standard vérvételi csöveket kell használni. 1.020 m-nél nagyobb magasságban a speciális, magas fekvésű területekre készült QFT vérvételi csöveket használjuk.

Ha a QFT csöveket a nevezett magasságokon kívül alkalmazzuk, vagy ha a minta térfogata kisebb, a vért fecskendővel is vehetjük; ekkor a három cső mindegyikébe 1-1 ml vért mérünk be. Biztonsági okokból legjobb, ha a tűt ilyenkor eltávolítjuk, betartva eközben az általános biztonsági előírásokat. Vegye le a három QFT cső kupakját és mérjen be mindhárom csőbe 1 ml vért (az etikett oldalsó szélén található fekete jelzésig). Ezután a kupakokat helyezze vissza és végezze el a keverést az alábbiakban megadottak szerint.

- Mivel az 1 ml-es csövek a vért viszonylag lassan szívják, tartsa a tűt a csövet 2-3 másodperccel tovább, miután a cső látszatra megtelt. Így biztosan a megfelelő vérmennyiséget veszi le.

A csövek oldalán lévő fekete jelzés mutatja az 1ml mennyiséget. A QFT vérvételi csöveket 0,8 ml-től 1,2 ml-ig terjedő mennyiségre validálták. Ha a levett vérmennyiség nem éri el az indikátor vonalat, újabb vérminta vétele javasolt.

- Ha pillangókanült használ vérvételre, először egy üres csövet kell használni annak biztosítására, hogy a vezeték megteljen vérrel, mielőtt a QFT csövekbe venné le a vért.

2. Közvetlenül a vér csövekbe való töltése után rázza fel azokat éppen csak annyi erővel, hogy a csövek teljes belső felszíne érintkezzen a vérrel és az antigének leolvadhassanak a cső bevonatából.

- Vérvételkor a csövecskék hőmérséklete 17 és 25°C között legyen.
- A túl heves rázás tönkretetheti a géldugót és téves eredményhez vezethet.

3. Feliratozza a csöveket.

4. A csöveket minél hamarabb, de legkésőbb a vérvételtől számított 16 órán belül inkubátorba (37 °C ± 1°C) kell helyezni. Tárolja a csöveket az inkubációig szobahőmérsékleten (22 °C ± 5 °C). A vérmintákat ne tegye hűtőbe vagy fagyasztóba!

6. ALKALMAZÁSI ÚTMUTATÓ

1. lépés: A vérminta inkubálása és a plazma elválasztása

A készlet tartalma

QFT vérvételi csövek (ld. 3. fejezet).

Szükséges anyagok, amelyeket a készlet nem tartalmaz

Ld. 3. fejezet

A vizsgálat menete

1. Ha a vért nem inkubáljuk azonnal a vérvétel után, a csövek tartalmát közvetlenül az inkubálás előtt 10-szeres megforgatással újra meg kell keverni.
2. Inkubálja a csöveket **ÁLLÓ HELYZETBEN** 37 °C-on 16-24 órán keresztül. Ehhez nem szükséges CO₂ vagy nedvesség.
3. A vérvételi csövek a centrifugálást megelőzően max. 3 napig tárolhatók 4 °C és 27°C közötti hőmérsékleten.
4. A csövek 37 °C-on történő inkubálása után a plazma elválasztása a csövek 5 – 15 perces centrifugálásával, 2000 – 3000g (RCF) fordulatszámon történik. A dugóképződés által a sejtek leválnak a plazmáról. Amennyiben ez nem történik meg, a csöveket nagyobb fordulatszámon újra kell centrifugálni.
 - A plazmát centrifugálás nélkül is el lehet választani, de ekkor fokozott figyelemmel kell eljárni, hogy a plazma eltávolításakor a vérsejtek ne kavardjanak fel.
5. **Centrifugálás után és a plazma leválasztása előtt mindenképpen kerüljük a mintákban való le-fel-pipettázást ill. a plazma keverését. Fokozottan ügyeljünk arra, hogy az anyag gél-fel-színét ne háborgassuk.**
 - A plazmaminta leválasztását mindig **pipettával** végezzük!
 - A plazmamintákat a centrifugált vérvételi csövekből közvetlenül a QFT ELISA lemezre mérhetjük; automata ELISA készülék alkalmazása esetén is.
 - A plazmaminták 2°C és 8°C közötti hőmérsékleten max. 28 napig tárolhatók; a plazma leválasztása után -20°C-on hosszabb ideig is.

2. lépés: Humán IFN- γ ELISA

A készlet tartalma

QFT ELISA készlet (ld. 3. fejezet).

Szükséges anyagok, amelyeket a készlet nem tartalmaz

Ld. 3. fejezet.

A vizsgálat menete

1. Az összes plazmamintát és reagenst, kivéve a 100x töménységű konjugátumot, használat előtt szobahőmérsékletre kell hagyni felmelegedni ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Számítson erre legalább 60 percet.
2. Vegye le a keretről azokat a csíkokat, amelyekre nem lesz szüksége, tegye őket vissza a fóliába és tárolja a hűtőben, amíg nem lesz rájuk szüksége.

Hagyjon legalább egy csíkot a QFT standardok számára, és a vizsgálandó betegek számától függően elegendő számú csíkot (ld. a 2A és 2B ábrát a két illetve három cső felhasználásával végzett vizsgálatokhoz). Használat után tartsa meg a keretet és a fedőt a megmaradt csíkok felhasználásához.

3. Rekonstituálja a liofilizált Kit Standardot a standard ampulla címkéjén megadott mennyiségű ionmentes vagy desztillált vízzel. Óvatosan keverje meg (minimális habképződés) és győződjön meg róla, hogy a tartalom teljesen feloldódott. A Standard előírt mennyiségre való rekonstituálása esetén 8,0 IE/ml koncentrációjú oldatot kap.

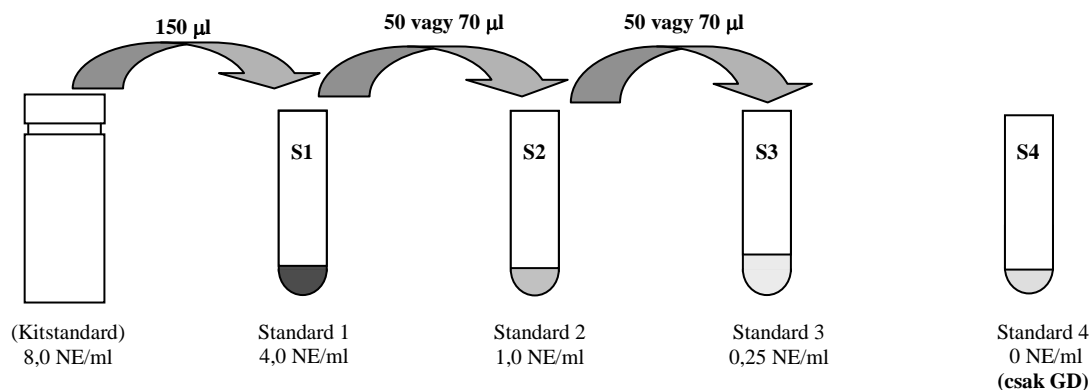
Megjegyzés: A Kit Standard rekonstituálásához szükséges térfogat gyártási sorozatonként eltérő!

A rekonstituált Kit Standard-dal készítsen 1:4 hígítási sort az IFN- γ és a zöld hígító oldat (GD) keverékével – ld. 1. ábra. Az IFN- γ szint az S1 (Standard 1) esetében 4 NE/ml, az S2 (Standard 2) esetében 1 NE/ml, az S3 (Standard 3) esetében 0,25 NE/ml és az S4 (Standard 4) esetében 0 NE/ml (csak GD). A standardokat legalább kétszer meg kell mérni.

| JAVASOLT ELJÁRÁS DUPLIKÁT STANDARDOK ELKÉSZÍTÉSÉRE |
|---|
| a. Jelöljön meg 4 csövet a következő felirattal: „S1”, „S2”, „S3”, „S4”. |
| b. Mérjen be 150 μl GD-t az S1, S2, S3, S4 csövekbe. |
| c. Mérjen be 150 μl Kit Standardot az S1-hez, és keverje meg alaposan. |
| d. Mérjen be 50 μl -t az S1-ből az S2-be, és keverje meg alaposan. |
| e. Mérjen be 50 μl -t az S2-ből az S3-ba, és keverje meg alaposan. |
| f. Csak GD zéró standardnak (S4) felel meg. |

| JAVASOLT ELJÁRÁS TRIPLIKÁT STANDARDOK ELKÉSZÍTÉSÉRE |
|--|
| a. Jelöljön meg 4 csövet a következő felirattal: „S1”, „S2”, „S3”, „S4”. |
| b. Mérjen be 150 μl GD-t az S1-be. |
| c. Mérjen be 210 μl GD-t az S2, S3, S4 csövekbe. |
| d. Mérjen be 150 μl Kit Standardot az S1-hez és keverje meg alaposan. |
| e. Mérjen be 70 μl -t az S1-ből az S2-be, és keverje meg alaposan. |
| f. Mérjen be 70 μl -t az S2-ből az S3-ba, és keverje meg alaposan. |
| g. Csak GD zéró standardnak (S4) felel meg. |

1. ÁBRA: A standard görbe létrehozása



- Mindegyik ELISA futtatáshoz készítsen friss Kit Standard oldatot.

4. Rekonstituálja a liofilizált 100x töménységű konjugátumot 0,3 ml ionmentes vagy desztillált vízzel. Óvatosan keverje el (minimális habképződés) majd győződjön meg róla, hogy a konjugátum teljesen feloldódott.

A használatra kész konjugátumot megfelelő mennyiségű rekonstituált 100x tömény konjugátum zöld hígító oldatban történő hígításával nyerjük az 1. táblázatban (A konjugátum elkészítése) foglaltak szerint.

1. TÁBLÁZAT A konjugátum elkészítése

| A csíkok száma | A 100x tömény konjugátum mennyisége | A zöld hígító oldat mennyisége |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 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 |

- Keverjük el alaposan, de óvatosan, kerülve a habképződést.
 - Használat után a fel nem használt 100x tömény konjugátumot azonnal 2 °C -8 °C-on kell tárolni.
 - Hígításhoz kizárólag a zöld hígító oldatot használja.
5. A vérvételi csövecskékből levett plazmamintákat, amelyeket a teszt előtt mélyfagyasztottunk vagy 24 óránál hosszabb ideig tároltunk, az ELISA-mintahelyekbe való helyezés előtt gondosan meg kell keverni.
 - Amennyiben a plazmamintákat közvetlenül a centrifugált QFT csövekből mérjük, a plazmamintákat ne keverjük.

- Mérjen a többszornás pipettával 50 µl frissen elkészített használatra kész konjugátumot az ELISA lemezen a megfelelő mintahelyekre.
- Mérjen be a többszornás pipettával 50 µl-t a plazmamintákból a megfelelő mintahelyekre (ld. a javasolt lemezbeosztást az alábbi 2A és 2B ábrákon). Végül mérjen be 50 µl-t az 1-4 jelzésű standardok mindegyikéből a megfelelő helyekre.

**2A. ÁBRA: Javasolt mintaelhelyezés a Nil és Tb Antigént tartalmazó csövek esetében
(44 vizsgálat lemezenként)**

| Sor | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | 1N | 5N | 9N | 13N | 17N | S1 | S1 | 25N | 29N | 33N | 37N | 41N |
| B | 1A | 5A | 9A | 13A | 17A | S2 | S2 | 25A | 29A | 33A | 37A | 41A |
| C | 2N | 6N | 10N | 14N | 18N | S3 | S3 | 26N | 30N | 34N | 38N | 42N |
| D | 2A | 6A | 10A | 14A | 18A | S4 | S4 | 26A | 30A | 34A | 38A | 42A |
| E | 3N | 7N | 11N | 15N | 19N | 21N | 23N | 27N | 31N | 35N | 39N | 43N |
| F | 3A | 7A | 11A | 15A | 19A | 21A | 23A | 27A | 31A | 35A | 39A | 43A |
| G | 4N | 8N | 12N | 16N | 20N | 22N | 24N | 28N | 32N | 36N | 40N | 44N |
| H | 4A | 8A | 12A | 16A | 20A | 22A | 24A | 28A | 32A | 36A | 40A | 44A |

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Minta 1, Nil kontroll plazma); 1A (Minta 1, Tb Antigén plazma).

**2B. ÁBRA: Javasolt mintaelhelyezés Nil kontroll, Tb Antigént és Mitogent tartalmazó csövek esetében
(28 vizsgálat lemezenként)**

| Sor | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A | 1N | 1A | 1M | S1 | S1 | S1 | 13N | 13A | 13M | 21N | 21A | 21M |
| B | 2N | 2A | 2M | S2 | S2 | S2 | 14N | 14A | 14M | 22N | 22A | 22M |
| C | 3N | 3A | 3M | S3 | S3 | S3 | 15N | 15A | 15M | 23N | 23A | 23M |
| D | 4N | 4A | 4M | S4 | S4 | S4 | 16N | 16A | 16M | 24N | 24A | 24M |
| E | 5N | 5A | 5M | 9N | 9A | 9M | 17N | 17A | 17M | 25N | 25A | 25M |
| F | 6N | 6A | 6M | 10N | 10A | 10M | 18N | 18A | 18M | 26N | 26A | 26M |
| G | 7N | 7A | 7M | 11N | 11A | 11M | 19N | 19A | 19M | 27N | 27A | 27M |
| H | 8N | 8A | 8M | 12N | 12A | 12M | 20N | 20A | 20M | 28N | 28A | 28M |

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Minta 1, Nil kontroll plazma); 1A (Minta 1, Tb Antigén plazma); 1M (Minta 1, Mitogent kontroll plazma).

- Keverje el 1 percig alaposan a konjugátumot és a plazmamintákat/standardokat mikrotitráló lemez rázókészülékkel.
- Takarjon be minden lemezt fedőlappal és inkubálja a lemezeket 120 ± 5 percig szobahőmérsékleten ($22^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Az inkubálás alatt a lemezeket közvetlen napfénytől óvni kell.
- Az inkubálás alatt hígítson fel egy rész 20x tömény mosó puffert 19 rész ionmentes vagy desztillált vízzel, és alaposan keverje el. A reagenskészlet 2 liter használatra kész mosó puffer előállításához elegendő 20x tömény mosó puffert tartalmaz.

Mossa ki a mintahelyeket legalább 6-szor 400 µl használatra kész mosó pufferrel. Javasoljuk automata lemezmosó alkalmazását.

- A vizsgálat sikeres elvégzésének fontos feltétele az alapos mosás. Győződjön meg minden mosóciklusban arról, hogy minden mintahely **színültig megtelt** mosó pufferrel. Javasolt a ciklusok között legalább 5 másodperces áztatási időt betartani.
 - A használt mosó puffert felfogó edénybe laboratóriumokban használatos fertőtlenítőszeret kell tenni. Ezen kívül az Ön laboratóriumában érvényes, potenciálisan fertőző anyagokra vonatkozó dekontaminálási előírásokat is be kell tartani.
11. A bemélyedésekkel lefelé veregesse ki a lemezeket papírkendő felett, eltávolítva ezzel a bennük maradt puffert. Adjon 100 µl enzim szubsztrát oldatot minden bemélyedésbe, és keverje el alaposan rázókészülék segítségével.
 12. Takarjon be minden lemezt fedőlappal és inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
 - Az inkubálás alatt a lemezeket közvetlen napfénytől óvni kell.
 13. A 30 perces inkubálást követően adjon 50 µl enzim stop (leállító) oldatot minden mintahelyre és keverje meg.
 - Az enzim stop oldatot ugyanabban a sorrendben és megközelítőleg ugyanolyan sebességgel kell a bemélyedésekbe adagolni, mint a szubsztrátumot a 11. pontban.
 14. A reakció leállítását követő 5 percen belül mérje meg minden mintahely optikai denzitását (OD) 450 nm-es szűrővel és 620-650 nm-es referenciaszűrővel ellátott mikrotitráló lemez olvasó segítségével. Az eredmények kiszámítása az OD értékek alapján történik.

7. SZÁMÍTÁSOK ÉS A TESZT ÉRTÉKELÉSE

Cellestis a mérési adatok elemzésére és az eredmények kiszámítására a QFT Analysis szoftvert kínálja Önnek. (Győződjön meg róla, hogy mindig a legújabb szoftvert alkalmazza!)

A szoftver elvégzi a vizsgálat minőségellenőrzését, létrehozza a standard görbét, és kiszámítja minden vizsgált beteg teszteredményét az alább leírt értékelési módszer alapján.

A QFT Analysis szoftver alkalmazása mellett másik megoldás az eredmények kiszámításához az alább leírt módszer:

A standard görbe létrehozása

(ha nem a QFT szoftvert használják)

Határozza meg a Kit Standard replikátumok OD középértékét minden lemezen.

Hozzon létre grafikus ábrázolással egy $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standard görbét úgy, hogy az OD (y-tengely) $\log_{(e)}$ középértékét bejelöli a standardok IFN- γ koncentrációjának NE/ml-ben kifejezett $\log_{(e)}$ értékével szemben (x-tengely), kihagyva a zéró standard értéket a számításokból. Számítsa ki a standard görbéhez legjobban illeszkedő görbét regressziós analízissel.

A vizsgált plazmaminták esetében mért OD érték alapján a standard görbén határozza meg a minták IFN- γ koncentrációját (NE/ml) .

Ezeket a számításokat el lehet végezni a mikrotitráló lemez olvasókhöz beszerezhető szoftver csomagok, standard képletek, vagy statisztikai szoftver (mint pl. a Microsoft Excel) segítségével. Javasoljuk ezek a programcsomagok használatát a regressziós analízis, a standardok variációs koefficiense (%CV), és a standard görbe korrelációs koefficiense (r) kiszámításához.

A vizsgálat minőségellenőrzése

A vizsgálati eredmények pontossága függ a létrehozott standard görbe pontosságától. Tehát a minták eredményeinek értelmezése előtt a standardok alapján levezetett eredményeket ellenőrizni kell.

Az ELISA vizsgálat érvényes, ha az összes alábbi kritérium teljesítve van:

- **A Standard 1 OD középértékének $\geq 0,600$ kell lennie.**
- **Az ismételten mért Standard 1 és Standard 2 OD értékeknél a $\%CV \leq 15\%$ -nak kell lennie.**
- **A Standard 3 és Standard 4 replikátum OD értékeinek nem szabad $0,040$ OD egységénél nagyobb mértékben eltérniük a középértékektől.**
- **A standardok abszorbancia középértékéből kiszámított korrelációs koefficiens értéknek $(r) \geq 0,98$ -nak kell lennie.**

A QFT Analysis szoftver kiszámítja és feltünteti ezeket a minőségellenőrzési paramétereket.

Ha a fent leírt kritériumok nincsenek kielégítve, a vizsgálat eredménye érvénytelen, a vizsgálatot meg kell ismételni.

- **A Zéró Standard (zöld hígító oldat) OD középértékének $\leq 0,150$ -nek kell lennie. Ha az OD középérték $> 0,150$, javasoljuk a lemezmosás ellenőrzését.**

Az eredmények értékelése

A QFT vizsgálat eredményeit a következő kritériumok szerint kell értékelni:

MEGJEGYZÉS: A tuberculosis betegség diagnosztizálása, vagy kizárása, valamint az LTBI valószínűsítése szükségessé teszi az epidemiológiai adatok, az anamnézis, a fizikális és a diagnosztikus vizsgálatok eredményeinek együttes értékelését; mindezt figyelembe kell venni a QFT eredményeinek értelmezésekor.

HA CSAK A NIL KONTROLL ÉS TB-ANTIGÉN CSÖVEKET HASZNÁLJÁK

| Nil [NE/ml] | Tb-Antigén mínusz Nil [NE/ml] | QFT eredmény | Vélemény/Értelmezés |
|--------------------|----------------------------------|------------------------------------|---|
| ≤ 8,0 | < 0,35 | negatív | <i>M. tuberculosis</i> fertőzés NEM valószínű |
| | ≥ 0,35 és < 25% Nil érték | | |
| | ≥ 0,35 és ≥ 25% Nil érték | pozitív ¹ | <i>M. tuberculosis</i> fertőzés valószínű |
| > 8,0 ² | bármennyi | nem egyértelmű ³ | A Tb Antigén reakció eredményei nem egyértelműek |

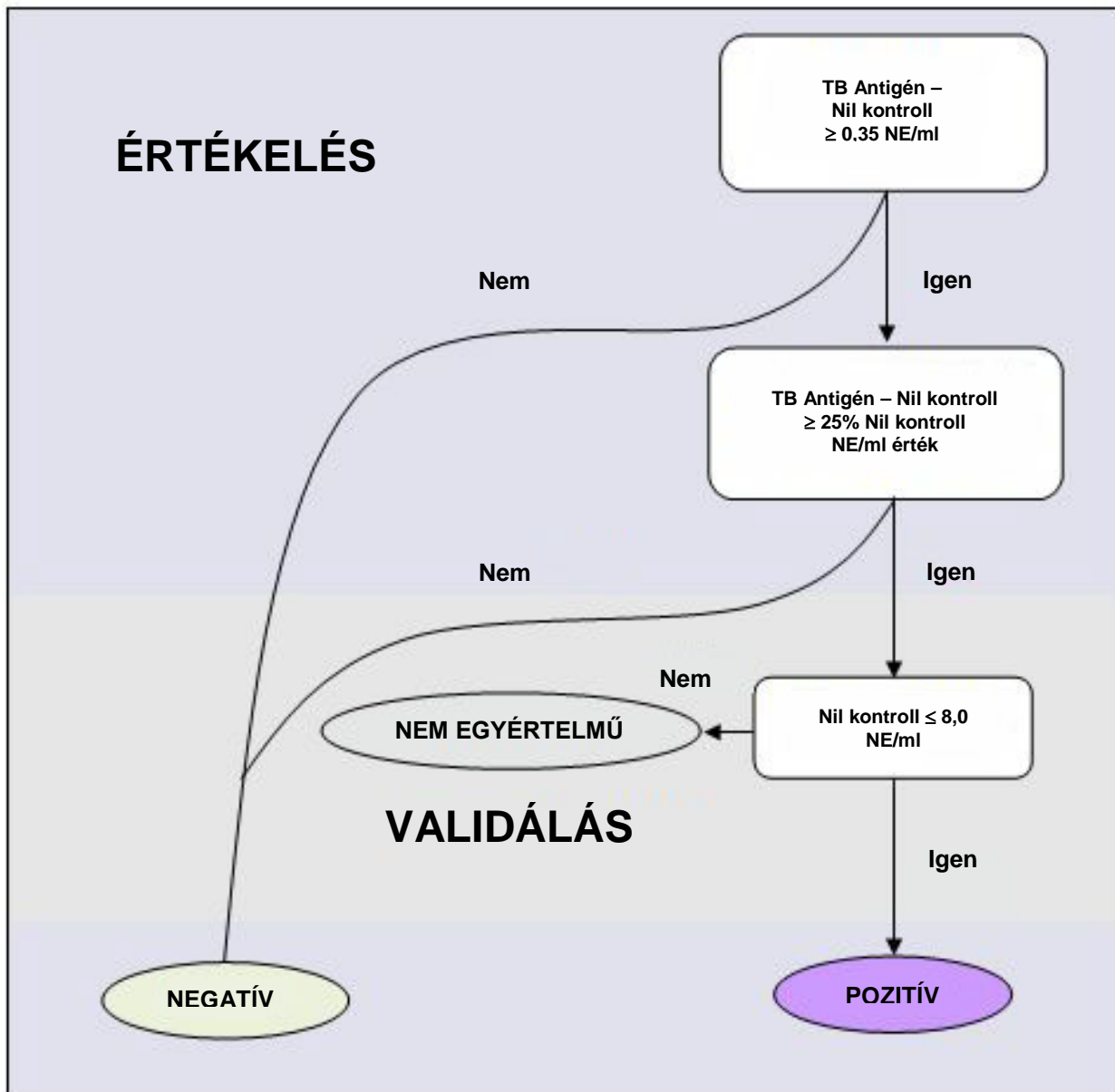
¹ Amikor *M. tuberculosis* fertőzést nem feltételeznek, a kezdeti pozitív eredményeket úgy lehet megerősíteni, hogy duplikátumban újra tesztelik az eredeti plazmamintákat QFT ELISA módszerrel. Ha az első vagy második replikátum ismételt tesztelése pozitív eredményt mutat, a vizsgálat eredménye pozitív.

² A klinikai tanulmányok résztvevőinek kevesebb, mint 0,25 %-nál fordult elő, hogy a Nil kontroll során az IFN- γ -koncentrációjuk > 8,0 NE/ml volt.

³ A lehetséges okok megállapításához ld. a Hibaelhárítás című fejezetet.

A mért IFN- γ szint nem függ össze a fertőzés fázisával vagy fokával, az immunválasz-készség mértékével, vagy azzal, hogy mekkora a súlyosbodás valószínűsége aktív megbetegedésben.

3. ÁBRA A kiértékelés folyamatábrája NIL és TB ANTIGÉN csövek alkalmazása esetén



NIL, TB ANTIGÉN ÉS MITOGEN CSÖVEK ALKAMAZÁSA ESETÉN:

| <u>Nil</u> [NE/ ml] | <u>Tb Antigen mínusz Nil</u> [NE/ml] | <u>Mitogen mínusz Nil</u> [NE/ ml] ¹ | QFT eredmény | Vélemény/Értékelés |
|------------------------|---|--|------------------------------------|---|
| ≤ 8,0 | < 0,35 | ≥ 0,5 | negatív | <i>M. tuberculosis</i> fertőzés NEM valószínű |
| | ≥ 0,35 és < 25% Nil érték | ≥ 0,5 | | |
| | ≥ 0,35 és ≥ 25% Nil érték | bármennyi | pozitív ² | <i>M. tuberculosis</i> fertőzés valószínű |
| | < 0,35 | < 0,5 | nem egyértelmű ³ | A Tb Antigen reakció eredményei nem egyértelműek |
| | ≥ 0,35 és < 25% Nil érték | < 0,5 | | |
| > 8,0 ⁴ | bármennyi | bármennyi | | |

¹ A pozitív Mitogen kontrollra (és esetenként Tb Antigenre) kialakult reakció gyakran a mikrotitráló lemez olvasó mérésstartományán kívül esik. Ennek azonban nincsen kihatása a teszteredményekre.

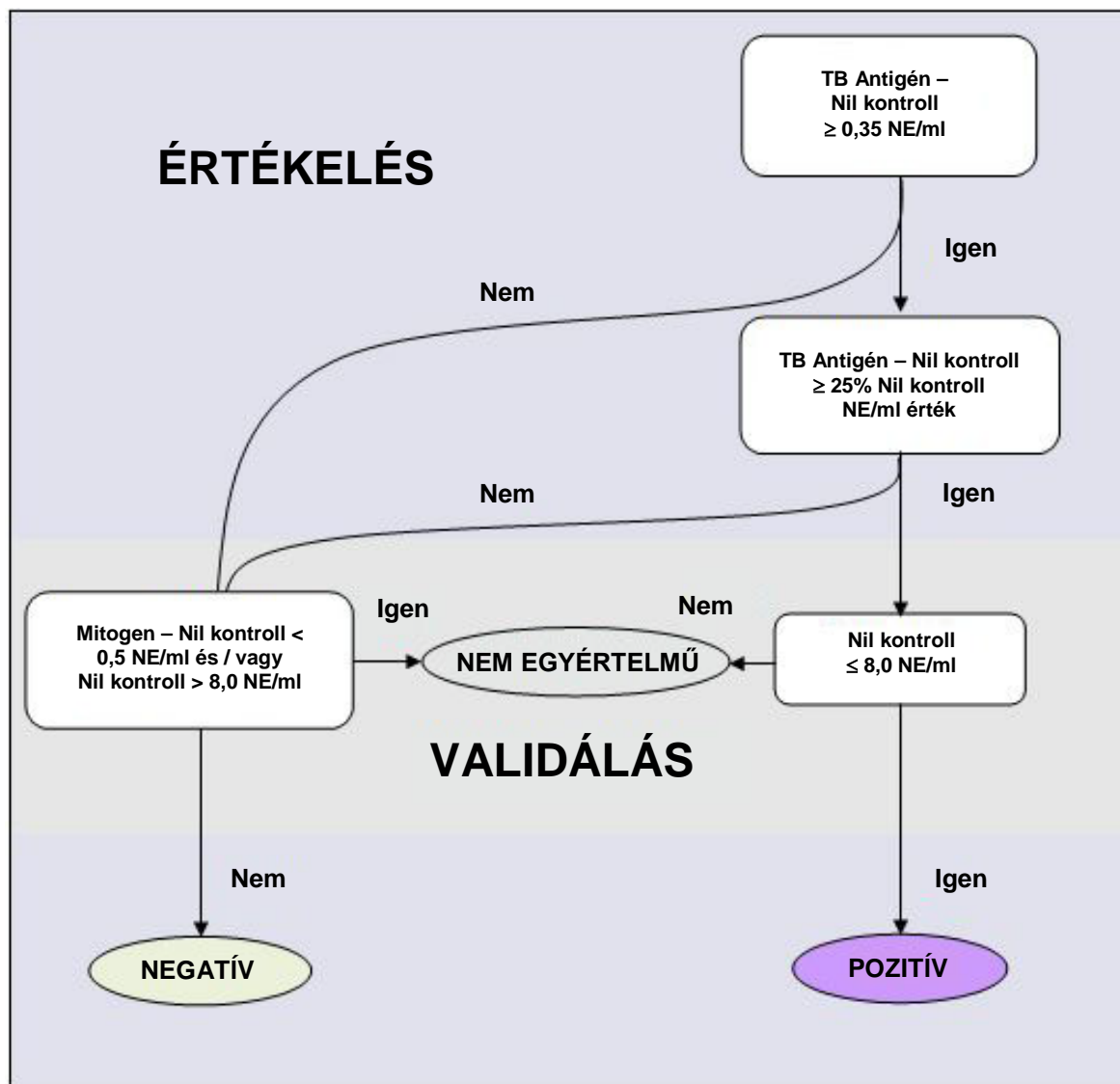
² Amikor *M. tuberculosis* fertőzést nem feltételeznek, a kezdeti pozitív eredményeket úgy lehet megerősíteni, hogy duplikátumban újra tesztelik az eredeti plazmamintákat QFT ELISA módszerrel. Ha a megismételt tesztnél az egyik vagy mindkét replikátum pozitív, a vizsgálat eredménye pozitív.

³ A lehetséges okok megállapításához ld. a Hibaelhárítás című fejezetet.

⁴ A klinikai tanulmányok résztvevőinek kevesebb, mint 0,25 %-nál fordult elő, hogy a Nil kontroll során az IFN- γ -koncentrációjuk > 8,0 NE/ml volt.

A mért IFN- γ szint nem függ össze a fertőzés fázisával vagy fokával, az immunválasz-készség mértékével, vagy azzal, hogy mekkora a súlyosbodás valószínűsége aktív megbetegedésben.

4. ÁBRA: A kiértékelés folyamatábrája NIL, TB ANTIGÉN és MITOGEN csövek alkalmazása esetén



8. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

A QFT teszt eredményeit minden egyes betegnél annak kórtörténetével, aktuális egészségi állapotával és az egyéb diagnosztikai vizsgálatok eredményeivel együtt kell értékelni.

Azoknak az egyéneknek az eredményeit, akiknél a Nil értékek 8 NE/ml-nél magasabbak voltak, a “nem egyértelmű” csoportba kell sorolni, mivel a Tb antigének elleni reakció 25%-os emelkedése esetén az IFN- γ szint a vizsgálat méréstartományán kívül eshet.

A nem megbízható vagy nem egyértelmű eredmények oka a következő lehet:

- eltérés a használati útmutatóban leírt eljárástól
- a keringő IFN- γ koncentrációja túl magas, vagy heterofil antitestek vannak jelen
- a mintavétel és a 37 °C-os inkubálás között 16 óránál több idő telt el

9. MŰKÖDÉSI JELLEMZŐK

Klinikai vizsgálatok

Mivel a látens tuberculosis fertőzés (LTBI) kimutatására nincs általánosan elfogadott vizsgálat, a QFT teszt esetében gyakorlatilag nem lehet megadni pontos szenzitivitást és specifitást. A QFT esetében a specifitás közelítő értékét úgy adták meg, hogy meghatározták az álpozitív eredményeket azoknál a személyeknél, akiknél alacsony volt a tuberculosis fertőzés kockázata (akiknél nem volt ismert kockázati tényező). A szenzitivitás közelítő értékét olyan betegcsoportok vizsgálata alapján adták meg, amelyekben tenyésztéssel bizonyították az aktív Tb-fertőzés jelenlétét.

Specifitás

Az Egyesült Államokban 866 önkéntest vontak be egy vizsgálatba; a résztvevőktől a TST (tuberculin bőrteszt) végzésekor vették le a vért a QFT teszthez. A demográfiai adatokat és a Tb kockázati tényezőit a teszt elvégzésével egyidőben standardizált kérdőívvel vették fel. Abból a 432 önkéntesből, akiknél nem álltak fenn a *M. tuberculosis* fertőzés kockázati tényezői, 391 személy esetében állt rendelkezésre a QFT eredménye mellett a TST vizsgálat eredménye is. Egyik önkéntes sem kapott BCG oltást. Egy második QFT teszt specifitását meghatározó vizsgálatra Japánban került sor, olyan egyéneknél, akiknél kicsi volt a betegség kockázat, és akiknek kb. 90 % kapott előzőleg BCG oltást. A két specifitásvizsgálat eredményét a 2. számú táblázat ábrázolja.

2. táblázat: A QFT teszt specifitása olyan személyeknél, akiknél nem álltak fenn a *M. tuberculosis* fertőzés kockázati tényezői.

| VIZSGÁLAT | BCG státusz % beoltottak száma | Vizsgált egyének összesen | Nem egyértelmű eredményű QFT vizsgálatok | QFT pozitív / érvényes tesztek száma | QFT specifitás (95% CI) | THT pozitív / vizsgált egyének száma | THT* specifitás (95% CI) |
|---------------------|--------------------------------|---------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| USA (nem publikált) | 0% | 391 | 1 | 3 / 390 | 99.2% (98-100) | 6 / 391 | 98.5% (97-99) |
| Japán ¹⁵ | ~90% | 168 | 6 | 2 / 162 | 98.8% (95-100) | - | - |
| ÖSSZESEN | - | 559 | 7/559 (1.3%) | 5 / 552 | 99.1% (98-100) | - | - |

(* Ha a TST határérték nem BCG-oltott egyéneknél 10mm.)

A THT specifitás becslést értéke 15 mm-es határérték esetén 99,1%.

Szenzitivitás aktív Tb-ben

A QFT teszt szenzitivitását olyan amerikai, ausztrál és japán Tb-gyanús egyéneknél határozták meg, akiknél egyidejűleg tenyésztéssel igazolták a *M. tuberculosis* fertőzés fennállását. Bár a látens tuberculosis fertőzés (LTBI) kimutatására nincs általánosan elfogadott vizsgálat, a *M. tuberculosis* tenyésztés eredménye alapján ezek a betegek egyértelműen fertőzöttek. A betegeknek a QFT teszt végzése előtt legfeljebb 8 napig tartott a kezelés.

A 3. számú táblázat a három, tenyésztés alapján *M. tuberculosis* betegcsoport esetében kapott eredményeket összegzi. Aktív Tb fennállása esetén a QFT vizsgálat összesített szenzitivitása 89% (157/177) volt.

3. táblázat: A QFT vizsgálat szenzitivitása tenyésztés alapján *M. tuberculosis* fertőzöttnek bizonyult egyéneknél

| VIZSGÁLAT | QFT pozitív / érvényes tesztek száma | QFT szenzitivitás (95% CI) |
|--------------------------------|--|-------------------------------|
| Japán Tb betegek ¹⁵ | 86 / 92 | 93% (86-97%) |
| Ausztrálieiak | 24 / 27 | 89% (70-97%) |
| USA | 47 / 58 | 81% (68-90%) |
| ÖSSZESEN | 157 / 177 | 89% (83-93%) |

*CI = konfidencia intervallum

LTBI diagnózis

Magas LTBI kockázatú populációk esetében számos, a QFT minőségi jellemzőivel kapcsolatos vizsgálatot publikáltak. A 4. számú táblázat néhány vizsgálat főbb eredményeit foglalja össze.

4. táblázat: Néhány publikált vizsgálat a magas LTBI kockázatú populációkban végzett QFT teszttel kapcsolatosan

| VIZSGÁLAT | Vizsgált egyének összesen | Eredmények és leletek |
|--|---------------------------------|--|
| indiai HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶ | 726 | Nagyon magas Tb előfordulási arány, 40% QFT pozitív, míg a TST pozitív eredmények aránya 41% 10mm-es határértéknél. Nagymértékű egyezés a TST-vel, a BCG oltásnak egyik tesztben sincs hatása. Mindkét teszt alapján kockázati tényező az életkor és az egészségügyben eltöltött idő. |
| dán HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵ | 590 | Az LTBI összes előfordulása QFT alapján 4.6% (27/590) HIV ⁺ betegekben. A pozitív eredmények összefüggnek a Tb kockázati tényezőivel. Két QFT pozitív betegnél 1 éven belül kialakult az aktív Tb. Nem egyértelmű reakciók (n=20; 3,4%) szignifikánsan kis CD4 szám (<100 / μ l) mellett léptek fel. |
| kórházban kezelt gyermekek Dogra <i>et al</i> 2006) ¹² | 105 | Tb gyanús vagy anamnézis alapján Tb-s személlyel érintkező gyermeknél QFT és TST tesztet végeztek. A QFT teszt pozitív volt 10,5%-ban, a TST pozitív 9,5%-ban (10mm-nél). A tesztek közötti egyezés összesen 95,2% volt, ezen belül 100% azoknál, akik nem kaptak BCG oltást. |
| német kontakt személyek (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹ | 309 | 15 különböző esetben közeli kontakt személyeket vizsgáltak. 51% kapott korábban BCG oltást, 27% külföldi születésű volt. 70% a BCG oltottak közül és 18% a nem beoltottak közül TST pozitív lett (5mm), míg 9% ill. 11% lett QFT pozitív. A QFT-Gold IT eredménye összefügg a Tb kockázatával. A TST eredménye csak a BCG oltással függ össze. |

Sok egyéb publikáció a QFT teszt mellett QuantiFERON[®]-TB Gold teszt minőségi jellemzőit írja le. Ez a QFT előtti, kevésbé érzékeny, szolubilis antigén változat. Ezek a tanulmányok a tesztek alkalmazását a következő csoportokban is vizsgálják: aktív Tb-s betegekkel érintkező személyek^{9,11, 19, 25}, gyermekek^{6-10, 25, 28}, HIV pozitív betegek^{2, 5, 20}, egészségügyben dolgozók^{13, 26, 32}, immunszuppresszált személyek^{3, 4, 22, 23, 27, 30, 31}, Tb gyanús személyek^{7, 8, 10, 18} és alacsony kockázatú egyének¹⁵.

A TST teszt reprodukálhatósága és hatása a későbbi QFT teszt eredményre

Az Egyesült Államokban végzett specifitás-vizsgálat részeként az önkéntesek egy alcsoportját 4-5 héttel az eredeti QFT és a THT teszt után újra vizsgálták. 260 sorkatonára esetében a QFT teszteredménye mindkét időpontban rendelkezésre állt, az eredmények 99,6%-ban megegyeztek (259/260). Az előzőleg elvégzett TST nem váltott ki pozitív QFT választ.

10. TECHNIKAI INFORMÁCIÓ

Nem egyértelmű eredmények

Nem egyértelmű eredményeket csak ritkán szabadna kapni, és a következő technikai tényezők okozhatják:

- A max. 16 órás határidő átlépése a vérvétel és a 37 °C-os inkubálás között
- A vérminták javasolt hőmérséklet-tartományon (22°C ± 5°C) kívüli tárolása
- A vérvételi csövek tartalmának nem megfelelő megkeverése
- Az ELISA lemez nem megfelelő mosása

Ha a vérvétellel, vagy a vérminták kezelésével kapcsolatosan technikai probléma gyanúja merül fel, a teljes QFT tesztet új vérmintán meg kell ismételni. A stimulált plazmaminták ELISA tesztjét meg lehet ismételni, ha felmerül a gyanú, hogy a mosás nem volt megfelelő, vagy az ELISA eljárástól egyéb módon eltértek. Az alacsony Mitogen vagy magas Nil értékekből eredő nem egyértelmű eredmények a teszt megismétlésével nem változhatnak, hacsak valamiféle hiba nem történt az ELISA vizsgálat során. A nem egyértelmű eredményeket, mint olyanokat kell továbbítani. Az orvos majd eldöntheti, hogy új vérmintát vesznek, vagy pedig szükség szerint egyéb eljárásokat alkalmaznak.

Alvadékos plazmaminták

Ha a plazmaminták hosszabb tárolása során fibrinrögök keletkeznének, centrifugálja le a mintákat üledékképződésig, ez megkönnyíti a plazma pipettázását.

ELISA hibaelhárítás

Aspecifikus színreakció

| LEHETSÉGES OK | MEGOLDÁS |
|--|--|
| A lemezek nem megfelelő mosása | Mossa a lemezt legalább 6-szor 400 µl mosó pufferrel mintahelyenként. A használt mosókészüléktől függően lehet, hogy több mint 6 mosási ciklusra van szükség. Javasoljuk, hogy a ciklusok között tartsa be az 5 másodperces áztatási időt. |
| Az ELISA mintahelyek keresztszennyeződése | A gondos pipettázás és a minták alapos megkeverése minimalizálja a kockázatot. |
| A készlet ill. komponenseinek szavatossága lejárt | Ellenőrizze, hogy a reagenskészlet szavatossági ideje még nem járt le. Gondoskodjon róla, hogy a Standard és a 100x tömény konjugátum a rekonstituálást követő 3 hónapon belül fel legyen használva. |
| Az enzim szubsztrát oldat szennyezett | Távolítsa el a szubsztrátumot, ha kékes elszíneződés mutatkozik. Gondoskodjon róla, hogy csak tiszta reagenstároló edényeket használjanak. |
| A plazma keveredése a centrifugában a leválasztás előtt. | Gondosan vegye le a géldugó felett elhelyezkedő plazmát (le-fel pipettázás nélkül és mellőzve a gél felszínén elhelyezkedő anyag megsértését). |

Alacsony OD értékek a standardoknál

| LEHETSÉGES OK | MEGOLDÁS |
|---|--|
| Hiba a Standard hígításában | A Kit Standard hígítását szigorúan a használati útmutató utasításai szerint kell végezni. |
| Pipettázási hiba | Gondoskodjon róla, hogy a pipettákat a gyártó útmutatása szerint kalibrálják és használják. |
| Az inkubálási hőmérséklet túl alacsony | Az ELISA inkubálást szobahőmérsékleten (17°C -27°C) kell végezni. |
| Az inkubálási idő túl rövid | A konjugátumot, standardokat és mintákat tartalmazó lemezeket 120 ± 5 percig kell inkubálni. Az enzim szubsztrát oldatot a lemezen 30 percig kell inkubálni. |
| Téves lemez-szűrő | A lemezt 450 nm-en kell leolvasni, 620-650 nm közötti referenciaszűrővel. |
| A reagensek túl hidegek | Minden reagenst (a 100x tömény konjugátum kivételével) szobahőmérsékletre kell hagyni felmelegedni a vizsgálat megkezdése előtt. Ez kb. 60 percet vesz igénybe. |
| A készlet ill. komponenseinek szavatossága lejárt | Ellenőrizze, hogy a reagenskészlet szavatossági ideje még nem járt le. Gondoskodjon róla, hogy a Standard és a 100x tömény konjugátum a rekonstituálást követő 3 hónapon belül fel legyen használva. |

Magas háttérszíneződés

| LEHETSÉGES OK | MEGOLDÁS |
|---|--|
| A lemezek nem megfelelő mosása | Mossa a lemezt legalább 6-szor 400 µl mosó pufferrel mintahelyenként. A használt mosókészüléktől függően lehet, hogy több mint 6 mosási ciklusra van szükség. Javasoljuk, hogy a ciklusok között tartsa be az 5 másodperces áztatási időt. |
| Az inkubálási hőmérséklet túl magas | Az ELISA inkubálást szobahőmérsékleten (17°C -27°C) kell végezni |
| A készlet ill. komponenseinek szavatossága lejárt | Ellenőrizze, hogy a reagenskészlet szavatossági ideje még nem járt le. Gondoskodjon róla, hogy a Standard és a 100x tömény konjugátum a rekonstituálást követő 3 hónapon belül fel legyen használva.. |
| Az enzim szubsztrát oldat szennyezett | Távolítsa el a szubsztrátumot, ha kékes elszíneződés mutatkozik. Gondoskodjon róla, hogy csak tiszta reagenstároló edényeket használjanak. |

Nem lineáris standard görbe és eltérések e replikátumok között

| LEHETSÉGES OK | MEGOLDÁS |
|---|--|
| A lemezek nem megfelelő mosása | Mossa a lemezt legalább 6-szor 400 µl mosó pufferrel mintahelyenként. A használt mosókészüléktől függően lehet, hogy több mint 6 mosási ciklusra van szükség. Javasoljuk, hogy a ciklusok között tartsa be az 5 másodperces áztatási időt. |
| Hiba a Standard hígításában | A Kit Standard hígítását szigorúan a használati útmutató utasításai szerint kell végezni. |
| Elégtelen keverés | A reagenseket a lemezre adagolás előtt alaposan keverje meg forgatással vagy enyhe vortexeléssel. |
| Nem folyamatos pipettázás vagy a vizsgálati folyamat megszakítása | A minták és standardok adagolása folyamatosan történjen. Minden reagenst a vizsgálat megkezdése előtt elő kell készíteni. |

A vizsgálati eljárást és a legtöbb technikai probléma megoldását bemutató videó megtalálható a CD-ROM-on, amely a terméktájékoztatót és a műszaki útmutatót is tartalmazza. A CD-ROM beszerezhető közvetlenül a Cellestis-től vagy az Ön forgalmazójától.

11. IRODALOMJEGYZÉK

A QFT részletes irodalomjegyzéke a QFT referencia-könyvtárában, a gnowee™-ben található www.gnowee.net alatt.

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- 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.* 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. MŰSZAKI SZOLGÁLAT

Technikai ügyfélszolgálatunk a következő címeken érhető el:

Cellestis International Pty Ltd: Tel.: +61 3 8527 3500
 Fax: +61 3 9568 6623
 E-Mail: techsupport@cellestis.com

Cellestis GmbH: Tel.: +49 6151 428 59-0
 (Európa) Fax: +49 6151 428 59-110
 E-Mail: techsupport@cellestis.com

Website: www.cellestis.com

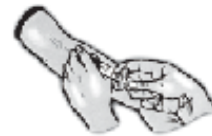
Egyéb országok

| Ország | Ingyenes hívószám |
|----------------|-------------------|
| Ausztrália | 9001 5776 |
| Ausztria | 0800 8020034 |
| Belgium | 0800 75351 |
| Franciaország | 0800911164 |
| Németország | 0800 182 7452 |
| Írország | 1800 550 417 |
| Hollandia | 0800 022 5340 |
| Új-Zéland | 0800 44240 |
| Svájc | 0800 561 802 |
| Nagy-Britannia | 0800 680 0630 |

13. VIZSGÁLATI ELJÁRÁS (RÖVIDEN)

1. LÉPÉS: A VÉRMINA INKUBÁLÁSA

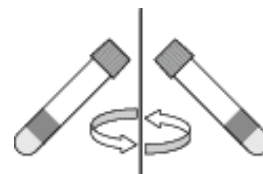
1. A beteg véré^t vegye le a vérvételi csövekbe és **rázza fel 10-szer éppen csak annyi erővel, hogy a vér a cső teljes belső felületével érintkezzen** és az antigének leolvadhassanak a cső faláról.



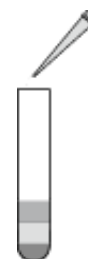
2. A csöveket **állítva** 16-24 órán keresztül inkubálja 37°C-on.



3. Az inkubálást követően centrifugálja a csöveket 5-15 percig 2000 - 3000g (RCF) fordulatszámon, hogy elkülönítse a plazmát a vörös vértestektől.



4. Centrifugálás után pipettával válasszuk le a plazmát. A leválasztás előtt legyünk óvatosak, és mindenképpen kerüljük a le-fel pipetázást, ill. a plazma keverését.



2. LÉPÉS: IFN- γ ELISA

1. Az ELISA komponenseket - a 100-szorosan tömény kivételével - legalább 60 percig hagyja szobahőmérsékleten stabilizálódni.

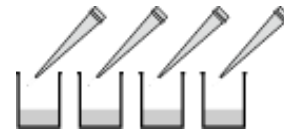


2. A Kit Standardot desztillált vagy ionmentes vízzel 8,0 NE/ ml-re oldja be és készítsen 4 Standard hígítási sort.

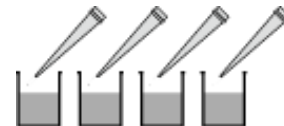


3. Oldja be a liofilizált, 100x tömény konjugátumot desztillált vagy ionmentes vízzel.

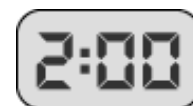
4. Készítse el a zöld hígító oldattal a konjugátumot és mérjen be 50 μ l-t minden mélyedésbe.



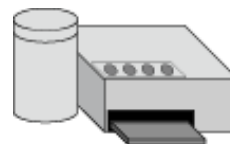
5. Mérjen be 50 μ l plazmamintát és 50 μ l standardot a megfelelő mélyedésekbe. Rázóval keverje meg.



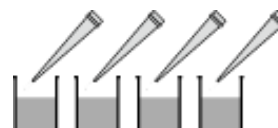
6. Inkubálja 120 percig szobahőmérsékleten.



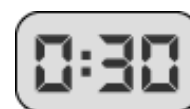
7. Mossa ki a bemélyedéseket legalább 6 x 400 μ l mosó pufferrel mintahelyenként.



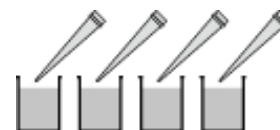
8. Adjon 100 μ l enzim szubsztrát oldatot minden mélyedésbe. Rázóval keverje meg.



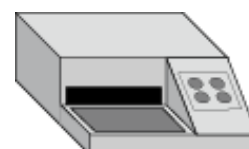
9. Inkubálja 30 percig szobahőmérsékleten.



10. Adjon 50 μ l stop reagenst minden bemélyedésbe. Rázóval keverje meg.



11. Olvassa le az eredményeket 450 nm-en a 620-650 nm-ig terjedő referenciaszűrő alkalmazásával.



12. Értékelje ki az eredményeket.



14. FONTOS MÓDOSÍTÁSOK

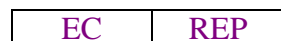
A QFT használati útmutató ezen kiadásának (05990301G- 2011. július) fontos módosításait a következő táblázat mutatja:

| Fejezet | Oldal | Módosítás |
|-----------------------------|--------------|---|
| 5. Minta vétele és kezelése | 9 | A rázás módjának változtatása |
| 6. Alkalmazási útmutató | 10 | A vérvételi csövek kezelési útmutatójának módosítása |
| 6. Alkalmazási útmutató | 12 | A plazmaminták kezelési útmutatójának módosítása |
| 10. Technikai információ | 23 | Kiegészítés: „A plazma keveredése a centrifugában a leválasztás előtt.” |
| 12. Műszaki szolgálat | 26 | A műszaki szolgálat új e-mail címe |



Készült a:
Cellestis Limited (Ausztrália) és Cellestis GmbH (Európa)
Level 1, Office Tower 2, Chadstone Centre
1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Ausztrália
Tel. (Ausztrália) +61 3 8527 3500
számára.
(Európa) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Weboldal: www.cellestis.com

Dok.-sz. 05990301G
2011. július



Felhatalmazott képviselő:
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Németország