

# ***QuantiFERON<sup>®</sup>-TB*** **Gold** ***(In-tube)***

Test IFN-gamma  
z plné krve hodnotící reakci na  
peptidové antigeny ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4)

PŘÍBALOVÝ  
LETÁK

Pro diagnostické použití *In Vitro*



## OBSAH

1. POUŽITÍ	2
2. SHRNUTÍ A VYSVĚTLENÍ TESTU	2
Princip metody	3
Doba potřebná k provedení testu	3
3. ČINIDLA A SKLADOVÁNÍ	4
Potřebné materiály (které nejsou součástí dodávky)	4
Pokyny k skladování	5
Zkumavky na odběr krve	5
Činidla soupravy	5
Rekonstituovaná a nepoužitá činidla	5
4. VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ	6
Varování	6
Upozornění	7
5. ODBĚR VZORKŮ A MANIPULACE S NIMI	8
6. POKYNY K POUŽITÍ	9
STUPEŇ JEDNA – Inkubace krve a odběr plazmy	9
STUPEŇ DVĚ – ELISA lidského IFN- $\gamma$	10
7. VÝPOČTY A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	13
Tvorba standardní křivky	13
Kontrola kvality testu	14
Interpretace výsledků	15
8. OMEZENÍ	19
9. FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY	19
10. TECHNICKÉ INFORMACE	21
Nevýpovědní výsledky	21
Vzorky sražené plazmy	21
Odstraňování problémů při vyšetření ELISA	22
Vznik nespecifického zbarvení	22
Nízké hodnoty absorbance u standardů	22
Vysoký šum pozadí	23
Nelineární standardní křivka a variabilita duplikátu	23
11. LITERATURA	24
12. TECHNICKÁ PODPORA	25
13. ZKRÁCENÝ POSTUP TESTU	26

## 1. POUŽITÍ

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) je diagnostický test *in vitro*, který ke stimulaci buněk v heparinizované plné krvi používá směs peptidů simulujících ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4). K identifikaci *in vitro* odezvy na tyto peptidové antigeny, které jsou spojovány s infekcí *Mycobacterium tuberculosis*, se využívá detekce interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) enzymovou imunoanalýzou (ELISA).

Test QuantiFERON®-TB Gold IT je nepřímý test k hodnocení infekce *M. tuberculosis* (včetně onemocnění) a je určen pro použití společně s hodnocením rizika radiodiagnostikou a dalšími klinickými a diagnostickými vyšetřeními.

## 2. SHRUTÍ A VYSVĚTLENÍ TESTU

Tuberkulóza je přenosné onemocnění způsobené infekcí komplexem mikroorganismů *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), která se obvykle šíří na nové hostitele kapénkovým přenosem od pacientů s tuberkulózou respiračního ústrojí. Nově infikovaný jedinec může onemocnět tuberkulózou během týdnů až měsíců, ale u většiny infikovaných osob klinické onemocnění nepropukne. Latentní infekce tuberkulózou (LTBI) je nepřenositelné asymptomatické onemocnění, které u některých jedinců perzistuje a může se rozvinout do onemocnění tuberkulózou o několik měsíců či let později. Hlavním účelem stanovení diagnostiky LTBI je zhodnotit možnosti léčby při prevenci klinického onemocnění tuberkulózou. Do nedávné doby byl jediným způsobem diagnostiky LTBI tuberkulinový kožní test (tuberculin skin test – TST). Kožní senzitivita vůči tuberkulinu se objevuje 2 až 10 týdnů po infekci. Někteří infikovaní jedinci, například pacienti s řadou onemocnění postihujících imunitní funkce, ale i jinak zdraví lidé, nemusí na tuberkulin zareagovat. Naopak některé osoby, u nichž je velmi nepravděpodobná infekce *M. tuberculosis*, mají senzitivitu vůči tuberkulinu a mají pozitivní výsledky testu TST po vakcinaci kalmetizační vakcínou Bacillus Calmette-Guérin (BCG), infekci mykobakteriemi jinými než *M. tuberculosis* komplex nebo z jiných, neznámých příčin.

LTBI je nutné odlišit od onemocnění tuberkulózou, což je onemocnění podléhající povinnému hlášení, které obvykle postihuje plíce a dolní dýchací cesty, ačkoliv může postihovat i jiné orgánové systémy. Onemocnění tuberkulózou se diagnostikuje na základě anamnestických údajů a vyšetření fyzikálního, radiodiagnostického, histologického a mykobakteriologického.

Test QuantiFERON®-TB Gold IT hodnotí odezvu buňkami zprostředkované imunity (Cell Mediated Immunity – CMI) na peptidové antigeny, které simulují mykobakteriální proteiny. Tyto proteiny, ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4), chybějí ve všech kmenech BCG a ve většině netuberkulózních mykobakterií s výjimkou *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum*.<sup>1</sup> Osoby infikované mikroorganismem *M. tuberculosis* komplex mají obvykle ve své krvi lymfocyty, které tyto a další mykobakteriální antigeny rozpoznají. Součástí tohoto procesu rozpoznání je tvorba a sekrece cytokinu IFN- $\gamma$ . Detekce a následná kvantifikace IFN- $\gamma$  je základem tohoto testu.

Antigeny použité v testu QuantiFERON®-TB Gold IT jsou peptidová směs napodobující proteiny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4). Řada studií prokázala, že tyto peptidové antigeny stimulují odezvu IFN- $\gamma$  v T-buňkách osob infikovaných *M. tuberculosis*, obvykle nikoliv u neinfikovaných osob nebo osob vakcinovaných BCG bez onemocnění nebo rizika LTBI.<sup>1-32</sup> Na druhé straně odezvu IFN- $\gamma$  mohou potenciálně snížit léky či onemocnění, které porušují funkci imunitního systému. Vůči antigenům ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4) mohou také reagovat pacienti s některými jinými mykobakteriálními infekcemi, neboť geny kódující tyto proteiny jsou obsaženy v *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum*.<sup>1,23</sup> Test QuantiFERON®-TB Gold IT umožňuje testování LTBI a současně je užitečnou pomůckou při diagnostice infekce *M. tuberculosis* komplex u klinicky nemocných osob. Pozitivní výsledek testu podporuje diagnózu tuberkulózního onemocnění, pozitivní výsledek však mohou vykazovat i jiné mykobakteriální infekce (např. *M. kansasii*). Proto pro potvrzení či vyloučení onemocnění tuberkulózou je nutné provést další klinická a diagnostická vyšetření.

## **Princip metody**

Systém QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT využívá specializované krevní zkumavky, které se použijí k odběru plné krve. Ve zkumavkách se provádí inkubace krve po dobu 16-24 hodin, po které se odebere plazma a vyšetří na přítomnost IFN- $\gamma$  vzniklého v reakci na peptidové antigeny.

Test QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT se provádí ve dvou krocích. Nejprve se odebere plná krev do každé z odběrových krevních zkumavek QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold, které tvoří zkumavka s nulovou kontrolou, zkumavka s antigenem TB a nepovinná zkumavka s mitogenem.

Zkumavku s mitogenem lze v testu QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT použít jako pozitivní kontrolu. To může být obzvláště vhodné v situacích, kdy máme pochybnosti o imunitním stavu vyšetřovaného pacienta. Zkumavka s mitogenem může také sloužit jako kontrola správně provedené manipulace a inkubace krevního vzorku.

Zkumavky se musí inkubovat při teplotě 37°C co nejdříve, nejpozději však do 16 hodin od odběru. Po 16 až 24 hodinách inkubace se zkumavky zcentrifugují, plazma se odstraní a metodou ELISA se vyšetří množství přítomného IFN- $\gamma$  (IU/ml).

Výsledek testu je pozitivní v případě, že reakce IFN- $\gamma$  ve zkumavce TB antigenu je významně vyšší než hodnota IFN- $\gamma$  IU/ml v nulové kontrole. Pokud použijete mitogenem stimulovaný plazmatický vzorek, lze jej použít jako pozitivní kontrolu IFN- $\gamma$  pro každý vyšetřený vzorek. Nízká reaktivita na mitogen (<0,5 IU/ml) ukazuje nevýpovědní výsledek v případě, že krevní vzorek má také negativní reakci na antigeny TB. Tento stav se objevuje při nedostatečném počtu lymfocytů, ve snížené aktivitě lymfocytů v důsledku nesprávné manipulace se vzorkem, nesprávnému plnění/míchání zkumavky s mitogenem, nebo nedostatečnou schopností lymfocytů daného pacienta vytvářet IFN- $\gamma$ . Nulový vzorek koriguje vliv heterofilních protilátek<sup>7</sup> a nespecifický IFN- $\gamma$  v krevních vzorcích. Koncentrace IFN- $\gamma$  ve zkumavce s nulovou kontrolou se odečítá od koncentrace IFN- $\gamma$  ve zkumavce s TB antigenem a zkumavce s mitogenem (je-li použita).

## **Doba potřebná k provedení testu**

Doba potřebná k provedení testu QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT je uvedena v dalším textu, je uvedena také doba současného vyšetření většího počtu vzorků ve skupinách:

Inkubace zkumavek s krví při teplotě 37°C: 16 až 24 hodin

ELISA: Přibližně 3 hodiny pro jednu destičku ELISA (28 až 44 osob)

- <1 hodina práce
- Pro každou další destičku přidejte 10 až 15 minut

### 3. ČINIDLA A SKLADOVÁNÍ

#### Zkumavky pro odběr krve s antigenem tuberkulózy a kontrolou

##### Katalogové číslo 0590 0301

- |                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| 1. Nulová kontrola (šedý kryt)        | 100 zkumavek |
| 2. TB Antigen (červený kryt)          | 100 zkumavek |
| 3. Mitogenová kontrola (fialový kryt) | 100 zkumavek |

**POZNÁMKA:** Zkumavky jsou také k dispozici v jiných konfiguracích:

**Kat. č. 0590 0201:** 100 x nulových kontrol, 100 zkumavek s TB antigenem.

**Kat. č. 0593 0201:** 100 x zkumavky s mitogenovou kontrolou.

##### Zkumavky pro vysokou nadmořskou výšku (viz oddíl 5)

**Kat. č. 0590 0501:** (vysoká nadmořská výška) 100 x nulová kontrola, 100 x TB antigen.

**Kat. č. 0590 0505:** (vysoká nadmořská výška) 100 x nulová kontrola, 100 x TB antigen & 100 x mitogen.

**Kat. č. T0593 0501** (vysoká nadmořská výška) 100 x zkumavek s mitogenovou kontrolou.

#### Součásti setu ELISA

##### Katalogové číslo 0594 0201

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. Stripy pro mikrotitrační destičku               | 24 x 8 jamek |
| 2. Standard lidského IFN- $\gamma$ , lyofilizovaný | 1 x lahvička |
| 3. Zelený pufr (Diluent)                           | 1 x 30 ml    |
| 4. Konjugát, 100x koncentrát lyofilizovaný         | 1 x 0,3 ml   |
| 5. 20x koncentrát promývacího pufru                | 1 x 100 ml   |
| 6. Roztok s enzymovým substrátem                   | 1 x 30 ml    |
| 7. Enzymatický zastavovací roztok                  | 1 x 15 ml    |

#### Potřebné materiály (které nejsou součástí dodávky)

- Inkubátor 37°C, CO<sub>2</sub> není nutný.
- Kalibrované pipety s nastavovacím objemem pro aplikaci 10  $\mu$ l až 1000  $\mu$ l s jednorázovými špičkami.
- Kalibrovaná vícekanálová pipeta k aplikaci 50  $\mu$ l a 100  $\mu$ l s jednorázovými špičkami.
- Třepačka mikrotitračních destiček.
- Demineralizovaná nebo destilovaná voda – 2 l.
- Promývačka mikrotitračních destiček (doporučuje se automatická promývačka).
- Čtečka mikrotitračních destiček vybavená filtrem 450nm a referenčním filtrem 620nm až 650nm.

## **Pokyny k skladování**

### *Zkumavky pro odběr krve*

- Skladujte zkumavky pro odběr krve při teplotě 4°C až 25°C.
- Doba použitelnosti zkumavek pro odběr krve soupravy QuantiFERON®-TB Gold je 15 měsíců ode dne výroby, jsou-li skladovány při teplotě 4°C to 25°C.

### *Činidla soupravy*

- Skladujte soupravu při teplotě 2°C až 8°C.
- Vždy chraňte roztok enzymového substrátu před přímým slunečním světlem.
- Doba použitelnosti soupravy ELISA QuantiFERON®-TB Gold IT je 3 roky ode dne výroby, pokud je skladována při teplotě 2°C až 8°C.

### *Rekonstituovaná a nepoužitá činidla*

Pokyny o způsobu rekonstituce činidel viz oddíl 6 (strana 11).

- Rekonstituovaný standard soupravy lze uchovávat po dobu 3 měsíců při teplotě 2°C až 8°C.
  - *Zaznamenejte datum rekonstituce standardu soupravy.*
- Po rekonstituci je nutné nepoužitý 100x koncentrát konjugátu uložit na místo skladování s teplotou 2°C až 8°C a je nutné jej také použít do 3 měsíců.
  - *Zaznamenejte si datum rekonstituce konjugátu.*
- Konjugát o pracovní koncentraci je nutné použít během 6 hodin od přípravy.
- Promývací pufr o pracovní koncentraci lze skladovat při pokojové teplotě po dobu až 2 týdnů.

## 4. VAROVÁNÍ A UPOZORNĚNÍ

### Varování

- Negativní výsledek testu QuantiFERON®-TB Gold IT nevylučuje možnost infekce *M. tuberculosis* nebo onemocnění tuberkulózou: falešně negativní výsledky mohou být způsobeny stádiem infekce (např. vzorek získaný před rozvojem odezvy buněčné imunity), souběžnými chorobami, které ovlivňují imunitní stav organismu, nesprávnou manipulací se zkumavkami pro odběr krve po odběru krve, nesprávné provedení metody nebo jiné imunologické proměnné faktory.
- Pozitivní výsledek testu QuantiFERON®-TB Gold IT nesmí být jediným nebo základním důvodem pro stanovení diagnózy infekce *M. tuberculosis*. Při nesprávném provedení metody se mohou objevit falešně pozitivní výsledky.
- Pozitivní výsledek testu QuantiFERON®-TB Gold IT musí být provázen dalším klinickým vyšetřením a diagnostickým hodnocením k diagnostice aktivní tuberkulózy (např. sěr a kultivace AFB, rentgen hrudních orgánů).
- Ačkoliv antigeny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7(p4) chybějí u všech kmenů BCG a u většiny známých netuberkulózních mykobakterií, je možné, že pozitivní výsledek testu QuantiFERON®-TB Gold IT může být způsobem infekcí *M. kansasii*, *M. szulgai* nebo *M. marinum*. V případě podezření na tyto infekce je nutné provést alternativní testy.

## Upozornění

- **K diagnostickému použití in vitro.**
- **Nebezpečné: Roztok enzymového substrátu** obsahuje 3,3',5,5' tetramethylbenzidin, který je škodlivý při požití, inhalaci nebo kontaktu s kůží. Dráždí kůži a oči. Mutagen. Používejte ochranu očí, rukavice a manipulujte jako s potenciálním karcinogenem.
- **Škodlivé: Enzymatický zastavovací roztok** obsahuje H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, která je škodlivá při požití, očním kontaktu, kontaktu s kůží a inhalaci. Používejte ochranu očí, rukavice a obvyklý laboratorní ochranný oděv. V případě, že se zastavovací roztok dostane do kontaktu s kůží nebo očima, vypláchněte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc.
- **Škodlivé: Standard IFN-γ a 100x koncentrát konjugátu** mohou po požití vyvolávat zažívací potíže a mohou způsobit podráždění kůže. Používejte rukavice a obvyklý laboratorní ochranný oděv.
- **S lidskou krví zacházejte jako s potenciálně infekčním materiálem.** Dodržujte příslušná doporučení pro manipulaci s krví.
- U některých činidel se jako konzervační přísada používá **Thiomersal**. Tato látka při požití, inhalaci nebo kontaktu s kůží může mít toxické účinky.
- **Zelený pufr (Diluent)** obsahuje normální myší sérum a kasein, které mohou spouštět alergické reakce, zabraňte kontaktu s kůží.
- Nedodržení pokynů uvedených v příbalovém letáku může vést k chybným výsledkům. Před použitím si pečlivě přečtěte pokyny.
- Soupravu nepoužívejte, pokud je jakákoli lahvička s činidlem poškozená, nebo netěsní před použitím.
- Nemíchejte nebo nepoužívejte činidla ELISA z jiných šarží souprav QuantiFERON®-TB Gold.
- Nepoužitá činidla a biologické vzorky likvidujte v souladu s místními, státními a federálními předpisy.
- Nepoužívejte zkumavky k odběru krve nebo soupravu ELISA po uplynutí doby použitelnosti.

## 5. ODBĚR VZORKU A MANIPULACE S NÍM

Souprava QuantiFERON®-TB Gold IT používá následující zkumavky pro odběr vzorku:

1. Nulová kontrola (šedý kryt s bílým kroužkem) (použití do výšek 810 m n.m.).
2. TB Antigen (červený kryt s bílým kroužkem) (použití do výšek 810 m n.m.).
3. Mitogenová kontrola – volitelné (fialový kryt s bílým kroužkem) (použití do výšek 810 m n.m.).
4. Nulová kontrola (šedý kryt se žlutým kroužkem) (použití ve výškách od 1.020 po 1.875 m n.m.).
5. TB Antigen (červený kryt se žlutým kroužkem) (použití ve výškách od 1.020 po 1.875 m n.m.).
6. Mitogenová kontrola – volitelné (fialový kryt se žlutým kroužkem) (použití ve výškách od 1.020 po 1.875 m n.m.).

Antigeny jsou přischlé na vnitřní stěnu zkumavek pro odběr krve, proto je nezbytné obsah zkumavek důkladně promíchat s krví. Zkumavky je nutné vložit co nejdříve do inkubátoru s teplotou 37°C, nejpozději do 16 hodin od odběru krve.

Pro dosažení optimálních výsledků je nutné dodržet následující kroky:

1. U každého vyšetřovaného pacienta odeberte 1 ml krve venepunkcí přímo do jednotlivých zkumavek pro odběr krve soupravy QuantiFERON®-TB Gold IT.
  - V nadmořských výškách do 810 metrů použijte standardní zkumavky pro odběr krve QuantiFERON®. V nadmořských výškách nad 1020 metrů je nutné používat zkumavky pro odběr krve ve vysoké nadmořské výšce (High Altitude – HA) soupravy QuantiFERON®.

*Pokud používáte zkumavky pro odběr krve QuantiFERON® mimo tyto nadmořské výšky, nebo pokud se vyskytne při odběru malý tok krve, můžete krev natáhnout stříkačkou a 1 ml krve vždy dodat ručně do každé ze tří zkumavek. Z bezpečnostních důvodů k tomu nejlépe odstraňte jehlu stříkačky – dodržujte při tom odpovídající bezpečnostní postupy, odstraňte kryty tří zkumavek QFT-Gold IT a doplňte 1 ml krve do každé (po černou rysku na straně štítku zkumavky). Zkumavky zase pečlivě uzavřete a promíchejte jak popsáno níže.*

- Vzhledem k tomu, že do zkumavek se 1 ml krve natahuje poměrně pomalu, ponechte zkumavku na jehle další 2-3 sekundy poté, co je zkumavka naplněná tak, abyste zajistili natažení správného objemu.

*Černá značka na straně zkumavky označuje plnicí objem 1 ml. Zkumavky pro odběr krve soupravy QuantiFERON®-TB Gold jsou validovány pro objemy v rozpětí od 0,8 do 1,2 ml. Pokud není krev ve kterékoli ze zkumavek v blízkosti uvedené značky, doporučuje se odebrat krev do nové zkumavky.*

- Pokud při odběru krve používáte “jehlu s křídélkem” předplňte hadičku tak, aby byla vyplněna krví ještě před nasazením zkumavek soupravy QuantiFERON®-TB Gold.
2. Promíchejte zkumavky **důkladným protřepáním po dobu 5 sekund** (nebo 10krát) tak, aby se krev rozprostřela **po celém vnitřním povrchu zkumavky**.
    - Důkladné promíchání je zapotřebí k úplné integraci obsahu zkumavky do krve.
    - Během procesu protřepání předpokládáme zpěnění krve, které neovlivňuje výsledky testu a není třeba se jím zabývat.
  3. Označte zkumavky správně.
  4. Zkumavky je nutné uložit do inkubátoru o teplotě 37°C co nejdříve, nejpozději do 16 hodin od odběru. Vzorky krve nechladte ani nezmrazujte.

## 6. POKYNY K POUŽITÍ

### První krok – Inkubace krve a odběr plazmy

#### Dodávané materiály

Zkumavky pro odběr krve QuantiFERON®-TB Gold IT (viz oddíl 3).

#### Potřebný materiál (který není součástí dodávky)

Viz oddíl 3.

#### Postup

1. Pokud se krev neinkubuje bezprostředně po odběru, je nutné **bezprostředně před inkubací zopakovat promíchání zkumavek**, způsobem uvedeným v oddíle 5.
2. Inkubujte zkumavky ve **VZPŘÍMENÉ POZICI** při teplotě 37°C po dobu 16-24 hodin. Inkubátor nemusí mít CO<sub>2</sub> nebo zvlhčování.
3. Po inkubaci při teplotě 37°C je možné uchovávat zkumavky pro odběr krve před další centrifugací po dobu až 3 dnů při teplotě 2°C až 27°C.
4. Po inkubaci zkumavek při teplotě 37°C se odběr plazmy provádí snadněji po centrifugaci zkumavek po dobu 15 minut při rychlosti 2000 až 3000 RCF (g). Gelová zátka oddělí buňky od plazmy. Pokud k tomu nedojde, je nutné zkumavky centrifugovat ještě jednou při vyšší rychlosti.
  - Plazmu lze odebírat i bez centrifugace, avšak je nutné plazmu odebírat bez narušení buněk.
5. Plazmatické vzorky lze plnit přímo ze zkumavek pro odběr krve na mikrotitrační destičku QuantiFERON®-TB Gold ELISA, a to obzvláště při použití automatické pracovní stanice ELISA.
6. Alternativně lze vzorky plazmy před imunoenzymatickým stanovením skladovat buď v centrifugovaných zkumavkách nebo po odběru do nádob na uchování plazmy. Například odeberte >150 µl plazmy do jamek mikrotitrační destičky nebo mikrotitračních zkumavek ve stojanu ve formátu 96 jamek a uzavřete, aby nedošlo k rozlití nebo odpaření vzorků během jejich skladování.
  - Vzorky plazmy lze skladovat po dobu až 4 týdnů při teplotě 2°C až 8°C nebo delší dobu při teplotě pod -20°C (pokud možno při teplotě nižší než -70°C).

## **Krok dvě – ELISA lidského IFN- $\gamma$**

### **Dodávané materiály**

Souprava ELISA QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold (viz oddíl 3).

### **Potřebné materiály (které nejsou součástí dodávky)**

Viz oddíl 3.

### **Postup**

1. Všechny plazmatické vzorky a činidla s výjimkou 100x koncentráту konjugátu je nutné nechat temperovat před použitím na pokojovou teplotu ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Nechte tyto materiály dosáhnout této teploty nejméně 60 minut.
2. Z rámečku odstraňte stripy, které nejsou zapotřebí, opět uzavřete plastový obal a vraťte do ledničky k uložení až do doby dalšího použití.

Připravte nejméně jeden strip standardu QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold a dostatečný počet stripů pro vyšetřované pacienty (viz Obrázky 2A & 2B pro dvouzkumavkové a třízkumavkové formáty). Po použití uchovejte rámeček a kryt pro použití se zbývajícím stripy.

3. Rekonstituujte lyofilizovaný standard soupravy (Kit Standard) s takovým množstvím demineralizované nebo destilované vody, které je uvedené na označení lahvičky se standardem. Šetrně promíchejte, aby se minimalizovala tvorba pěny a zkontrolujte že došlo k úplnému rozpuštění. Po rekonstituci standardu na stanovený objem vznikne roztok s koncentrací 8,0 IU/ml.

***Poznámka: Rekonstituční objem standardu (Kit Standard) se u jednotlivých šarží liší.***

Rekonstituovaný Kit Standard použijte k sérii ředění 1 : 4 IFN- $\gamma$  v zeleném pufru (Green Diluent – GD) – viz Obrázek 1. S1 (Standard 1) obsahuje 4 IU/ml, S2 (Standard 2) obsahuje 1 IU/ml, S3 (Standard 3) obsahuje 0,25 IU/ml a S4 (Standard 4) obsahuje 0 IU/ml (samotný GD). Testování standardů se provádí nejméně v duplikátu.

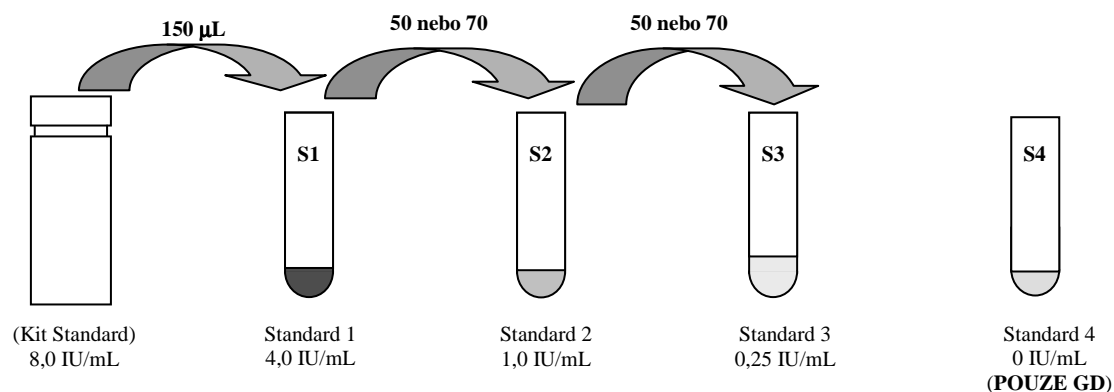
#### **DOPORUČENÝ POSTUP PRO DUPLIKÁTY STANDARDŮ**

- a. Označte 4 zkumavky „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
- b. Přidejte **150  $\mu\text{l}$**  GD do S1, S2, S3, S4.
- c. Přidejte **150  $\mu\text{l}$**  Kit Standardu do S1 a důkladně promíchejte.
- d. Přeneste **50  $\mu\text{l}$**  z S1 do S2 a důkladně promíchejte.
- e. Přeneste **50  $\mu\text{l}$**  z S2 do S3 a důkladně promíchejte.
- f. **Samotný GD** je jako nulový standard (S4).

#### **DOPORUČENÝ POSTUP PRO TRIPLIKÁTOVÝ STANDARD**

- a. Označte 4 zkumavky „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
- b. Přidejte **150  $\mu\text{l}$**  GD do S1.
- c. Přidejte **210  $\mu\text{l}$**  GD do S2, S3, S4.
- d. Přidejte **150  $\mu\text{l}$**  Kit Standardu do S1 a důkladně promíchejte.
- e. Přeneste **70  $\mu\text{l}$**  z S1 do S2 a důkladně promíchejte.
- f. Přeneste **70  $\mu\text{l}$**  z S2 do S3 a důkladně promíchejte.
- g. **Samotný GD** se používá jako nulový standard (S4).

**OBRÁZEK 1. Příprava standardní křivky**



- Pro každé stanovení ELISA připravte čerstvé ředění Kit Standardu.
4. Rekonstituujte lyofilizovaný 100x koncentrát konjugátu s 0,3 ml demineralizované nebo destilované vody. Šetrně promíchejte, abyste zamezili tvorbě pěny a zkontrolujte, že došlo k úplnému rozpuštění konjugátu.

Konjugát o pracovní koncentraci se připraví rozpuštěním koncentrovaného množství rekonstituovaného konjugátu v 100x koncentraci v zeleném pufru, jak je uvedeno v Tabulce 1 – Příprava konjugátu.

**TABULKA 1. Příprava konjugátu**

POČET STRIPŮ	OBJEM KONCE 100x KONCENTROVANÉHO KONJUGÁTU	OBJEM ZELENÉHO PUFRU
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

- Důkladně, ale šetrně promíchejte tak, aby nedošlo k zpěnění.
  - Nepoužitý 100x koncentrovaný konjugát vraťte do skladovacího prostoru s teplotou 2°C až 8°C okamžitě po použití.
  - Používejte pouze zelený pufr.
5. Před vlastním testem je nutné vzorky plazmy promíchat tak, aby došlo k rovnoměrné distribuci IFN- $\gamma$  v celém vzorku.
6. Vícekanálovou pipetou přidejte do požadovaných mikrotitračních jamek ELISA 50 µl čerstvě připraveného konjugátu o pracovní koncentraci.
7. Do příslušných mikrotitračních jamek přidejte vícekanálovou pipetou 50 µl testovaných vzorků plazmy (doporučené rozložení destiček viz Obrázky 2A & 2B). Nakonec přidejte 50 µl každého ze standardů 1-4.

**OBRÁZEK 2A. Doporučené rozložení vzorků pro zkumavky s nulovou kontrolou a TB antigenem (44 testů na mikrotitrační destičku)**

	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 (Vzorek 1. Plazma s nulovou kontrolou); 1A (Vzorek 1. Plazma s TB antigenem).

**OBRÁZEK 2B. Doporučení rozložení vzorků pro zkumavky s nulovou kontrolou, TB antigenem & mitogenem (28 testů na mikrotitrační destičku)**

	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 (Vzorek 1. Plazma s nulovou kontrolou); 1A (Vzorek 1. Plazma s TB antigenem); 1M (Vzorek 1. Plazma s mitogenovou kontrolou).

- Smíchejte konjugát a vzorky plazmy/standardy, důkladně je promíchejte na třepače mikrotitračních destiček po dobu 1 minuty.
- Každou destičku přikryjte víčkem a inkubujte při pokojové teplotě ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) po dobu  $120 \pm 5$  minut.
  - Během inkubace nesmí být destičky vystaveny přímému slunečnímu světlu.
- Během inkubace nařed'te jednu část 20násobného koncentrátu promývacího pufru s 19 částmi demineralizované nebo destilované vody a důkladně promíchejte. Množství 20x koncentrátu promývacího pufru postačuje na přípravu 2 L promývacího pufru o pracovní koncentraci.

Promyjte mikrotitrační jamky s **400 $\mu\text{l}$**  promývacího pufru o pracovní koncentraci v nejméně 6 cyklech. Doporučuje se použití automatické promývačky mikrotitračních destiček.

- Důkladné promytí je pro výsledek testu velmi důležité. Ujistěte se, že každá mikrotitrační jamka je zcela vyplněna promývacím pufrem v každém promývacím cyklu až k okraji. Mezi každým cyklem se doporučuje doba luhování nejméně 5 sekund.
- Do nádoby na odstraněnou tekutinu je nutné přidat standardní laboratorní dezinfekční prostředek a dodržovat zavedené postupy pro dekontaminaci potenciálně infekčního materiálu.

11. Vyklepněte destičky dnem vzhůru do svého materiálu k odstranění zbytků promývacího pufru. Do každé mikrotitrační jamky přidejte 100  $\mu$ l roztoku enzymového substrátu a důkladně promíchejte na třepačce mikrotitračních destiček.
12. Všechny destičky přikryjte víčkem a inkubujte v pokojové teplotě ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) po dobu 30 minut.
  - Destičky nesmí být během inkubace vystaveny působení přímého slunečního světla.
13. Po 30 minutách inkubace přidejte do každé mikrotitrační jamky 50  $\mu$ l enzymového zastavovacího roztoku a promíchejte.
  - Enzymový zastavovací roztok je nutné přidávat do mikrotitračních jamek ve stejném pořadí a přibližně stejnou rychlostí, jako byl přidáván substrát v kroku 11.
14. V každé jamce změřte absorbanci (A) do 5 minut od zastavení reakce za použití čtečky mikrotitračních destiček vybavené filtrem 450 nm a referenčním filtrem 620 nm až 650 nm. K výpočtu výsledků se používají naměřené hodnoty absorbance.

## 7. VÝPOČTY A INTERPRETACE TESTU

Společnost Cellestis dodává analytické software QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT, který lze použít k analýze primárních dat a výpočtu výsledků.

Tento software provádí kontrolu kvality testu, vypočte standardní křivku a stanoví výsledek testu u každého pacienta tak, jak je podrobněji uvedeno v oddíle Interpretace výsledků.

Jako alternativu k použití analytického software QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT lze stanovit výsledky následujícím postupem:

### **Tvorba standardní křivky**

*(v případě, že se nepoužívá analytický software QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT)*

Stanovte průměrnou hodnotu absorbance replikátů standardů na každé destičce.

Sestavte standardní logaritmickou křivku  $\log_{(e)}-\log_{(e)}$  vynesáním logaritmu průměrné hodnoty A (osa y) v závislosti na logaritmu  $\log_{(e)}$  koncentrace IFN- $\gamma$  v standardech IU/ml (osa x), nulový standard z těchto výpočtů vynechejte. Za použití regresní analýzy vypočtete linii nejhodnější pro stanovení standardní křivky.

Standardní křivku používejte ke stanovení koncentrace IFN- $\gamma$  (IU/ml) pro každý z testovaných vzorků plazmy s použitím hodnoty absorbance každého vzorku.

Výpočty lze provádět za použití softwarových balíčků dodávaných s čtečkami mikrotitračních destiček, standardního tabulkového procesoru nebo statistického software (např. Microsoft Excel). Doporučujeme používat tyto softwarové balíčky k výpočtu regresní analýzy, koeficientu variace (% CV) pro standardy a korelačního koeficientu (r) standardní křivky.

## **Kontrola kvality testu**

Přesnost výsledků testu závisí na tvorbě přesné standardní křivky. Proto je nutné výsledky standardů zhodnotit před interpretací samotných výsledků testovaných vzorků.

Pro validitu testu ELISA jsou nutné následující podmínky:

- **Průměrná hodnota A pro Standard 1 musí být  $\geq 0,600$ .**
- **Vypočtené % CV pro replikované hodnoty absorbance pro Standard 1 a Standard 2 musí být  $\leq 15$  %.**
- **Replikované hodnoty A pro Standard 3 a Standard 4 se nesmí lišit o více než 0,040 jednotek absorbance od průměru.**
- **Korelační koeficient (r) vypočtený z hodnot průměrné absorbance standardů musí být  $\geq 0,98$ .**

Analytický software QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold vypočte a zobrazí tyto parametry kontroly kvality.

Pokud nejsou splněna výše uvedená kritéria, provedené stanovení není validní a je nutné je opakovat.

- **Průměrná hodnota A pro nulový standard (zelený pufr) musí být  $\leq 0,150$ . Pokud je průměrná hodnota A  $> 0,150$ , je nutné zkontrolovat postup promývání mikrotitračních destiček.**

## Interpretace výsledků

Výsledky testu QuantiFERON®-TB Gold IT je nutné interpretovat podle následujících kritérií:

**POZNÁMKA:** Stanovení nebo vyloučení diagnózy onemocnění tuberkulózy a zhodnocení pravděpodobnosti LTBI vyžaduje kombinaci epidemiologických, anamnestických, klinických a diagnostických nálezů, které je nutné zohlednit při interpretaci výsledků testu QuantiFERON®-TB Gold IT.

### ZKUMAVKY S NULOVOU KONTROLOU & TB ANTIGEN

Nulová kontrola [IU/ml]	TB Antigen minus nulová kontrola [IU/ml]	QuantiFERON®-TB [IU/ml]	Hlášení/Interpretace
≤ 8,0	< 0,35	<b>Negativní</b>	<i>Infekce M. tuberculosis NENÍ pravděpodobná</i>
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty nulové kontroly		
	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty nulové kontroly	<b>Pozitivní<sup>1</sup></b>	<i>Infekce M. tuberculosis pravděpodobná</i>
> 8,0 <sup>2</sup>	Jakýkoli výsledek	<b>Nevýpovědní<sup>3</sup></b>	Výsledky mají nevýpovědní reaktivitu k TB-Antigenu

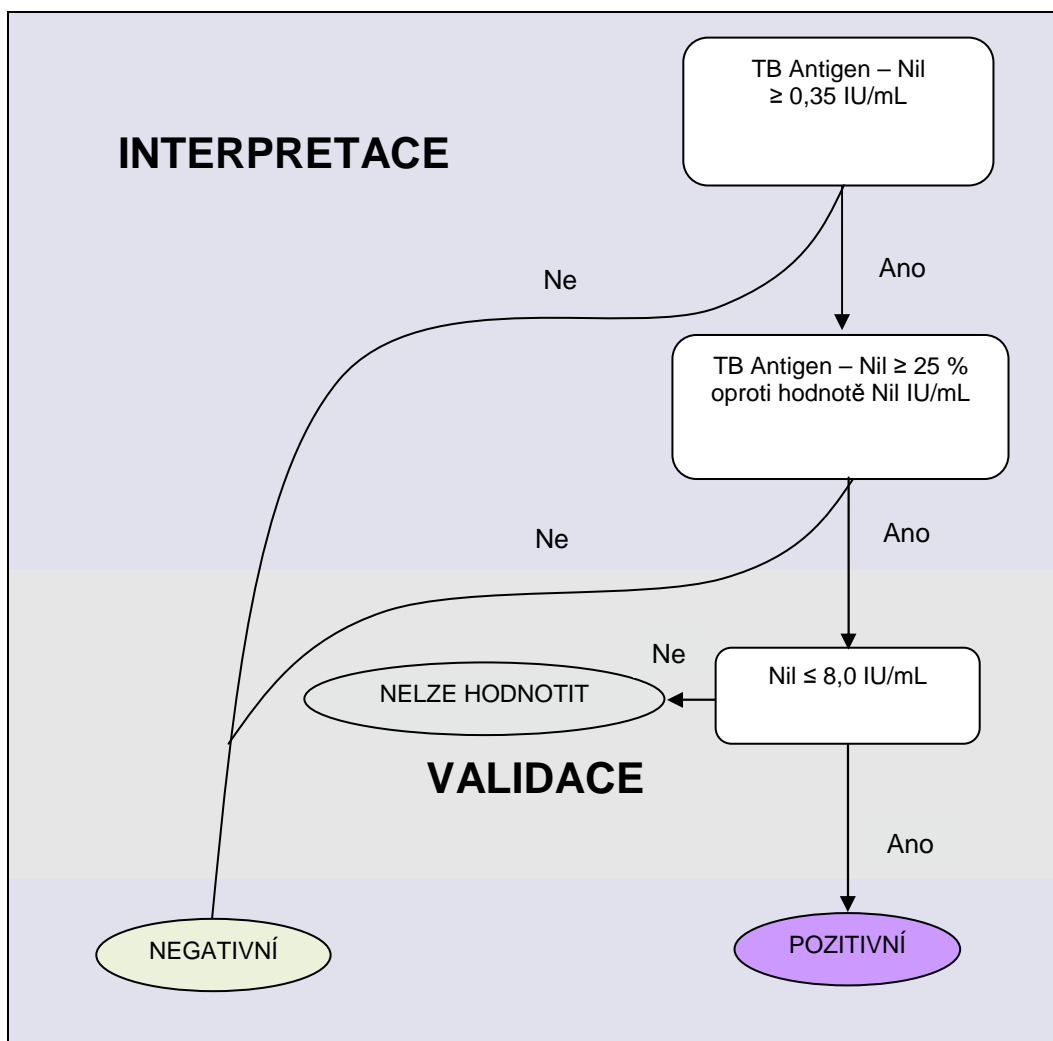
<sup>1</sup> U pacientů, kde není podezření na infekci *M. tuberculosis*, je možné první pozitivní výsledky confirmovat opakováním testu původního vzorku plazmy v polovičním ředění (duplikát) v testu QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Pokud opakované testování jednoho nebo více replikátů ukazuje pozitivní výsledek, je nutné u daného pacienta považovat výsledek za pozitivní.

<sup>2</sup> V klinických studiích mělo koncentrací IFN- $\gamma$  > 8,0 IU/ml v nulové kontrole méně než 0,25 % pacientů.

<sup>3</sup> Možné příčiny viz oddíl Odstraňování problémů.

Výše naměřené koncentrace IFN- $\gamma$  nelze korelovat se stádiem nebo stupněm infekce, stupněm imunitní odezvy nebo pravděpodobností progresu do aktivního onemocnění.

**OBRÁZEK 3. Schéma interpretace při použití zkumavek s nulovou kontrolou a TB ANTIGENEM**



**PŘI POUŽITÍ ZKUMAVEK S NULOVOU KONTROLOU, TB ANTIGENEM A MITOGENEM**

Nulová kontrola [IU/ml]	TB Antigen mínus nulová kontrola [IU/ml]	Mitogen mínus nulová kontrola [IU/ml] <sup>1</sup>	QuantIFERON®-TB [IU/ml]	Hlášení/Interpretace
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	<b>Negativní</b>	<i>Infekce M. tuberculosis NENÍ pravděpodobná</i>
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty nulové kontroly	≥ 0,5		
	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty nulové kontroly	Jakýkoli výsledek	<b>Pozitivní<sup>2</sup></b>	<i>Infekce M. tuberculosis je pravděpodobná</i>
	< 0,35	< 0,5	<b>Nevýpovědní<sup>3</sup></b>	Výsledky mají nevýpovědní reaktivitu k TB Antigenu
≥ 0,35 a < 25 % hodnoty nulové kontroly	< 0,5			
> 8,0 <sup>4</sup>	Jakýkoli výsledek	Jakýkoli výsledek		

<sup>1</sup> Odezva na pozitivní kontrolu s Mitogenem (a někdy i TB antigen) může být běžně mimo rozpětí čtečky mikrotitračních destiček. To nijak neovlivňuje výsledky testu.

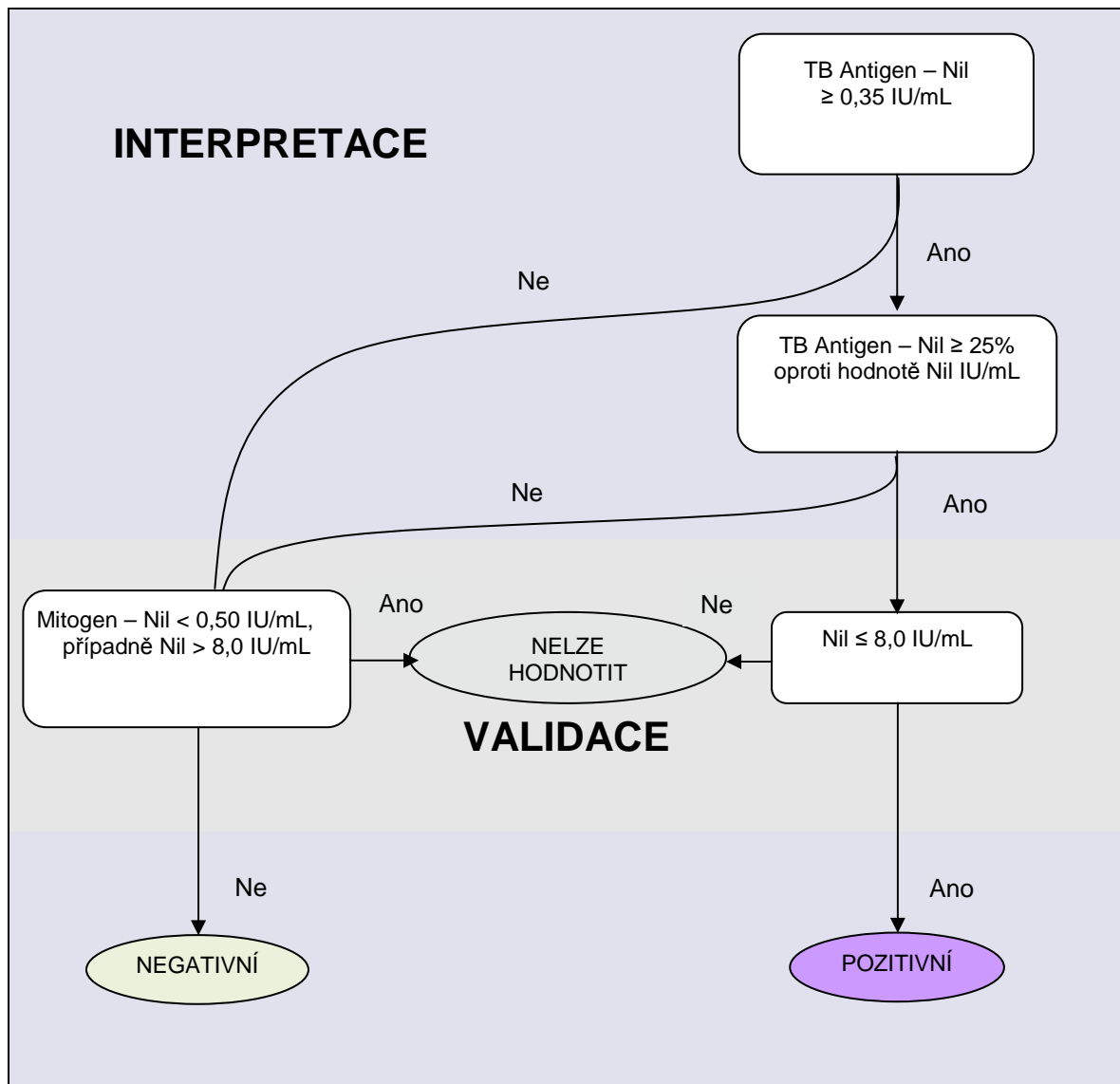
<sup>2</sup> U pacientů, kde není podezření na infekci *M. tuberculosis*, je možné první pozitivní výsledky potvrdit opakováním testu původního vzorku plazmy v polovičním ředění (duplikát) v metodě QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Pokud opakované testování jednoho nebo více replikátů ukazuje pozitivní výsledek, je nutné u daného pacienta považovat výsledek za pozitivní.

<sup>3</sup> Možné příčiny viz oddíl Odstraňování problémů.

<sup>4</sup> V klinických studiích mělo koncentrací IFN-γ > 8,0 IU/ml v nulové kontrole méně než 0,25 % pacientů.

Výše naměřené koncentrace IFN-γ nelze korelovat se stádiem nebo stupněm infekce, stupněm imunitní odezvy nebo pravděpodobností progresu do aktivního onemocnění.

**OBRÁZEK 4. Schéma interpretace výsledků při použití zkumavek nulové kontroly, TB ANTIGENU & MITOGENU**



## 8. OMEZENÍ METODY

Výsledku testu QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT je nutné použít společně s epidemiologickými údaji, aktuálním zdravotním stavem a dalšími diagnostickými vyšetřeními daného pacienta.

Osoby s hodnotou nulové kontroly větší než 8 IU/ml se hodnotí jako „nevýpovědní“, neboť reakce na TB antigen o 25 % větší může být mimo měřitelné hodnoty metody.

Nespolehlivé výsledky mohou nastat v důsledku:

- Odchylkou od postupu uvedeného v příbalových informacích,
- Nadměrnou koncentrací cirkulujícího IFN- $\gamma$  nebo přítomnosti heterofilních protilátek,
- Překročením 16hodinového intervalu od odběru vzorku krve do inkubace při teplotě 37°C.

## 9. FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

### Klinické studie

Vzhledem k tomu, že neexistuje jednoznačný standard pro diagnostiku latentní tuberkulózní infekce (LTBI), odhad senzitivity a specifity pro test QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT nelze prakticky hodnotit. Specifita testu QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT byla přibližně stanovena hodnocením falešně pozitivních výsledků osob s nízkým rizikem (bez známých rizikových faktorů) tuberkulózní infekce. Citlivost byla přibližně stanovena vyšetřením skupin pacientů s kultivačně potvrzeným aktivním onemocněním TBC.

#### Specifita

V jedné studii provedené v USA, které se zúčastnilo 866 dobrovolníků, byla odebrána krev pro vyšetření v testu QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT v okamžiku aplikace TST. Demografické informace a rizikové faktory TBC byly stanoveny za použití standardního dotazníku v době testování. Z 432 dobrovolníků bez známých rizikových faktorů infekce *M. tuberculosis* byly u 391 k dispozici výsledky testu QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT a TST. Žádný z pacientů nedostal vakcínu BCG. Druhá studie specifity byla provedena s testem QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT u osob s nízkým rizikem v Japonsku, z nichž přibližně 90 % v minulosti dostávalo vakcínu BCG. Výsledky obou studií specifity jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 2. Specifita testu QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT: Výsledky osob bez známých rizik infekce *M. tuberculosis*.**

STUDIE	Status BCG % vakcinovaných	Celkem vyšetřených	Počet. nevýpovědních GFT-G	Počet. Pozitivních výsledků QFT-G/počet validních testů	Specifita QFT-G (95% CI)	Počet. Pozitivní TST/počet vyšetřených	Specifita TST* (95% CI)
USA (nepublikovaná studie)	0 %	391	1	3 / 390	99,2 % (97,6-99,8)	6 / 391	98,5 % (96,5-99,4)
Japonsko (nepublikovaná studie)	~90 %	190	4	3 / 186	98,4 % (95-99,6)	-	-
<b>CELKEM</b>		<b>581</b>	<b>5/584 (0,9%)</b>	<b>6 / 576</b>	<b>99,0 %</b>	-	-

\*Jako hraniční hodnota TST bylo použito 10 mm. Odhadovaná specifita TST je 99,1 % při použití hraniční hodnoty 15 mm.

#### Senzitivita pro aktivní TBC

Vyšetření ke stanovení citlivosti testu QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT bylo prováděno u osob s podezřením na TBC v Austrálii a Japonsku, u nichž byla následně potvrzena infekce *M. tuberculosis* kultivací. Na rozdíl od tuberkulózní infekce (LTBI), kde není jednoznačný standard, v případě onemocnění je vhodným kritériem mikrobiologická kultivace *M. tuberculosis*, neboť nemocní pacienti jsou infikováni podle definice. Před odběrem krve pro test QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT byli pacienti léčeni méně než 8 dní.

Tabulka 3 přináší shrnutí nálezů od dvou skupin pacientů s pozitivní kultivací *M. tuberculosis*. Celková citlivost testu QuantiFERON®-TB Gold IT u aktivního onemocnění TBC bylo 89 % (48/54).

**Tabulka 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Pacienti s kultivačně potvrzenou infekcí *M. tuberculosis*.**

STUDIE		Onemocnění potvrzeno na základě	Počet pozitivních výsledků QFT-Gold / počet validních testů	Citlivost QFT-Gold (95% CI)
Japonská validační studie pacientů s TBC		Kultivace	24 / 27	89 % (72-96 %)
Australská validační studie pacientů s TBC	Plicní	Kultivace	7 / 10	70 % (40-89 %)
	Mimoplicní		17 / 17	100 % (82-100 %)
<b>CELKEM</b>			<b>48 / 54</b>	<b>89 %</b> <b>(78-95 %)</b>

### Diagnostika a LTBI

Na podporu funkčních výsledků testu QuantiFERON®-TB Gold IT u různých populací s rizikem LTBI byla publikována řada studií. Základní zjištění několika vybraných studií jsou zobrazena v tabulce 4.

**Tabulka 4. Vybrané publikované studie testu QuantiFERON®-TB Gold IT v populacích s rizikem LTBI.**

STUDIE	Celkový počet vyšetřených	Výsledky a zjištění
Indická HCW (Pai <i>et al</i> 2005) <sup>27</sup>	726	Prostředí s velmi vysokým výskytem TBC. 40 % pozitivních výsledků QFT-Gold IT a 41 % pozitivních výsledků TST na 10 mm. Vysoká konkordance s TST bez vlivu BCG na obou stranách. Oba testy vztaženy k rizikovým faktorům věku a délky práce ve zdravotnictví.
Dánská HIV (Brock <i>et al</i> 2006) <sup>5</sup>	590	Celková prevalence LTBI podle testu QFT-Gold IT bylo 4,6 % (27/590) u HIV <sup>+</sup> pozitivních osob. Pozitivní výsledky byly spojeny s rizikem TBC. U dvou pacientů s pozitivním testem QFT-Gold IT došlo do 1 roku k progresi do aktivní TBC. Nevýpovědní reakce (n=20, 3,4 %) byly významně spojeny s počtem CD4 <100 / μl.
Hospitalizované děti (Dogra <i>et al</i> 2006) <sup>12</sup>	105	Děti s podezřením na TBC nebo anamnézou kontaktu s osobou nemocnou TBC podstoupily vyšetření QFT-Gold IT a TST. Test QFT-Gold IT byl pozitivní u 10,5 % a TST byl pozitivní při 10 mm u 9,5 %. Shoda mezi testy byla celkem 95,2 % a u osob nevakcinovaných BCG 100 %.
Německé kontakty (Diel <i>et al</i> 2006) <sup>11</sup>	309	Byly vyšetřeny blízké kontakty 15 různých nemocných osob. Vakcinaci BCG v anamnéze mělo 51 %, 27 % z nich se narodilo v cizině. Celkem 70 % osob vakcinovaných BCG a 18 % nevakcinovaných mělo pozitivní výsledek TST (5 mm), pozitivní výsledek QFT-Gold IT mělo pozitivních 9 % vakcinovaných BCG a 11 % nevakcinovaných. Výsledek testu QFT-Gold IT byl spojen s rizikem TBC. TST byl spojen pouze s vakcinací BCG.

Mnohem větší počet publikací popisuje výsledky méně citlivé verze testu QuantiFERON®-TB Gold s tekutým antigenem (předchůdce testu QuantiFERON®-TB Gold IT) a testu QuantiFERON®-TB Gold IT. Tyto studie hodnotí kontakty pacientů s aktivní TBC<sup>9,11, 19, 25</sup>, děti<sup>6-10, 25, 28</sup>, HIV pozitivních osob<sup>2, 5, 20</sup>, zdravotníků<sup>13, 26, 32</sup>, osob s potlačenou imunitou<sup>3, 4, 22, 23, 27, 30, 31</sup> a dále osob s podezřením na TBC<sup>7, 8, 10, 18</sup> a osob s nízkým rizikem<sup>15</sup>.

### Opakovatelnost a vliv TST na následné testování QuantiFERON®-TB Gold

Jako součást americké studie specifčnosti byla podskupina dobrovolníků opakovaně testována za 4 až 5 týdnů po úvodním testu QuantiFERON®-TB Gold IT test a TST. Výsledky testů QuantiFERON®-TB Gold IT byly k dispozici v obou časových intervalech u 260 dobrovolníků a stupeň shody byl 99,6 % (259/260). Předchozí test TST neindukoval pozitivní reakci testu QuantiFERON®-TB Gold IT.

## 10. TECHNICKÉ INFORMACE

### Nevýpovědní výsledky

Nevýpovědní výsledky by se měly vyskytovat vzácně a mohou být projevem imunitního stavu vyšetřovaného pacienta, ale mohou také být způsobeny řadou technických faktorů:

- Překročený časový interval 16 hodin od odběru krve do inkubace při teplotě 37°C
- Skladování krve mimo doporučené teplotní rozmezí (22°C ± 5°C)
- Nedostatečné promíchání krve v odběrových zkumavkách
- Neúplné promytí mikrotitračních destiček ELISA

Pokud máte podezření na technický problém při odběru nebo zpracování vzorků krve, zopakujte celý test QuantiFERON®-TB Gold IT s novým vzorkem krve. Opakování testu ELISA u stimulované plazmy lze provést v případě podezření na nedostatečné promytí nebo jinou technickou závadu při provádění testu ELISA. Nevýpovědní výsledky, které mohou být způsobeny nízkou hodnotou mitogenu nebo vysokou hodnotou nulové kontroly, se nebudou při opakování testu měnit v případě, že nedošlo k chybě při provádění testu. Nevýpovědní výsledky je nutné jako takové označit. Lékaři se potom mohou rozhodnout o odběru nového vzorku, nebo provádění dalších výkonů podle potřeby.

### Vzorky sražené plazmy

Pokud se při dlouhodobém skladování vzorků plazmy vytvoří fibrinová zátka, vzorky centrifugujte tak, aby došlo k sedimentaci sraženého materiálu a snadnějšímu pipetování plazmy.

## Odstraňování problémů testu ELISA

### Nespecifické zbarvení

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Neúplné promytí mikrotitrační destičky.	Promyjte destičku nejméně 6x promývacím pufrem o objemu 400 $\mu$ l/na jamku. V závislosti na použité promývače může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Mezi cykly je nutné dodržet dobu louhování nejméně 5 sekund.
Zkřížená kontaminace jamek ELISA.	Při pipetování a míchání vzorků postupujte opatrně, abyste toto riziko snížili.
Uplynutí doby použitelnosti setu/součástí.	Zajistěte použití soupravy před uplynutím doby použitelnosti. Zajistěte použití rekonstituovaného standardu a 100x koncentrátu konjugátu do tří měsíců ode dne rekonstituce.
Roztok s enzymovým substrátem je kontaminovaný.	Modře zbarvený substrát zlikvidujte. Zajistěte použití čistých zásobníků na činidla.

### Nízké hodnoty absorbance u standardů

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Chyba ředění standardů.	Zajistěte správnou přípravu ředění standardů podle příbalových informací.
Chyba pipetování.	Zajistěte kalibraci pipet a použití podle pokynů výrobce.
Příliš nízká inkubační teplota.	Inkubace testu ELISA musí probíhat při pokojové teplotě 17°C až 27°C.
Příliš krátká inkubační doba.	Inkubace destičky s konjugátem, standardy a vzorky má trvat 120 $\pm$ 5 minut. Roztok s enzymovým substrátem se inkubuje na mikrotitrační destičce po dobu 30 minut.
Použití nesprávného filtru čtečky destiček.	Destičky je nutné odečítat při vlnové délce 450 nm s referenčním filtrem v rozmezí 620 až 650 nm.
Činidla jsou příliš chladná.	Všechna činidla s výjimkou 100x koncentrátu konjugátu je nutné temperovat na pokojovou teplotu před zahájením testu. To trvá přibližně jednu hodinu.
Uplynula doba použitelnosti soupravy/součástí.	Zajistěte použití soupravy před uplynutím doby použitelnosti. Zajistěte použití rekonstituovaného standardu a 100x koncentrátu konjugátu do tří měsíců ode dne rekonstituce.

Vysoká absorbance pozadí

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Neúplné promytí destiček.	Promyjte destičku nejméně 6x promývacím pufrem o objemu 400 µl/na jamku. V závislosti na použité promývače může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Mezi cykly je nutné dodržet dobu louhování nejméně 5 sekund.
Příliš vysoká inkubační teplota.	Inkubace testu ELISA musí probíhat při pokojové teplotě 17°C až 27°C.
Uplynula doba použitelnosti soupravy/součástí.	Zajistěte použití soupravy před uplynutím doby použitelnosti. Zajistěte použití rekonstituovaného standardu a 100x koncentrátu konjugátu do tří měsíců ode dne rekonstituce.
Roztok s enzymovým substrátem je kontaminovaný.	Modře zbarvený substrát zlikvidujte. Zajistěte použití čistých zásobníků na činidla.

Nelineární standardní křivka a variabilita duplikátů

MOŽNÁ PŘÍČINA	ŘEŠENÍ
Neúplné promytí destiček.	Promyjte destičku nejméně 6x promývacím pufrem o objemu 400 µl/na jamku. V závislosti na použité promývače může být zapotřebí více než 6 promývacích cyklů. Mezi cykly je nutné dodržet dobu louhování nejméně 5 sekund.
Chyba ředění standardů.	Zajistěte správnou přípravu ředění standardů podle příbalových informací.
Nedostatečné promíchání.	Míchejte činidla důkladně obracením nebo šetrným promícháním před přidáním na mikrotitrační destičku.
Nekonzistentní technika pipetování nebo přerušení během sestavování soupravy.	Přidávání vzorků a standardů musí probíhat kontinuálním způsobem. Před zahájením testu musejí být všechna činidla připravena.

Video o provedení testu a řešení většiny technických problémů naleznete na CD-ROM „Informace o výrobku a technická příručka“, kterou můžete získat zdarma od společnosti Cellestis nebo vašeho distributora.

## 11. LITERATURA

A comprehensive list of QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold references is located on the Cellestis website (www.cellestis.com)

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



## 13. ZKRÁCENÝ POSTUP TESTU

### KROK 1 – INKUBACE KRVE

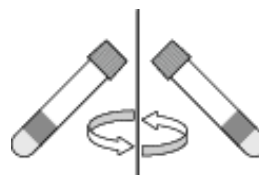
1. Odeberte krev pacienta do zkumavek pro odběr krve a promíchejte **důkladným protřepáním zkumavek po dobu 5 sekund (nebo 10krát)** tak, aby došlo k **pokrytí veškerého vnitřního povrchu zkumavky krví**.



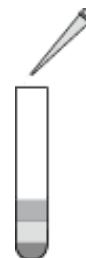
2. Zkumavky inkubujte ve **svislé** poloze při teplotě 37°C po dobu 16 až 24 hodin.



3. Po skončení inkubace zkumavky zcentrifugujte po dobu 5 až 15 minut při 2000 až 3000 g RCF (g) k oddělení plazmy a erytrocytů.

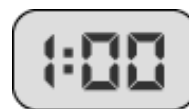


4. Po centrifugaci odeberte z každé zkumavky vzorek plazmy ke kvantifikaci koncentrace IFN- $\gamma$ .

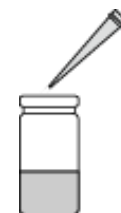


## KROK 2 – ELISA IFN- $\gamma$

1. Ponechte jednotlivé složky soupravy ELISA temperovat na pokojovou teplotu po dobu nejméně 60 minut, s výjimkou 100x koncentrovaného konjugátu.

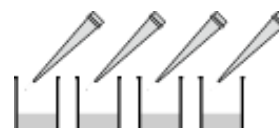


2. Rekonstituujte standard na 8,0 IU/ml destilovanou nebo demineralizovanou vodou. Připravte čtyři (4) standardní ředění.

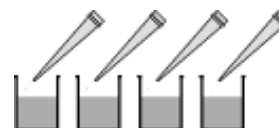


3. Rekonstituujte lyofilizovaný 100x koncentrát konjugátu v destilované nebo demineralizované vodě.

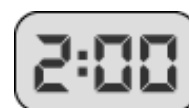
4. Připravte konjugát o pracovní koncentraci se zeleným pufrem a do všech jamek aplikujte 50  $\mu$ l.



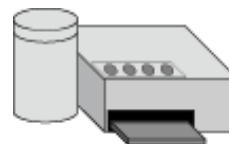
5. Do příslušných mikrotitračních jamek aplikujte 50  $\mu$ l vzorků testované plazmy a 50  $\mu$ l standardů. Promíchejte za použití třepačky.



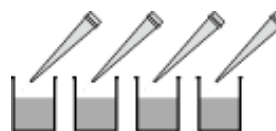
6. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 120 minut.



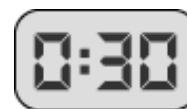
7. Mikrotitrační jamky promyjte nejméně 6x promývacím pufrem o objemu 400  $\mu$ l/jamku.



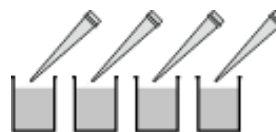
8. Do mikrotitračních jamek aplikujte 100  $\mu$ l enzymatického substrátového roztoku. Promíchejte za použití třepačky.



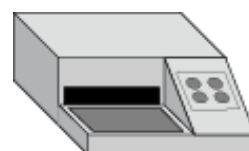
9. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30 minut.



10. Do všech mikrotitračních jamek přidejte 50  $\mu$ l zastavovacího roztoku. Promíchejte za použití třepačky.



11. Výsledky odečítejte při vlnové délce 450 nm s referenčním filtrem o vlnové délce 620 až 650 nm.



12. Proved'te analýzu výsledků.





Vyrobeno pro:  
Cellestis Limited (Australia) a Cellestis GmbH (Europe)  
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia  
Telefon (Aust) +61 3 9571 3500, (Europe) +49 6151 428 59-0  
E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)  
Internet: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Číslo dokumentu 05990301C  
Březen 2008

