

Prospect QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT[®]) ELISA



2 x 96 (nr. catalog 0594-0201)



20 x 96 (nr. catalog 0594-0501)

Testul IFN- γ asupra sângelui integral pentru măsurarea
răspunsurilor la antigenii peptidici ESAT-6, CFP-10 și
TB7.7(p4)



A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro



0594-0201, 0594-0501

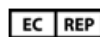


Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia

Telefon: (Australia) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden, GERMANIA

1075115RO Rev. 01



www.QuantiFERON.com



Cuprins

1. Domeniul de utilizare	4
2. Rezumatul și explicarea testului	4
Principiile testului	5
Timpul necesar pentru efectuarea testului	5
3. Componente și mod de păstrare	6
Materiale necesare, dar nefurnizate	7
Păstrare și manipulare	7
4. Avertizări și precauții	8
A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro	8
Avertizări	8
Precauții	9
5. Recoltarea și manipularea probelor	10
6. Instrucțiuni de utilizare	12
Etapa 1 — Incubarea sângelui și recoltarea plasmei	12
Etapa 2 — Testul ELISA pentru IFN- γ uman	13
7. Calcule și interpretarea testului	17
Generarea curbei standard	17
Controlul calității testului	17
8. Limitări	19
9. Caracteristici de performanță	20
Studii clinice	20
10. Informații tehnice	22
Rezultate neconcludente	22
Probe de plasmă coagulate	22
Ghid de remediere a problemelor	23
11. Bibliografie	25
12. Servicii de asistență tehnică	27
13. Procedura de testare pe scurt	28
Etapa 1 – Incubarea sângelui	28
Etapa 2 – Testul ELISA pentru IFN- γ	28
Modificări semnificative	30

1. Domeniul de utilizare

QuantiFERON-TB Gold (QFT®) este un test de diagnosticare in vitro care utilizează un amestec de peptide care simulează proteinele ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4) pentru a stimula celulele din sângele integral heparinizat. Detectarea interferonului- γ (IFN- γ) prin intermediul testului de imunoabsorbție enzimatică (ELISA) este utilizată pentru identificarea răspunsurilor in vitro la antigenii peptidici asociați cu infecția cu *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT este un test indirect pentru identificarea infecției cu *M. tuberculosis* (inclusiv a bolii active) și este destinat utilizării în asociere cu măsurile de evaluare a riscului, radiografia și alte evaluări medicale și de diagnostic.

2. Rezumatul și explicarea testului

Tuberculoza este o boală transmisibilă cauzată de infecția cu organisme din complexul *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), care, de obicei, se transmite la gazde noi pe cale aeriană, prin intermediul nucleilor de picătură proveniți de la pacienți infectați cu tuberculoză respiratorie. Persoanele infectate recent pot dezvolta tuberculoză la un interval de câteva săptămâni sau luni, însă majoritatea persoanelor infectate nu prezintă simptome. Tuberculoza latentă (LTBI), o afecțiune netransmisibilă, asimptomatică persistă la unele persoane, acestea putând dezvolta tuberculoză după mai multe luni sau mai mulți ani. Scopul principal al diagnosticării LTBI îl reprezintă evaluarea necesității unui tratament medical menit să prevină tuberculoza activă. Până recent, singura metodă disponibilă pentru diagnosticarea LTBI era testul cutanat la tuberculină (TCT). Sensibilitatea cutanată la tuberculină apare între 2 până la 10 săptămâni de la infectare. Cu toate acestea, anumite persoane infectate, inclusiv acele persoane care suferă de o paletă largă de afecțiuni care obstrucționează funcțiile imunitare, însă și alte persoane care nu suferă de astfel de afecțiuni, nu răspund la tuberculină. Dimpotrivă, anumite persoane care nu sunt infectate cu *M. tuberculosis* prezintă sensibilitate la tuberculină și obțin rezultate pozitive la TCT după vaccinare cu bacilul Calmette-Guérin (BCG), ca urmare a unei infecții provocate de o micobacterie diferită de complexul *M. tuberculosis* sau a altor factori neidentificați.

Trebuie făcută o delimitare între LTBI și tuberculoza activă, o afecțiune raportabilă care implică de regulă plămânii și tractul respirator inferior, putând însă afecta și alte sisteme de organe. Tuberculoza se diagnostichează pe baza anamnezei și a examinărilor fizice, radiologice, histologice și micobacteriologice.

QFT este un test pentru răspunsurile imune mediate celular la antigenii peptidici care simulează proteinele micobacteriene. Aceste proteine, ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4), lipsesc din toate tulpinile BCG și din majoritatea micobacteriilor netuberculoase, cu excepția *M. kansasii*, *M. szulgai* și *M. marinum*.(1) Persoanele infectate cu organismele din complexul *M. tuberculosis* prezintă în sânge, de regulă, limfocite care recunosc aceste proteine, precum și alți antigeni micobacterieni. Acest proces de recunoaștere implică producția și secreția citokinei IFN- γ . Detectarea și cuantificarea ulterioară a IFN- γ formează baza acestui test.

Antigenii utilizați în QFT reprezintă un amestec de peptide care simulează proteinele ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4). Numeroase studii au demonstrat că acești antigeni peptidici stimulează răspunsurile IFN- γ în celulele T ale persoanelor infectate cu *M. tuberculosis*, dar, în general, nu și ale persoanelor neinfectate sau vaccinate cu BCG care nu prezintă boala sau un risc de LTBI.(1–32) Cu toate acestea, tratamentele medicale sau afecțiunile care alterează funcțiile imunitare pot reduce răspunsurile IFN- γ . Pacienții care suferă de alte infecții micobacteriene pot să prezinte și ei o sensibilitate la ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4), deoarece genele care codifică aceste proteine sunt prezente în *M. kansasii*, *M. szulgai* și *M. marinum*.(1, 23) Testul QFT poate fi folosit atât ca test pentru LTBI, cât și ca ajutor în diagnosticarea infecției cu complexul *M. tuberculosis* la pacienții bolnavi. Un rezultat pozitiv susține diagnosticul de tuberculoză, însă există și alte infecții micobacteriene (de ex., *M. kansasii*) care pot duce la rezultate pozitive. Sunt necesare și alte investigații medicale și de diagnosticare pentru a confirma sau infirma prezența tuberculozei.

Principiile testului

Sistemul QFT utilizează tuburi speciale de recoltare a sângelui, în care se recoltează sânge integral. Perioada de incubare a sângelui în tuburi este cuprinsă între 16 și 24 de ore, după care, plasma este recoltată și testată pentru prezența IFN- γ rezultat ca răspuns la antigenii peptidici.

Testul QFT este efectuat în două etape. Mai întâi, sângele integral este recoltat în fiecare din tuburile QFT de recoltare a sângelui, și anume un tub Nil, un tub Antigen TB și un tub Mitogen.

Tubul Mitogen poate fi utilizat în testul QFT drept control pozitiv. Acesta poate fi util în special în cazul în care există un dubiu referitor la starea de imunitate a individului. Tubul Mitogen poate, de asemenea, fi utilizat cu rol de control pentru manipularea și incubarea corectă a sângelui.

Tuburile trebuie incubate la 37 °C cât mai curând posibil, în interval de 16 ore de la recoltare. După o perioadă de incubare de 16 până la 24 de ore, tuburile sunt centrifugate, plasma este îndepărtată, iar cantitatea de IFN- γ (UI/ml) este măsurată cu ajutorul testului ELISA.

Se consideră că un test este pozitiv când răspunsul IFN- γ la tubul Antigen TB este semnificativ mai mare decât valoarea IFN- γ exprimată în UI/ml la tubul Nil. Dacă este utilizată, proba de plasmă din tubul Mitogen are rol de control pozitiv al IFN- γ pentru fiecare specimen testat. Un răspuns slab la Mitogen (<0,5 UI/ml) indică un rezultat neconcludent atunci când o probă de sânge are, de asemenea, un răspuns negativ la antigenii TB. Acest comportament poate apărea în caz de limfocite insuficiente, activitate scăzută a limfocitelor, ca urmare a manipulării necorespunzătoare a probei, umplerii/omogenizării incorecte a tubului Mitogen sau a incapacității limfocitelor pacientului de a produce IFN- γ . Proba Nil se ajustează pentru fond, pentru efectele anticorpilor heterofili sau IFN- γ nespecific din probele de sânge. Nivelul IFN- γ din tubul Nil este scăzut din nivelul IFN- γ din tubul Antigen TB și din tubul Mitogen (dacă este folosit).

Timpul necesar pentru efectuarea testului

Timpul necesar pentru efectuarea testului QFT este estimat mai jos; durata testării probelor multiple grupate pe loturi este, de asemenea, indicată:

Incubarea tuburilor cu sânge la 37 °C: 16–24 de ore

ELISA: Aprox. 3 ore pentru o placă ELISA
(28–44 de persoane)

<1 oră de lucru

Se adaugă 10–15 minute pentru fiecare placă suplimentară

3. Componente și mod de păstrare

Blood Collection Tubes (Tuburi de recoltare a sângelui)*	300 de tuburi	200 de tuburi	100 de tuburi
Nr. de catalog	T0590-0301	0590-0201	T0593-0201
Număr de preparări	100	100	100
QuantiFERON Nil Tube (Tub QuantiFERON Nil) (capac gri, inel alb)	100 de tuburi	100 de tuburi	
QuantiFERON TB Antigen Tube (Tub QuantiFERON Antigen TB) (capac roșu, inel alb)	100 de tuburi	100 de tuburi	
QuantiFERON Mitogen Tube (Tub QuantiFERON Mitogen) (capac violet, inel alb)	100 de tuburi		100 de tuburi
Prospect tuburi de recoltare a sângelui QFT	1	1	1
High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (Tuburi de recoltare a sângelui pentru altitudini mari) (se utilizează la altitudini cuprinse între 1020 și 1875 de metri)*	300 de tuburi	100 de tuburi	100 de tuburi
Nr. de catalog	T0590-0505	0590-0501	T0593-0501
QuantiFERON HA Nil Tube (Tub QuantiFERON HA Nil) (capac gri, inel galben)	100 de tuburi	100 de tuburi	
QuantiFERON HA TB Antigen tube (Tub QuantiFERON HA Antigen TB) (capac roșu, inel galben)	100 de tuburi	100 de tuburi	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (Tub QuantiFERON HA Mitogen) (capac violet, inel galben)	100 de tuburi		100 de tuburi
Prospect tuburi de recoltare a sângelui QFT	1	1	1

* Configurațiile de produse sunt disponibile în funcție de țară. Vă rugăm să consultați secțiunea de relații cu clienții a QIAGEN (detalii pe www.qiagen.com) pentru mai multe informații despre configurațiile disponibile pentru comandă.

Componente ELISA	Trusă ELISA cu 2 plăci	Pachet de laborator de referință
Nr. de catalog	0594-0201	0594-0501
Stripuri de microplăci (12 X 8 godeuri) acoperite cu anticorpi monoclonali murini anti umani IFN-γ	2 seturi de stripuri pentru placă cu 12 x 8 godeuri	20 seturi de stripuri pentru placă cu 12 x 8 godeuri
Human IFN- γ Standard, lyophilized (Standard IFN- γ uman liofilizat) (conține IFN- γ uman recombinant, cazeină bovină, timerosal 0,01% m/v)	1 x flacon (8 UI/ml după reconstituire)	10 x flacoane (8 UI/ml după reconstituire)
Green Diluent (Diluant verde) (conține cazeină bovină, ser normal de șoarece, timerosal 0,01% m/v)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (Conjugat concentrat 100X liofilizat) (HRP IFN- γ anti uman murin, conține timerosal 0,01% m/v)	1 x 0,3 ml (după reconstituire)	10 x 0,3 ml (după reconstituire)
Wash Buffer 20X Concentrate (Soluție tampon pentru spălare concentrată 20X) (pH 7,2, conține ProClin[®] 300 0,05% v/v)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Soluție de substrat enzimatic) (conține H₂O₂, 3,3', 5,5', tetrametilbenzidină)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Soluție de inhibitor enzimatic) (conține H₂SO₄ 0,5M)[†]	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Prospect QFT ELISA	1	1

[†] Conține acid sulfuric. Pentru măsuri de precauție, consultați pagina 9.

Materiale necesare, dar nefurnizate

- Incubator la 37 °C. Nu este nevoie de CO₂
- Pipete cu volum variabil calibrate pentru eliberarea a 10 μ l până la 1.000 μ l, cu vârfuri de unică folosință
- Pipete multicanal calibrate, capabile să elibereze 50 μ l și 100 μ l, cu vârfuri de unică folosință
- Agitator pentru microplăci
- Apă deionizată sau distilată, 2 litri
- Spălător pentru microplăci (este recomandat un spălător automat)
- Cititor de microplăci prevăzut cu un filtru de 450 nm și un filtru de referință între 620 nm și 650 nm

Păstrare și manipulare

Tuburi de recoltare a sângelui

- Păstrați tuburile de recoltare a sângelui la temperaturi cuprinse între 4 °C și 25 °C.

Reactivii din trusă

- Păstrați reactivii din trusă refrigerați, la o temperatură cuprinsă între 2 °C și 8 °C.
- Protejați în permanență soluția de substrat enzimatic de lumina solară directă.

Reactivii reconstituiți și neutilizați

Pentru instrucțiuni despre modul de reconstituire a reactivilor, vă rugăm să consultați Secțiunea 6 (pagina 13)

- Standardul din trusă reconstituit poate fi păstrat cel mult 3 luni, dacă este păstrat la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C.
Notați data la care a fost reconstituit standardul din trusă.
- Odată reconstituit, conjugatul concentrat 100X neutilizat trebuie păstrat în continuare la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C și utilizat în cel mult 3 luni.
Notați data la care a fost reconstituit conjugatul.
- Conjugatul în concentrație de lucru trebuie utilizat în cel mult 6 ore de la preparare.
- Soluția tampon de spălare în concentrație de lucru poate fi păstrată la temperatura camerei timp de cel mult 2 săptămâni.

4. Avertizări și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

Avertizări

- Un rezultat QFT negativ nu exclude posibilitatea unei infecții cu *M. tuberculosis* sau a tuberculozei active: rezultatele fals negative pot fi cauzate de stadiul infecției (de ex. probă recoltată înainte de dezvoltarea răspunsului imun celular), factori de morbiditate asociați care afectează funcțiile imunitare, manipularea incorectă a tuburilor de recoltare a sângelui ca urmare a puncției venoase, efectuarea incorectă a testului sau alte variabile imunologice.
- Un rezultat QFT pozitiv nu trebuie considerat ca bază unică și definitivă pentru diagnosticarea infecției cu *M. tuberculosis*. Efectuarea incorectă a testului poate duce la răspunsuri fals pozitive.
- Un rezultat QFT pozitiv trebuie urmat de evaluări medicale și de diagnostic suplimentare pentru depistarea tuberculozei active (de ex., frotiu și cultură AFB, radiografie toracică).
- Deși ESAT-6, CFP-10 și TB7.7(p4) sunt absente din toate tulpinile BCG și din majoritatea micobacteriilor netuberculoase, este posibil să obțineți rezultate QFT pozitive ca urmare a unei infecții cu *M. kansasii*, *M. szulgai* sau *M. marinum*. Dacă se suspectează o asemenea infecție, trebuie efectuate testări alternative.

Precauții

A se utiliza numai pentru diagnosticare in vitro.

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (FDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa www.qiagen.com/safety, unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate a fiecărei truse și componente a trusei QIAGEN.



ATENȚIE: Manipulați sângele uman ca și cum ar avea potențial infecțios.

Urmați îndrumările relevante referitoare la manipularea sângelui.

Următoarele expresii referitoare la riscuri și siguranță se aplică pentru componentele QuantiFERON-TB Gold ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Soluție de inhibitor enzimatic QuantiFERON)



Xi

Conține acid sulfuric: Iritant. Expresii referitoare la riscuri și siguranță:* R36/38, S26-36/37/39

- **Diluantul Verde** conține ser normal de șoarece și cazeină, care pot declanșa reacții alergice; evitați contactul cu pielea.

Pentru situații de urgență care implică substanțe chimice

Vărsare, scurgere, expunere sau accident

Contactați CHEMTREC 24 de ore din 24

În SUA și Canada: 1-800-424-9300

În afara SUA și Canada +1-703-527-3887 (apeluri cu taxă inversă acceptate)

Informații suplimentare

Fișe cu date de securitate: www.qiagen.com/safety

- Abaterile de la *prospectul QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA* pot genera rezultate incorecte. Vă rugăm să citiți cu atenție instrucțiunile înainte de utilizare.
- Nu utilizați trusa dacă unul dintre flacoanele de reactivi prezintă semne de deteriorare sau scurgeri înainte de utilizare.
- Nu amestecați și nu utilizați stripuri de microplăci, standard IFN- γ uman, diluant verde sau conjugat concentrat 100X din truse QFT aparținând unor loturi diferite. Alți reactivi (soluția tampon de spălare concentrată 20X, soluția de substrat enzimatic și soluția de inhibitor enzimatic) pot fi interschimbați între truse cu condiția ca reactivii să nu aibă termenul de valabilitate expirat și detaliile lotului să fie înregistrate. Eliminați reactivii neutilizați și probele biologice conform reglementărilor locale, naționale și federale.
- Nu utilizați tuburile de recoltare a sângelui sau trusa ELISA după data de expirare.
- Asigurați-vă că echipamentele de laborator, precum spălătoarele și cititoarele de plăci au fost calibrate/validate pentru utilizare.

* R36/38: Iritant pentru piele și ochi; S26: În cazul contactului cu ochii, clătiți imediat cu apă din abundență și solicitați asistență medicală; S36/37/39: Purtați îmbrăcăminte de protecție, mănuși și măști de protecție pentru ochi/față adecvate.

5. Recoltarea și manipularea probelor

Testul QF utilizează următoarele tuburi de recoltare:

1. Tuburi QuantiFERON Nil (capac gri cu inel alb; se utilizează la altitudini cuprinse între nivelul mării și 810 m)
2. Tuburi Antigen TB (capac roșu cu inel alb; se utilizează la altitudini cuprinse între nivelul mării și 810 m)
3. Tuburi QuantiFERON Mitogen (capac violet cu inel alb; se utilizează la altitudini cuprinse între nivelul mării și 810 m)

Tuburi de altitudini mari (HA):

4. Tuburi QuantiFERON Nil HA (capac gri cu inel galben; se utilizează la altitudini cuprinse între 1020 m și 1875 m)
5. Tuburi Antigen TB HA (capac roșu cu inel galben; se utilizează la altitudini cuprinse între 1020 m și 1875 m)
6. Tuburi QuantiFERON Mitogen HA (capac violet cu inel galben; se utilizează la altitudini cuprinse între 1020 m și 1875 m)

Antigenii au fost fixați prin uscare pe peretele interior al tuburilor de recoltare a sângelui, prin urmare este esențial ca sângele să fie bine omogenizat cu conținutul tuburilor. Tuburile trebuie transferate cât mai curând posibil într-un incubator setat la 37 °C, în cel mult 16 ore de la recoltare

Pentru obținerea unor rezultate optime, trebuie respectate următoarele proceduri:

1. **Pentru fiecare subiect, recoltați 1 ml de sânge prin puncție venoasă, direct în fiecare dintre tuburile de recoltare a sângelui QFT. Această procedură trebuie efectuată de un flebotomist cu experiență.**
 - Tuburile standard de recoltare a sângelui QFT pot fi utilizate la o altitudine maximă de 810 metri. Tuburile de recoltare a sângelui pentru altitudini mari (HA) QFT pot fi utilizate la altitudini cuprinse între 1020 și 1875 de metri.
 - Dacă tuburile de recoltare a sângelui QFT sunt utilizate în afara acestor intervale de altitudine sau dacă volumul de sânge extras este redus, se poate recolta sânge cu ajutorul unei seringi și în fiecare dintre cele trei tuburi se transferă imediat câte 1 ml de sânge. Din motive de siguranță, este ideal ca această operațiune să fie efectuată scoțând acul seringii, urmând procedurile de siguranță corespunzătoare, îndepărtând capacele celor 3 tuburi QFT și adăugând câte 1 ml de sânge în fiecare tub (până la marcajul negru de pe partea laterală a etichetei tubului). Montați la loc și fixați bine capacele și omogenizați așa cum este descris mai jos.
 - Întrucât sângele se recoltează relativ lent în tuburile de 1 ml, păstrați tubul pe ac timp de 2–3 secunde după ce tubul pare să se fi umplut, pentru a vă asigura că volumul recoltat este corect.

Marcajul negru de pe partea laterală a tuburilor indică nivelul de umplere corespunzător pentru 1 ml. Tuburile de recoltare a sângelui QFT au fost validate pentru volume de la 0,8 la 1,2 ml. În cazul în care nivelul de sânge din oricare dintre tuburi nu este aproape de marcajul negru, se recomandă recoltarea unei alte probe de sânge.
 - Dacă pentru recoltarea sângelui se folosește un ac cu aripioare, trebuie utilizat un tub de purjare, pentru a vă asigura că tubulatura este umplută cu sânge înainte ca tuburile de recoltare a sângelui QFT să fie utilizate.

- Ca alternativă, sângele poate fi recoltat într-un singur tub universal de recoltare a sângelui cu litiu-heparină pe post de anticoagulant, după care poate fi transferat în tuburile QFT. **Utilizați doar litiu-heparină** pe post de anticoagulant sanguin deoarece alți anticoagulanți pot interfera cu testul. Umpleți un tub de recoltare a sângelui (volum minim 5 ml) și amestecați ușor întorcând tubul de câteva ori pentru a dizolva heparina. Sângele trebuie păstrat la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) înainte de a fi transferat în tuburile QFT pentru incubare, procedură care **trebuie** inițiată în decurs de 16 ore de la recoltarea sângelui.
- 2. Imediat după umplere, agitați tuburile de zece (10) ori cu suficientă fermitate ca să vă asigurați că întreaga suprafață interioară a tubului este acoperită cu sânge, pentru a dizolva antigenii de pe pereții tubului.**
- Tuburile trebuie să aibă temperatura între $17\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ în momentul umplerii cu sânge.
 - O scuturare prea puternică poate cauza distrugerea gelului și poate duce la rezultate aberante.
 - Dacă sângele a fost recoltat în tuburi cu heparină, probele trebuie amestecate uniform înainte de a fi transferate în tuburile QFT. Asigurați-vă că sângele este bine amestecat întorcând tubul cu grijă **imediat înaintea transferului**. Transferați părți alicote de 1,0 ml (câte una pentru fiecare tub QFT) în tuburi corespunzătoare Nil, Antigen TB și Mitogen. Este ideal ca această operațiune să fie efectuată aseptice, urmând **procedurile de siguranță corespunzătoare**, îndepărtând capacele celor trei tuburi QFT și adăugând câte 1 ml de sânge în fiecare tub (până la marcajul negru de pe partea laterală a etichetei tubului). Montați la loc și fixați bine capacele tuburilor și omogenizați așa cum este descris mai sus.
- 3. Etichetați tuburile în mod corespunzător.**
- Asigurați-vă că fiecare tub (Nil, Antigen TB, Mitogen) este identificabil pe baza etichetei sau a altor metode, odată ce capacul este îndepărtat.
- 4. După umplere, agitare și etichetare, tuburile trebuie transferate cât mai curând posibil într-un incubator setat la $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, în cel mult 16 ore de la recoltare. Înaintea incubării, păstrați tuburile la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nu refrigerați și nu congelați probele de sânge.**

6. Instrucțiuni de utilizare

Etapa 1 — Incubarea sângelui și recoltarea plasmei

Materialele furnizate

- Tuburi de recoltare a sângelui QFT (consultați Secțiunea 3).

Materiale necesare (dar nefurnizate)

- Consultați Secțiunea 3.

Procedură

1. Dacă tuburile nu sunt incubate imediat după recoltare, trebuie efectuată o reamestecare a conținutului tuburilor prin răsturnarea acestora de 10 ori.
2. Incubați tuburile în poziție VERTICALĂ la $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 16 până la 24 de ore. Incubatorul nu necesită CO_2 sau umidificare.
3. După incubarea la $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, tuburile de recoltare a sângelui pot fi păstrate la temperaturi între $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ și $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de cel mult 3 zile înainte de centrifugare.
4. După incubarea tuburilor la $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, recoltarea plasmei este facilitată prin centrifugarea tuburilor timp de 15 minute la 2.000 până la 3.000 RCF (g). Dopul de gel va separa celulele de plasmă. În caz contrar, tuburile trebuie centrifugate din nou la o viteză mai mare.
 - Recoltarea plasmei fără centrifugare este posibilă, însă este necesară o atenție sporită pentru îndepărtarea plasmei fără afectarea celulelor.
5. Probele de plasmă trebuie recoltate exclusiv cu pipeta.
 - După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea prin aspirarea și eliberarea înapoi și repetată sau amestecarea plasmei înainte de recoltare. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.
 - Probele de plasmă pot fi încărcate din tuburile de recoltare a sângelui centrifugate direct pe placa ELISA QFT, inclusiv atunci când se utilizează stații de lucru automate ELISA.
 - Probele de plasmă pot fi păstrate cel mult 28 de zile la temperaturi cuprinse între $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ și $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, sau, dacă au fost recoltate, la temperaturi sub $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pe perioade de timp îndelungate.
 - Pentru a obține probe de sânge adecvate, recoltați cel puțin 150 μl de plasmă.

Etapa 2 — Testul ELISA pentru IFN- γ uman

Materialele furnizate

- Trusă QFT ELISA (consultați Secțiunea 3).

Materiale necesare, dar nefurnizate

- Consultați Secțiunea 3.

Procedură

1. **Toate probele de plasmă și toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat 100X, trebuie aduse la temperatura camerei (22 °C \pm 5°C) înainte de utilizare. Lăsați-le cel puțin 60 de minute pentru echilibrare.**
2. **Scoateți de pe suport stripurile care nu sunt necesare, ambalați-le la loc în punga de protecție și păstrați-le în frigider cât timp este necesar.**

Alocați cel puțin 1 strip pentru standardele QFT și stripuri suficiente pentru numărul de subiecți supuși testării (consultați Figurile 2A și 2B pentru formatele de 3 tuburi, respectiv de 2 tuburi). După utilizare, păstrați suportul și capacul în vederea utilizării împreună cu stripurile rămase.

3. **Reconstituiți standardul din trusă liofilizat cu volumul de apă deionizată sau distilată indicat pe eticheta flaconului standardului. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura solubilizarea completă. Prin reconstituirea standardului la volumul indicat se va obține o soluție cu o concentrație de 8,0 UI/ml.**

Notă: Volumul de reconstituire a standardului din trusă diferă în funcție de lot.

Utilizați standardul din trusă reconstituit pentru a obține o serie de diluții de IFN- γ de 1 la 4 în diluantul verde (GD) (vezi Figura 1). S1 (Standardul 1) conține 4 UI/ml, S2 (Standardul 2) conține 1 UI/ml, S3 (Standardul 3) conține 0,25 UI/ml și S4 (Standardul 4) conține 0 UI/ml (doar GD). Standardele trebuie testate cel puțin în duplicat.

Procedura recomandată pentru standarde duplicate	Procedura recomandată pentru standarde triplicate
a. Etichetați 4 tuburi cu „S1”, „S2”, „S3”, „S4”.	a. Etichetați 4 tuburi cu „S1”, „S2”, „S3”, „S4”.
b. Adăugați 150 μl de GD în S1, S2, S3, S4.	b. Adăugați 150 μl de GD în S1.
c. Adăugați 150 μl de standard din trusă în tubul S1 și amestecați bine.	c. Adăugați 210 μl de GD în S2, S3, S4.
d. Transferați 50 μl din tubul S1 în tubul S2 și amestecați bine.	d. Adăugați 150 μl de standard din trusă în tubul S1 și amestecați bine.
e. Transferați 50 μl din tubul S2 în tubul S3 și amestecați bine.	e. Transferați 70 μl din tubul S1 în tubul S2 și omogenizați bine.
f. GD simplu servește ca standard zero (S4).	f. Transferați 70 μl din tubul S2 în tubul S3 și amestecați bine.
	g. GD simplu servește ca standard zero (S4).

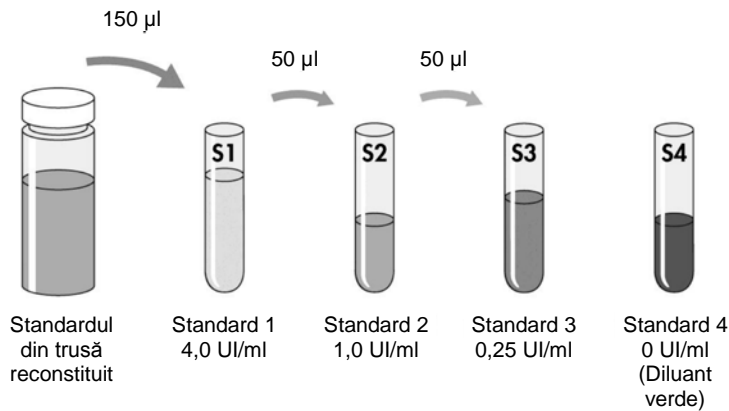


Figura 1. Prepararea curbei standard. Preparați diluții proaspete cu standard din trusă pentru fiecare sesiune de testare ELISA.

4. Reconstituiți conjugatul concentrat 100X liofilizat cu 0,3 ml de apă deionizată sau distilată. Amestecați ușor pentru a minimiza spumarea și a asigura solubilizarea completă a conjugatului.

Concentrația de lucru a conjugatului se obține prin diluarea cantității necesare de conjugat concentrat 100X reconstituit în Diluant Verde, așa cum este precizat în Tabelul 1 – Prepararea conjugatului.

Tabelul 1. Prepararea conjugatului

Numărul de stripuri	Volumul de conjugat concentrat 100X	Volumul de Diluant Verde
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

- Amestecați bine, dar cu atenție, pentru a evita spumarea.
- Readuceți conjugatul concentrat 100X neutilizat la o temperatură între 2 °C și 8 °C imediat după utilizare.
- Utilizați doar Diluant Verde.

5. Pentru probele de plasmă recoltate din tuburile de recoltare a sângelui și ulterior congelate și stocate timp de peste 24 de ore înainte de testare, amestecați bine înainte de a le adăuga la godeul ELISA.
- Dacă probele de plasmă se adaugă direct din tuburile QFT centrifugate, trebuie să evitați orice amestecare a plasmei.
6. Adăugați 50 μl de conjugat în concentrație de lucru proaspăt preparat în godeurile ELISA dorite folosind o pipetă multicanal.
7. Adăugați 50 μl de probe de plasmă pentru testare în godeurile corespunzătoare folosind o pipetă multicanal (consultați configurația de placă recomandată la pagina 15, Figurile 2A și 2B). În final, adăugați câte 50 μl din fiecare dintre standardele de la 1 la 4.

	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

Figura 2A. Configurație de probe recomandată pentru tuburi Nil, Antigen TB și Mitogen (28 de teste per placă).

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4)
- 1N (Proba 1. plasma Nil), 1A (Proba 1. plasmă Antigen TB), 1M (Proba 1. plasmă Mitogen)

	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

Figura 2B. Configurație recomandată pentru tuburile Nil și Antigen TB (44 de teste per placă).

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4)
- 1N (Proba 1. plasma Nil), 1A (Proba 1. plasmă Atigen TB)

8. **Amestecați temeinic conjugatul și probele de plasmă/standardele folosind un agitator pentru microplăci timp de 1 minut.**
9. **Acoperiți fiecare placă cu un capac și incubați la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) timp de 120 ± 5 minute.**
 - Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă pe durata incubării.
10. **În timpul incubării, diluați o parte soluție tampon de spălare concentrată 20X cu 19 părți de apă deionizată sau distilată și omogenizați temeinic. A fost furnizată o cantitate suficientă de soluție tampon de spălare concentrată 20X pentru a prepara 2 litri de soluție tampon de spălare în concentrație de lucru.**

Spălați godeurile cu **400 μl** de soluție tampon de spălare în concentrație de lucru timp de cel puțin 6 cicluri. Este recomandat un spălător de plăci automat.

 - Spălarea temeinică este foarte importantă pentru reușita testului. Asigurați-vă că fiecare godeu este **umplut în întregime** cu soluție tampon de spălare până în partea superioară a godeului pentru fiecare ciclu de spălare. Este recomandată o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.
 - În rezervorul pentru efluent trebuie adăugat dezinfectant standard de laborator, iar pentru decontaminarea materialelor potențial infecțioase trebuie urmate procedurile omologate.
11. **Loviți ușor plăcile așezate cu fața în jos pe un prosop absorbant fără scame pentru a elimina soluția tampon de spălare reziduală. Adăugați 100 μl de soluție de substrat enzimatic în fiecare godeu și amestecați bine, folosind un agitator pentru microplăci.**
12. **Acoperiți fiecare placă cu un capac și incubați la temperatura camerei ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) timp de 30 de minute.**
 - Plăcile nu trebuie expuse la lumină solară directă pe durata incubării.
13. **După 30 de minute de incubare, adăugați câte 50 μl de soluție de inhibitor enzimatic în fiecare godeu și amestecați.**
 - Soluția de inhibitor enzimatic trebuie adăugată în godeuri în aceeași ordine și cu aproximativ aceeași viteză ca și substratul de la pasul 11.
14. **Măsurați Densitatea Optică (DO) a fiecărui godeu în cel mult 5 minute de la stoparea reacției, utilizând un cititor de microplăci prevăzut cu un filtru de 450 nm și un filtru de referință între 620 nm și 650 nm. Valorile DO sunt utilizate pentru calcularea rezultatelor.**

7. Calcule și interpretarea testului

Pentru analiza datelor brute și calcularea rezultatelor, se folosește Software-ul pentru analiză QFT. Acesta este disponibil la www.QuantiFERON.com. Asigurați-vă că este utilizată cea mai nouă versiune a software-ului.

Software-ul efectuează o evaluare a controlului calității testului, generează o curbă standard și furnizează rezultatul testului pentru fiecare subiect, așa cum este detaliat în secțiunea Interpretarea rezultatelor.

Ca o alternativă la utilizarea software-ului pentru analiză QFT, rezultatele pot fi obținute folosind metoda de mai jos.

Generarea curbei standard

(dacă nu este utilizat software-ul pentru analiză QFT)

Determinați media valorilor DO ale duplicatelor standardului din trusă de pe fiecare placă.

Construiți o curbă standard $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$ reprezentând grafic valoarea $\log_{(e)}$ a mediei DO (axa-y) în raport cu valoarea $\log_{(e)}$ a concentrației de IFN- γ a standardelor în UI/ml (axa-x), omițând standardul zero din aceste calcule. Calculați linia care corespunde cel mai bine curbei standard prin analiza de regresie.

Utilizați curba standard pentru determinarea concentrației de IFN- γ (UI/ml) pentru fiecare dintre probele de plasmă testate, utilizând valoarea DO a fiecărei probe.

Aceste calcule pot fi efectuate utilizând pachetele software disponibile împreună cu cititoarele de microplăci și un program de calcul tabelar sau un software statistic standard (ca de exemplu Microsoft® Excel®). Este recomandat ca aceste pachete să fie utilizate pentru a calcula analiza de regresie, coeficientul de variație (CV%) al standardelor și coeficientul de corelație (r) al curbei standard.

Controlul calității testului

Acuratețea rezultatelor testului depinde de generarea unei curbe standard exacte. Din acest motiv, rezultatele obținute pe baza standardelor trebuie examinate înainte ca rezultatele probelor testate să poată fi interpretate.

Pentru ca testul ELISA să fie valid:

- Valoarea medie a DO pentru Standardul 1 trebuie să fie $\geq 0,600$.
- CV% pentru valorile DO duplicate pentru Standardul 1 și Standardul 2 trebuie să fie $\leq 15\%$.
- Valorile DO duplicate pentru Standardul 3 și Standardul 4 nu trebuie să varieze cu mai mult de 0,040 unități de densitate optică față de media lor.
- Coeficientul de corelație (r) calculat pe baza valorilor medii de absorbantă ale standardelor trebuie să fie $\geq 0,98$.

Software-ul pentru analiza QFT calculează și raportează acești parametri de control al calității.

Dacă criteriile de mai sus nu sunt îndeplinite, execuția testului este incorectă și trebuie repetată.

Valoarea medie a DO pentru Standardul zero (Diluantul Verde) trebuie să fie $\leq 0,150$. Dacă valoarea medie a DO este $> 0,150$, trebuie analizată procedura de spălare a plăcilor.

Interpretarea rezultatelor

Rezultatele testului QFT sunt interpretate pe baza următoarelor criterii:

Notă: Confirmarea sau infirmarea diagnosticului de tuberculoză și evaluarea probabilității prezenței LTBI necesită o combinație de informații epidemiologice, de anamneză, medicale și de diagnostic care trebuie luate în considerare atunci când sunt interpretate rezultatele QFT (Tabelele 2 și 3).

Tabelul 2. Când sunt utilizate tuburi Nil, Antigen TB și Mitogen

Nil (UI/ml)	Antigen TB minus Nil (UI/ml)	Mitogen minus Nil (UI/ml)*	Rezultat QFT	Raport/Interpretare
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativ	Infecție cu <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABILĂ
	≥ 0,35 și < 25% din valoarea Nil	≥ 0,5	Negativ	Infecție cu <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABILĂ
	≥ 0,35 și ≥ 25% din valoarea Nil	Orice valoare	Pozitiv [†]	Infecție cu <i>M. tuberculosis</i> probabilă
	< 0,35	< 0,5	Neconcludent [‡]	Rezultatele sunt neconcludente pentru răspunsul la Antigenul-TB
	≥ 0,35 și < 25% din valoarea Nil	< 0,5	Neconcludent [‡]	Rezultatele sunt neconcludente pentru răspunsul la Antigenul-TB
> 8,0 [§]	Orice valoare	Orice valoare	Neconcludent [‡]	Rezultatele sunt neconcludente pentru răspunsul la Antigenul-TB

* Răspunsurile la controlul pozitiv cu Mitogen (și ocazional Antigenul TB) pot fi în afara intervalului cititorului de microplăci. Acest lucru nu influențează rezultatele testelor.

[†] Dacă infecția cu *M. tuberculosis* nu este suspectată, rezultatele inițial pozitive pot fi confirmate prin retestarea probelor originale de plasmă în duplicat în QFT ELISA. Dacă rezultatul retestării unuia sau ambelor duplicate este pozitiv, persoana trebuie considerată ca având un răspuns pozitiv la test.

[‡] Consultați secțiunea „Remediarea problemelor” pentru cauzele posibile.

[§] În cadrul studiilor clinice, mai puțin de 0,25% dintre subiecți au înregistrat niveluri de IFN-γ > 8,0 UI/ml pentru valoarea Nil.

Valoarea nivelului măsurat de IFN-γ nu poate fi corelată cu stadiul sau gradul de infecție, nivelul de răspuns imun sau probabilitatea de progresie spre boala activă.

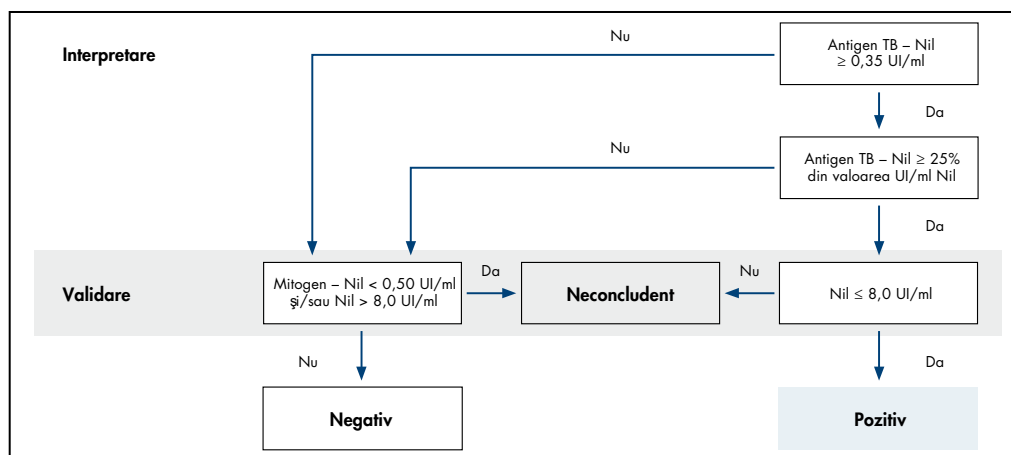


Figura 3. Diagramă de interpretare în cazul în care sunt utilizate tuburile Nil, Antigen TB și Mitogen.

Tabelul 3. Când sunt utilizate doar tuburile QuantiFERON Nil și Antigen TB

Nil (UI/ml)	Antigen TB minus Nil (UI/ml)	Rezultat QFT	Raport/Interpretare
≤ 8,0	< 0,35	Negativ	Infecție cu <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABILĂ
	≥ 0,35 și < 25% din valoarea Nil	Negativ	Infecție cu <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABILĂ
	≥ 0,35 și ≥ 25% din valoarea Nil	Pozitiv*	Infecție cu <i>M. tuberculosis</i> probabilă
> 8,0 [†]	Orice valoare	Neconcludent [‡]	Rezultatele sunt neconcludente pentru răspunsul la Antigenul-TB

* Dacă infecția cu *M. tuberculosis* nu este suspectată, testele inițial pozitive pot fi confirmate prin retestarea probelor originale în duplicat în QFT ELISA. Dacă rezultatul retestării unuia sau ambelor duplicate este pozitiv, persoana trebuie considerată ca având un răspuns pozitiv la test.

[†] În cadrul studiilor clinice, mai puțin de 0,25% dintre subiecți au înregistrat niveluri de IFN- γ > 8,0 UI/ml pentru valoarea Nil.

[‡] Consultați secțiunea „Remediarea problemelor” pentru cauzele posibile.

Valoarea nivelului măsurat de IFN- γ nu poate fi corelată cu stadiul sau gradul de infecție, nivelul de răspuns imun sau probabilitatea de progresie spre boala activă.

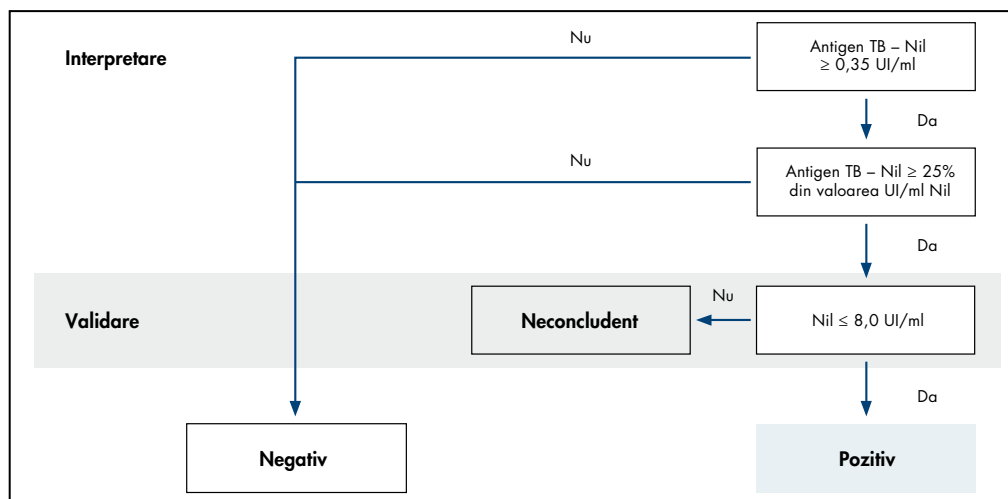


Figura 4. Diagramă de interpretare în cazul în care sunt utilizate tuburile Nil și Antigen TB.

8. Limitări

Rezultatele testului QFT trebuie interpretate împreună cu istoricul epidemiologic, starea curentă de sănătate și alte evaluări de diagnosticare ale fiecărui individ.

Persoanele cu valori Nil mai mari de 8 UI/ml sunt clasificate ca „neconcludente” deoarece un răspuns cu 25% mai mare la antigenii TB poate fi în afara intervalului de măsurare a testului.

Rezultatele nefiabile sau neconcludente se pot datora:

- Abaterii de la procedura descrisă în *Prospectul QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*
- Nivelurilor excesive de IFN- γ circulatorii sau prezența anticorpilor heterofili
- Scurgerii unui interval de timp de peste 16 ore de la recoltarea probei de sânge până la incubarea la 37 °C

9. Caracteristici de performanță

Studii clinice

Deoarece nu există un standard definitiv pentru infecția latentă cu tuberculoză (LTBI), sensibilitatea și specificitatea testului QFT nu pot fi practic evaluate. Specificitatea QFT a fost aproximată prin evaluarea ratelor fals pozitive la persoanele cu risc redus (factori de risc necunoscuți) de infecție cu tuberculoză. Sensibilitatea a fost aproximată prin evaluarea grupurilor de pacienți cu TB activă confirmată prin cultură.

Specificitate

Într-un studiu din Statele Unite cu 866 de voluntari, s-a recoltat sânge pentru QFT în urma efectuării unui TCT. Informațiile demografice și factorii de risc pentru TB s-au determinat cu ajutorul unei cercetări standard la momentul testării. Din 432 de voluntari fără factori de risc cunoscuți pentru infecția cu *M. tuberculosis*, au fost disponibile rezultate QFT și TCT pentru 391. Niciun voluntar nu a fost vaccinat cu BCG. Un al doilea studiu de specificitate cu QFT a fost efectuat în Japonia, la persoane prezentând risc redus, din care, aproximativ 90% au fost vaccinați cu BCG. Rezultatele din cele 2 studii de specificitate sunt ilustrate în Tabelul 4.

Tabelul 4. Specificitate QFT: Rezultate pentru persoane fără risc raportat de infecție cu *M. tuberculosis*

Studiu	Stare BCG (% vaccinați)	Total testați	Nr. QFT neconcludent	Nr. QF pozitiv/ nr. teste valabile	Specificitate QFT (CI 95%)	Nr. TCT pozitiv/nr. testați	Specificitate TCT* (CI 95%)
SUA (nepublicat)	0%	391	1	3/390	99,2% (98–100)	6/391	98,5% (97–99)
Japonia (15)	~90%	168	6	2/162	98,8% (95–100)	–	–
Total	–	559	7/559 (1,3%)	5/552	99,1% (98–100)	–	–

* S-a utilizat pragul de 10 mm TCT la persoane nevaccinate cu BCG. Estimarea de specificitate TCT este de 99,1% dacă se utilizează un prag de 15 mm.

Sensibilitate pentru TB activă

Suspecții de TB din SUA, Australia și Japonia confirmați ulterior prin cultură cu infecție cu *M. tuberculosis* au fost testați pentru a evalua sensibilitatea testului QFT. Având în vedere că nu există un test standard definitiv pentru diagnosticarea infecției latente cu TB (LTBI), cultura microbiologică de *M. tuberculosis* reprezintă un înlocuitor adecvat, ținând cont de faptul că pacienții care suferă de această boală sunt prin definiție, infectați. Pacienții se aflau sub tratament de mai puțin de 8 zile înainte de recoltarea sângelui pentru testarea QFT.

Tabelul 5 rezumă datele obținute de la 3 grupuri de pacienți pozitivi cu *M. tuberculosis* confirmați prin cultură. Sensibilitatea totală a QFT la TB activă a fost de 89% (157/177).

Tabelul 5. QFT: Subiecții cu infecție cu *M. tuberculosis* confirmată prin cultură

Studiu	Nr. QF pozitiv/nr. teste valabile	Sensibilitate QFT (CI 95%)
Pacienți cu TB din Japonia (15)	86/92	93% (86–97%)
Australia	24/27	89% (70–97%)
SUA	47/58	81% (68–90%)
Total	157/177	89% (83–93%)

Diagnosticarea LTBI

Au fost publicate o serie de studii care demonstrează eficacitatea testului QFT la diverse populații aflate sub risc de LTBI. Tabelul 6 conține datele principale obținute dintr-o serie de studii selectate.

Tabelul 6. Studii publicate selectate cu privire la QFT la populațiile aflate sub risc de LTBI

Studiu	Total testați	Rezultate și descoperiri
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Mediu cu rate foarte ridicate de TB. 40% pozitivi la QFT și 41% pozitivi la TCT de 10 mm. Concordanță ridicată cu TCT, niciun efect al BCG asupra niciunei părți. Ambele teste s-au relaționat cu factorii de risc reprezentați de vârstă și perioada de lucru în cadrul sistemului sanitar.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	Prevalența totală a LTBI pe baza QFT a fost de 4,6% (27/590) la persoanele pozitive cu HIV. Rezultatele pozitive s-au asociat cu riscurile de TB. Doi subiecți pozitivi la QFT au progresat înspre TB activă în decurs de 1 an. Răspunsurile neconcludente (n=20, 3,4%) s-au asociat în mod semnificativ cu un număr de celule CD4 < 100/μl.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Copii suspecți de TB sau cu antecedente de contact cu TB au fost testați cu QFT și TCT; 10,5% pozitivi la QFT și 9,5% pozitivi la TCT de 10 mm. Nivelul de concordanță între teste a fost de 95,2% în total și de 100% la pacienții nevaccinați cu BCG.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	Au fost testate contactele apropiate ale 15 cazuri indexate: 51% au fost vaccinați cu BCG, 27% s-au născut în străinătate; 70% din subiecții vaccinați cu BCG și 18% din subiecții nevaccinați au reacționat pozitiv la TCT (5 mm), în vreme ce 9%, respectiv 11% au reacționat pozitiv la QFT. QFT s-a asociat cu riscul de TB. TCT s-a asociat doar cu vaccinarea cu BCG.

O multitudine de alte publicații descriu eficacitatea versiunii lichide mai puțin sensibile a antigenului QuantiFERON-TB Gold (precursorul QFT) și a testului QFT. Aceste studii includ utilizarea testului/testelor în contacte cu cazuri active de TB (9, 11, 19, 25), copii (6–10, 25, 28), pacienți seropozitivi HIV (2, 5, 20), profesioniști din domeniul sănătății (13, 26, 32), pacienți imunodepresivi (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), precum și suspecți de TB (7, 8, 10, 18) și persoane cu risc redus (15).

Repetabilitatea și efectul TCT asupra testării ulterioare cu QFT

Ca parte a studiului de specificitate din SUA, un subgrup de voluntari a fost retestat la un interval cuprins între 4 și 5 săptămâni după testul inițial QFT și TCT. Au fost disponibile rezultate QFT pentru 260 de recruți în ambele momente de timp, iar nivelul de concordanță a fost de 99,6% (259/260). TCT-urile anterioare nu au dus la răspunsuri QFT pozitive.

10. Informații tehnice

Rezultate neconcludente

Rezultatele neconcludente ar trebui să fie rare și pot fi legate de starea imunitară a individului care este testat, dar pot fi, de asemenea, legate de un număr de factori tehnici:

- Un interval de timp mai mare de 16 ore între recoltarea sângelui și incubarea la 37 °C
- Păstrarea sângelui în afara intervalului de temperatură recomandat (între 17 °C și 27 °C)
- Amestecarea insuficientă a tuburilor de recoltare a sângelui
- Spălare insuficientă a plăcii ELISA

Dacă sunt suspectate probleme tehnice legate de recoltarea sau manipularea probelor de sânge, repetați întregul test QFT cu o probă de sânge nouă. Repetarea testului ELISA asupra probelor de plasmă stimulată poate fi realizată dacă este suspectată o spălare necorespunzătoare sau vreo abatere de la procedurile testului ELISA. Nu este de așteptat ca rezultatele neconcludente rezultate din valorile Mitogen scăzute sau valorile Nil ridicate să se schimbe la repetare, cu excepția cazului în care a survenit o eroare în timpul testului ELISA. Rezultatele neconcludente trebuie raportate ca atare. Medicii pot alege să recolteze o nouă probă sau să efectueze alte proceduri, în funcție de caz.

Probe de plasmă coagulate

În cazul în care apar cheaguri de fibrină în urma stocării pe termen lung a probelor de plasmă, centrifugați probele pentru a sedimenta substanța coagulată și a facilita pipetarea plasmei.

Ghid de remediere a problemelor

Acest ghid de remediere a problemelor poate fi util în rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, consultați și Informațiile tehnice furnizate la adresa: www.QuantiFERON.com. Pentru informații de contact, consultați coperta spate.

Remediarea problemelor survenite la trusa ELISA

Colorare nespecifică

Cauză posibilă

- a) Spălare insuficientă a plăcii
- b) Contaminare încrucișată a godeurilor ELISA
- c) Trusa/componentele a(u) expirat
- d) Soluția de substrat enzimatic este contaminată
- e) Amestecarea plasmei în tuburile QFT înaintea recoltării

Soluție

Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 μ l de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.

Aveți grijă când pipetați sau amestecați proba pentru a minimaliza riscul.

Asigurați-vă că utilizați trusa înaintea datei de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100X reconstituite sunt utilizate în cel mult trei luni de la data reconstituirii.

Eliminați substratul dacă acesta se colorează în albastru. Asigurați-vă că utilizați rezervoare curate pentru reactivi.

După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea prin aspirarea și eliberarea înapoi și repetată sau amestecarea plasmei înainte de recoltare. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.

Valori scăzute ale densității optice a standardelor

Cauză posibilă

- a) Eroare la diluarea standardului
- b) Eroare la pipetare
- c) Temperatură de incubare prea mică
- d) Timp de incubare prea scurt
- e) Filtru necorespunzător utilizat pentru cititorul de plăci
- f) Reactivii sunt prea reci
- g) Trusa/componentele a(u) expirat

Soluție

Asigurați-vă că diluțiile standardului din trusă sunt preparate corect, conform Prospectului QFT ELISA.

Asigurați-vă că pipetele sunt calibrate și utilizate conform instrucțiunilor producătorului.

Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Incubarea plăcii cu conjugat, standarde și probe trebuie să dureze 120 ± 5 minute. Soluția de substrat enzimatic este incubată pe placă timp de 30 de minute.

Placa trebuie citită la 450 nm, cu un filtru de referință între 620 și 650 nm.

Toți reactivii, cu excepția conjugatului concentrat 100X, trebuie aduși la temperatura camerei înainte de începerea testării. Această operațiune durează aproximativ o oră.

Asigurați-vă că utilizați trusa înaintea datei de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100X reconstituite sunt utilizate în cel mult 3 luni de la data reconstituirii.

Remedierea problemelor survenite la trusa ELISA

Fond ridicat

Cauză posibilă

a) Spălare insuficientă a plăcii

Soluție

Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.

b) Temperatură de incubare prea mare

Incubarea testului ELISA trebuie efectuată la temperatura camerei (22 °C ± 5 °C).

c) Trusa/componentele a(u) expirat

Asigurați-vă că utilizați trusa înaintea datei de expirare. Asigurați-vă că standardul și conjugatul concentrat 100X reconstituite sunt utilizate în cel mult 3 luni de la data reconstituirii.

d) Soluția de substrat enzimatic este contaminată

Eliminați substratul dacă acesta se colorează în albastru. Asigurați-vă că utilizați rezervoare curate pentru reactivi.

Curbă standard neliniară și variabilitate între duplicate

Cauză posibilă

a) Spălare insuficientă a plăcii

Soluție

Spălați placa de cel puțin 6 ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu. Pot fi necesare mai mult de 6 cicluri de spălare, în funcție de spălătorul utilizat. Este necesară o perioadă de înmuiere de cel puțin 5 secunde între cicluri.

b) Eroare la diluarea standardului

Asigurați-vă că diluțiile standardului din trusă sunt preparate corect, conform Prospectului QFT ELISA.

c) Amestecare insuficientă

Amestecați bine reactivii prin răsturnarea acestora sau cu mișcări circulare anterior adăugării lor pe plăcuță.

d) Tehnică de pipetare inconsecventă sau întrerupere în timpul configurării testului

Adăugarea probei și a standardului trebuie efectuată în mod continuu. Toți reactivii trebuie preparați înainte de a începe testul.

Puteți consulta un material video care ilustrează procedura de testare, precum și soluții la majoritatea problemelor tehnice înregistrându-vă pe site-ul Gnowee™ la adresa www.gnowee.net. Informațiile despre produs și îndrumările tehnice vă sunt puse la dispoziție gratuit de către QIAGEN, prin intermediul distribuitorului dvs., sau al site-ului www.QuantiFERON.com.

11. Bibliografie

Găsiți o listă integrală cu referințele QFT pe site-ul Gnowee — biblioteca QuantiFERON, la adresa www.gnowee.net.

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* **356**, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* **12**, 645.
3. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur. Respir. J.* **33**, 586.
4. Bocchino, M. et al. (2008) 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.* **27**, 907.
5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir. Res.* **7**, 56.
6. Chun, J.K. et al. (2008) 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.* **62**, 389.
7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* **3**, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.
8. Detjen, A.K. et al. (2007) 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.* **45**, 322.
9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* **135**, 1010.
10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN-γ assay for the development of active TB disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 1164.
11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir. Res.* **7**, 77.
12. Dogra, S. et al. (2007) 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.* **54**, 267.
13. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* **4**, e55.
14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology* **13**, 270.
15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J. Infect.* **56**, 348.
16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 33.
17. Kang, Y.A. et al. (2005) 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* **293**, 2756.
18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 1146.
19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss. Med. Wkly.* **138**, 267.
20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 737.

21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* **146**, 761.
22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am. J. Transplant.* **7**, 2797.
23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 84.
24. Mirskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 513.
25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. *Emerging Infect. Dis.* **12**, 1383.
26. Pai, M. et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA* **293**, 2746.
27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) 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.* **35**, 776.
28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur. Respir. J.* **32**, 524.
29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **3**, 981.
30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2799.
31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin. Biochem.* **40**, 913.
32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 681.

12. Servicii de asistență tehnică

Pentru operațiuni de service, consultați:

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific ▪ techservice-ap@qiagen.com

Europe ▪ techserviceQFT-eu@qiagen.com

Middle East/Africa ▪ techserviceQFT-eu@qiagen.com

USA/Canada ▪ techservice-na@qiagen.com

Latin America (not including Brazil or Mexico) ▪ techservice-latam@qiagen.com

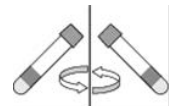
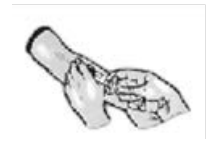
Mexico ▪ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ▪ techsebr@qiagen.com

13. Procedura de testare pe scurt

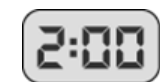
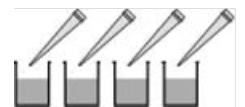
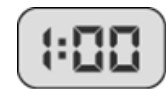
Etapa 1 – Incubarea sângelui

1. Recoltați sângele pacientului în tuburile de recoltare a sângelui și agitați tuburile de zece (10) ori cu suficientă fermitate pentru a vă asigura că întreaga suprafață interioară a tubului este acoperită cu sânge, pentru a dizolva antigenii de pe pereții tubului.
2. Incubați tuburile în poziție verticală la $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 16 până la 24 de ore.
3. După incubare, centrifugați tuburile timp de 15 minute la 2.000 până la 3.000 RCF (g) pentru a separa plasma și hematiele.
4. După centrifugare, evitați sub orice formă pipetarea prin aspirarea și eliberarea înapoi și repetată sau amestecarea plasmei înainte de recoltare. Aveți în permanență grijă să nu afectați materialul de pe suprafața gelului.

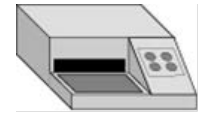
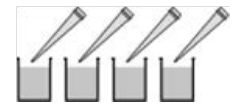
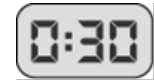
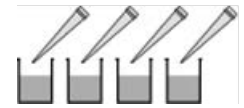


Etapa 2 – Testul ELISA pentru IFN- γ

1. Aduceți componentele trusei ELISA, cu excepția conjugatului concentrat 100X, la temperatura camerei ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) timp de cel puțin 60 de minute.
2. Reconstituiți standardul din trusă la o concentrație de 8,0 UI/ml cu apă distilată sau deionizată. Preparați patru (4) diluții ale standardului.
3. Reconstituiți conjugatul concentrat 100X liofilizat cu apă distilată sau deionizată.
4. Preparați conjugatul în concentrație de lucru în Diluant Verde și adăugați 50 μl în toate godeurile.
5. Adăugați 50 μl din probele de plasmă pentru testare și 50 μl de standarde în godeurile corespunzătoare. Amestecați folosind agitatorul.
6. Incubați timp de 120 ± 5 de minute la temperatura camerei.
7. Spălați godeurile de cel puțin 6 ori cu 400 μl de soluție tampon de spălare pentru fiecare godeu.



8. Adăugați 100 μ l de soluție de substrat enzimatic în godeuri.
Amestecați folosind agitatorul.
9. Incubați timp de 30 de minute la temperatura camerei.
10. Adăugați 50 μ l de soluție de inhibitor enzimatic în toate godeurile.
Amestecați folosind agitatorul.
11. Citiți rezultatele la 450 nm folosind un filtru de referință între 620 și 650 nm.
12. Analizați rezultatele.



Modificări semnificative

Modificările semnificative din această ediție (1075115RO Rev. 01) a Prospectului QFT ELISA sunt rezumate în tabelul de mai jos:

Secțiune	Pagină	Modificare/Modificări
4. Avertizări și precauții	8–9	Modificare la utilizarea anumitor componente ELISA între loturi de truse.
12. Servicii de asistență tehnică	27	Adrese de e-mail noi pentru Service.

Mărci comerciale: QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (Grupul QIAGEN); Microsoft®, Excel® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Acord de licență limitată pentru trusa QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul prospect și doar împreună cu componentele incluse în trusă. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în această trusă cu orice componentă care nu este inclusă în această trusă, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și acest prospect.
2. În afara de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că această trusă și/sau utilizarea(utilizările) acesteia nu încalcă drepturile terților.
3. Această trusă și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute, în afara cazului unei prevederi speciale QIAGEN.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul trusei acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de trusă și/sau componentele acesteia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

© 2013 Cellestis, o companie QIAGEN, toate drepturile rezervate.

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: quantiferon@qiagen.com

