

Navodila za uporabo

QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT[®]) ELISA



2 x 96 (kataloška št. 0594-0201)



20 x 96 (kataloška št. 0594-0501)

Test IFN- γ polne krvi za merjenje reakcij na peptidne antigene ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p4)



Za diagnostično uporabo *in vitro*



0594-0201, 0594-0501

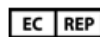


Cellestis, QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Avstralija

Telefon: (Avstralija) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden, NEMČIJA

1075115SL – razl. 01



www.QuantiFERON.com



Vsebina

1. Namen uporabe	4
2. Povzetek in obrazložitev testa	4
Princip testa	5
Trajanje testa	5
3. Sestavni deli in shranjevanje	6
Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo	7
Skladiščenje	7
4. Previdnosti ukrepi in opozorila	8
Za diagnostično uporabo <i>in vitro</i>	8
Opozorila	8
Varnostni ukrepi	9
5. Odvzem vzorcev in ravnanje z njimi	10
6. Navodilo za uporabo	12
1. faza – inkubacija vzorca krvi in odvzem plazme	12
2. faza – človeški IFN- γ ELISA	13
7. Izračunavanje in interpretacija rezultatov	17
Izdelava standardne krivulje	17
Kontrola kakovosti	17
8. Omejitve postopka	19
9. Značilnosti	20
Klinične študije	20
10. Tehnične informacije	22
Nejasni rezultati	22
Vzorci strjene plazme	22
Navodila za odpravljanje težav	23
11. Bibliografija	25
12. Tehnična služba	27
13. Skrajšani testni postopek	28
1. faza – inkubacija krvi	28
2. faza – IFN- γ ELISA	28
Večje spremembe	30

1. Namen uporabe

QuantiFERON-TB Gold (QFT®) je diagnostični test *in vitro*, pri katerem se z uporabo peptidnega koktajla simulira beljakovine ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p4) za stimulacijo celic v heparinizirani polni krvi. Zaznavanje interferona- γ (IFN- γ) z encimskoimunsko metodo (ELISA) se uporablja za prepoznavanje reakcij *in vitro* na peptidne antigene, ki so povezani z okužbo z bakterijo *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT je posredni test za okužbo z bakterijo *M. tuberculosis* (vključno z boleznijo) in je namenjen za uporabo skupaj z oceno tveganja, radiografijo ter drugimi medicinskimi in diagnostičnimi ocenami.

2. Povzetek in obrazložitev testa

Tuberkuloza je nalezljiva bolezen, ki jo povzroči okužba s kompleksnimi organizmi *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), ki se običajno prek zraka kapljično širijo na nove gostitelje z bolnikov s tuberkulozo. Na novo okuženi posameznik lahko zbolijo za tuberkulozo v nekaj tednih ali mesecih, vendar večina okuženih posameznikov ostane zdravih. Pri nekaterih posameznikih se pojavi latentna okužba s tuberkulozo (LTBI), tj. nenalezljiva asimptomatska okužba, ki bi se lahko razvila v tuberkulozo čez več mesecev ali let. Glavni namen diagnosticiranja LTBI je zagotavljanje možnosti za preprečitev tuberkuloze. Do nedavnega je bil tuberkulinski test na koži (TST) edina metoda za diagnosticiranje LTBI. Občutljivost kože na tuberkulin se razvije v od 2 do 10 tednih po okužbi. Nekateri okuženi posamezniki, vključno takšni z različnimi boleznimi, ki ovirajo delovanje imunskega sistema, in takšnimi, ki takih bolezni nimajo, nimajo reakcije na tuberkulin. Nasprotno pa nekateri posamezniki, pri katerih okužba z bakterijo *M. tuberculosis* ni verjetna, kažejo občutljivost na tuberkulin in imajo pozitivne rezultate TST po cepljenju z bacilom Calmette-Guérin (BCG), okužbo z mikobakterijo, ki ni kompleksna *M. tuberculosis*, ali drugih nedoločenih dejavnikov.

LTBI je treba razlikovati od tuberkuloze, bolezni, o kateri je treba poročati, ki običajno vključuje pljuča in spodnji dihalni trakt, čeprav lahko prizadene tudi druge sisteme organov. Diagnoza tuberkuloze se določi na podlagi ugotovitev iz anamneze, telesnega stanja ter radioloških, histoloških in mikobakterioloških preiskav.

QFT je test za merjenje imunskih celičnih reakcij (CMI) na peptidne antigene, ki simulirajo mikobakterijske beljakovine. Beljakovin ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p4) ni v sevih BCG niti v večini netuberkuloznih mikobakterijah, razen v *M. kansasii*, *M. szulgai* in *M. marinum*.(1) Posamezniki, okuženi s kompleksnimi organizmi *M. tuberculosis* imajo običajno v svoji krvi limfocite, ki prepoznajo navedene in druge mikobakterijske antigene. Pri tem procesu prepoznavanja nastaja in se sprošča citokin IFN- γ . Podlaga za ta test je ugotavljanje in posledično kvantificiranje citokina IFN- γ .

Antigeni, ki se uporabljajo pri QFT, so peptidni koktajl, ki simulira beljakovine ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p4). Številne študije so pokazale, da ti peptidni antigeni stimulirajo reakcije IFN- γ v celicah T posameznikov, okuženih z *M. tuberculosis*, vendar na splošno ne v celicah T neokuženih oseb ali oseb, cepljenih z BCG, brez bolezni ali tveganja za LTBI.(1–32) Toda zdravljenja ali bolezni, ki oslabijo delovanje imunskega sistema, lahko zmanjšajo reakcije IFN- γ . Bolniki z nekaterimi drugimi mikobakterijskimi okužbami imajo lahko tudi reakcijo na ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p4), saj so geni, ki kodirajo te beljakovine, prisotni v *M. kansasii*, *M. szulgai* in *M. marinum*.(1, 23) Test QFT je primeren za testiranje za LTBI in je uporaben pripomoček za postavljanje diagnoze kompleksne okužbe z *M. tuberculosis* pri bolnikih. Pozitiven rezultat podpira diagnozo tuberkuloze, vendar je lahko tudi posledica drugih okužb z mikobakterijami (npr. *M. kansasii*). Za potrditev ali izključitev tuberkuloze so potrebne druge medicinske ali diagnostične ocene.

Princip testa

Sistem QFT uporablja specializirane epruvete za odvzem krvi, namenjene odvzemanju polne krvi. Kri v epruveh se najprej od 16 do 24 ur inkubira, nato se odvzame plazma in se jo testira za prisotnost IFN- γ , ki nastaja kot reakcija na peptidne antigene.

Test QFT se izvaja v dveh fazah. Najprej se v posebne epruvete QFT, ki vključujejo nično epruveto, epruveto antigena TB in epruveto mitogena, odvzame polna kri.

Epruveta mitogena se lahko v testu QFT uporablja kot pozitivna kontrola. To je priporočljivo zlasti, če je pacientovo imunsko stanje vprašljivo. Epruveta mitogena je lahko tudi kontrola za pravilno ravnanje s krvjo in pravilno inkubacijo.

Epruvete je treba čim prej inkubirati pri temperaturi 37 °C, obvezno pa v 16 urah po odvzemu krvi. Po 16- oziroma 24-urnem obdobju inkubacije se epruvete centrifugirajo, nato se odvzame plazma in s pomočjo metode ELISA ugotovi količina FN- γ (IE/ml).

Test se šteje za pozitivnega pri reakciji IFN- γ v epruveti antigena TB, če je vrednost znatno nad vrednostjo nične kontrole IFN- γ IE/ml. Če uporabite epruveto mitogena, vzorec plazme v njej deluje kot pozitivna kontrola IFN- γ za vsak testiran vzorec. Majhna reakcija na mitogen (< 0,5 IE/ml) velja kot nejasen rezultat, če vzorec krvi izkazuje tudi negativno reakcijo na antigene TB. Takšen vzorec lahko nastane pri nezadostnem številu limfocitov, zmanjšani aktivnosti limfocitov zaradi nestrokovnega ravnanja z vzorcem, nestrokovnega polnjenja ali mešanja epruvete mitogena ali v primeru, da pacientovi limfociti niso sposobni proizvajati IFN- γ . Nični vzorec se uporablja za korekcijo ozadja, delovanje heterofilnih protiteles ali za korekcijo nespecifičnih IFN- γ v vzorcih krvi. Raven IFN- γ nične epruvete se odšteje od ravni IFN- γ za epruveto antigena TB in epruveto mitogena (če se uporabi).

Trajanje testa

V nadaljevanju besedila so navedeni podatki o ocenjenem trajanju testa QFT in o času, ki je potreben pri testiranju več vzorcev v seriji:

Inkubacija epruveh z vzorci pri 37 °C: od 16 do 24 ur

ELISA: približno 3 ure za eno ploščo ELISA

(od 28 do 44 posameznikov)

< 1 ura dela

še od 10 do 15 minut za vsako dodatno ploščo

3. Sestavni deli in shranjevanje

Blood Collection Tubes (epruvete za odvzem krvi)*	300 epruvel	200 epruvel	100 epruvel
Kataloška številka	T0590-0301	0590-0201	T0593-0201
Število pripravkov	100	100	100
QuantiFERON Nil Tube (nična epruveta) (siv pokrov, bel obroč)	100 epruvel	100 epruvel	
QuantiFERON TB Antigen Tube (epruveta antigena TB) (rdeč pokrov, bel obroč)	100 epruvel	100 epruvel	
QuantiFERON Mitogen Tube (epruveta mitogena) (vijoličen pokrov, bel obroč)	100 epruvel		100 epruvel
Navodila za uporabo epruvel za odvzem krvi QFT	1	1	1
High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (epruvete za odvzem krvi na velikih nadmorskih višinah) (za uporabo med 1020 in 1875 metri)*	300 epruvel	100 epruvel	100 epruvel
Kataloška številka	T0590-0505	0590-0501	T0593-0501
QuantiFERON HA Nil Tube (nična epruveta) (siv pokrov, rumen obroč)	100 epruvel	100 epruvel	
QuantiFERON HA TB Antigen Tube (epruveta antigena TB) (rdeč pokrov, rumen obroč)	100 epruvel	100 epruvel	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (epruveta mitogena) (vijoličen pokrov, rumen obroč)	100 epruvel		100 epruvel
Navodila za uporabo epruvel za odvzem krvi QFT	1	1	1

* Vse konfiguracije izdelka niso na voljo v vseh državah. Več informacij o konfiguracijah, ki so na voljo za naročanje, vam bo posredovala služba za stranke QIAGEN (podrobnosti najdete na spletnem mestu www.qiagen.com).

Sestavni deli ELISA	Komplet 2 plošč ELISA	Referenčni laboratorijski paket
Kataloška številka	0594-0201	0594-0501
Trakovi mikroplošče (12 x 8 jamic), prekriti z glodalskim nečloveškim monoklonskim protitelesom IFN- γ	2 kompleta po 12 x 8-vdolbinskih trakov mikroplošč	20 kompletov po 12 x 8-vdolbinskih trakov mikroplošč
Human IFN- γ Standard, lyophilized (humani standardni IFN- γ , liofiliziran) (vsebuje rekombinantni človeški IFN- γ , goveji kazein, 0,01 % w/v tiomersala)	1 x steklenička (8 IE/ml ob rekonstituciji)	10 x steklenička (8 IE/ml ob rekonstituciji)
Zelena raztopina (vsebuje goveji kazein, normalni mišji serum, 0,01 % w/v tiomersala)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (koncentrat konjugata 100X, liofiliziran) (glodalski nečloveški HRP IFN- γ , vsebuje 0,01 % w/v tiomersala)	1 x 0,3 ml (ob rekonstituciji)	10 x 0,3 ml (ob rekonstituciji)
Wash Buffer 20X Concentrate (koncentrat pralnega pufra 20X) (pH 7,2, vsebuje 0,05 % v/v ProClin [®] 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (raztopina encimskega substrata) (vsebuje H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidin)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (raztopina za blokiranje encimov) (vsebuje 0,5 M H ₂ SO ₄) [†]	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Navodila za uporabo QFT ELISA	1	1

[†] Vsebuje žveplovo kislino. Varnostni ukrepi so navedeni na strani 9.

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

- Inkubator s temperaturo 37 °C. CO₂ ni potreben
- Kalibrirane pipete s spremenljivim volumnom od 10 do 1000 μ l in konicami za enkratno uporabo
- Kalibrirane večkanalne pipete za oddajanje od 50 do 100 μ l s konicami za enkratno uporabo
- Vibrator za mikroplošče
- Deionizirana ali destilirana voda, 2 litra
- Pralni aparat za mikroplošče (priporočen je avtomatski)
- Bralnik mikroplošč s filtrom 450 nm in referenčnim filtrom od 620 do 650 nm

Skladiščenje

Epruvete za odvzem vzorcev krvi

- Epruvete za odvzem krvi skladiščite pri temperaturi od 4 do 25 °C.

Reagenti kompleta

- Reagente kompleta shranjujte v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C.
- Raztopine encimskega substrata ne izpostavljajte neposredni sončni svetlobi.

Rekonstituirani in odvečni reagenti

Navodila za rekonstitucijo reagentov si lahko ogledate v 6. poglavju (stran 13)

- Rok uporabnosti rekonstituiranega standarda kompleta je 3 mesece pri shranjevalni temperaturi med 2 in 8 °C.
Zabeležite si datum rekonstitucije standarda kompleta.
- Po rekonstituciji je treba preostali koncentrat konjugata 100X znova uskladiščiti pri temperaturi od 2 do 8 °C in porabiti v 3 mesecih.
Zabeležite si datum rekonstitucije konjugata.
- Konjugat, pripravljen za uporabo, je treba porabiti v 6 urah po pripravi.
- Rok uporabnosti pralnih pufrov, pripravljenih za uporabo in shranjenih pri sobni temperaturi, je največ 2 tedna.

4. Previdnosti ukrepi in opozorila

Za diagnostično uporabo *in vitro*

Opozorila

- Negativni rezultat QFT ne izključuje možnosti okužbe z *M. tuberculosis* ali tuberkulozo: lažni negativni rezultati so lahko posledica faze okužbe (npr. vzorec odvzet pred razvojem imunske reakcije celic), komorbidnih bolezni, ki vplivajo na delovanje imunskega sistema, nepravilnega ravnanja z epruvetami za odvzem krvi po venski punkciji, nepravilnega izvajanja analize ali drugih imunoloških spremenljivk.
- Pozitivni rezultat QFT ne sme biti edina ali dokončna podlaga za ugotavljanje okužbe z *M. tuberculosis*. Nepravilno izvajanje analize lahko povzroči lažne pozitivne reakcije.
- Pozitivnemu rezultatu QFT bi morale slediti nadaljnje medicinske in diagnostične ocene aktivne tuberkuloze (npr. odvzem brisa in kultura izpljunka, rentgenske preiskave prsnega koša).
- Čeprav beljakovin ESAT-6, CFP-10 in TB7.7(p4) ni v sevih BCG, niti v večini poznanih netuberkuloznih mikobakterijah, je pozitiven rezultat QFT lahko posledica okužbe z *M. kansasii*, *M. szulgai* ali *M. marinum*. Če obstaja sum na takšne okužbe, je treba opraviti alternativne teste.

Varnostni ukrepi

Le za diagnostično uporabo *in vitro*.

Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih. Ti so v priložni in kompaktni obliki PDF na voljo v spletu na naslovu www.qiagen.com/safety, kjer lahko najdete, preberete in natisnete varnostne liste za vse komplete QIAGEN in njihove sestavne dele.



POZOR: S človeško krvjo ravnajte, kot če bi bila kužna.

Upoštevajte ustrezna navodila za ravnanje s krvjo.

Za sestavne dele QuantiFERON-TB Gold ELISA veljajo naslednji opozorilni in obvestilni stavki.

Raztopina za blokiranje encimov QuantiFERON



Xi

Vsebuje žveplovo kislino: Draži. Opozorilni in obvestilni stavki: * R36/38, S26-36/37/39

- **Zelena raztopina** vsebuje normalni mišji serum in kazein. Ti dve substanci lahko izzoveta alergične reakcije. Izogibajte se stiku s kožo.

Za nujne kemične primere

Razlitje, puščanje, izpostavljenost ali nesreča

Podnevi ali ponoči pokličite CHEMTREC

V ZDA in Kanadi: 1-800-424-9300

Drugod po svetu: +1-703-527-3887 (tudi klici na stroške klicanega)

Dodatne informacije

Varnostni listi: www.qiagen.com/safety

- Odmiki od *navodil za uporabo QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA* lahko povzročijo nepravilne rezultate. Pred uporabo pozorno preberite navodila.
- Kompleta ne uporabljajte, če steklenica reagenta pred uporabo kaže znake poškodb ali puščanja.
- Ne mešajte ali uporabljajte trakov mikroplošč, človeškega standardnega IFN- γ , zelene raztopine ali koncentrata konjugata 100X iz različnih serij kompletov QFT. Ostale reagente (koncentrat pralnega pufra 20X, raztopina encimskega substrata in raztopina za blokiranje encimov) lahko uporabljate z več kompleti, če imajo veljavni rok uporabnosti in zabeležene podrobnosti o seriji. Reagente in biološke vzorce, ki jih ne potrebujete več, zavržite v skladu z lokalnimi in nacionalnimi predpisi.
- Epruvet za odvzem krvi oziroma kompleta ELISA po preteku roka uporabnosti ne smete več uporabljati.
- Zagotoviti morate, da je bila laboratorijska oprema, kot so pralni avtomat za mikroplošče in bralniki, kalibrirana/potrjena za uporabo.

* R36/38: Draži oči in kožo; S26: Če pride v oči, takoj izprati z obilo vode in poiskati zdravniško pomoč; S36/37/39: Nositi primerno zaščitno obleko, zaščitne rokavice in zaščito za oči/obraz.

5. Odvzem vzorcev in ravnanje z njimi

QFT obsega naslednje epruvete za odvzem krvi:

1. Nične epruvete QuantiFERON (siv pokrov z belim obročem; uporaba na nadmorski višini do 810 m)
2. Epruvete antigena TB QuantiFERON (rdeč pokrov z belim obročem; uporaba na nadmorski višini do 810 m)
3. Epruvete mitogena QuantiFERON (vijoličen pokrov z belim obročem; uporaba na nadmorski višini do 810 m)

Epruvete za odvzem krvi na velikih nadmorskih višinah:

4. Nične epruvete QuantiFERON HA (siv pokrov z rumenim obročem; uporaba na od 1020 do 1875 m nadmorske višine)
5. Epruvete antigena TB QuantiFERON HA (rdeč pokrov z rumenim obročem; uporaba na od 1020 do 1875 m nadmorske višine)
6. Epruvete mitogena QuantiFERON HA (vijoličen pokrov z rumenim obročem; uporaba na od 1020 do 1875 m nadmorske višine)

Antigeni so posušeni v oblogi notranje stene epruvete za odvzem krvi, zato je treba vzorce krvi obvezno dobro premešati z vsebino epruvete. Epruvete je treba čim prej prenesti v inkubator, nastavljen na 37 °C, obvezno pa v 16 urah po odvzemu krvi.

Optimalni rezultati se dosežejo z upoštevanjem naslednjih navodil:

1. Vsaki osebi odzemetite po 1 ml venske krvi v vsako epruveto QFT. Ta postopek mora opraviti usposobljeni flebotomist.

- Standardne epruvete za odvzem krvi se uporabljajo do nadmorske višine 810 m. Epruvete QFT za odvzem krvi na veliki nadmorski višini se uporabljajo na nadmorskih višinah od 1020 do 1875 metrov.
- Če epruvete za odvzem krvi QFT uporabljate na drugačni nadmorski višini od navedenih ali če je volumen odvzetega vzorca krvi majhen, lahko kri odzametete tudi z brizgalko in vsako od treh epruвет nemudoma napolnite z 1 ml krvi. Iz varnostnih razlogov je najbolje, če pri tem odstranite injekcijsko iglo in upoštevate običajne previdnostne ukrepe. Odstranite pokrovčke z vseh 3 epruвет QFT in napolnite vsako z 1 ml krvi (do črne oznake na stranskem robu etikete). Nato znova namestite pokrovčke in premešajte, kot je opisano spodaj.
- 1-ml epruveta za odvzem krvi se relativno počasi polni s krvjo, zato jo pustite še 2–3 sekunde na igli, ko je že videti polna, da zagotovite odvzem zadostne količine krvi.

Črna oznaka ob strani epruvete označuje polnilni volumen 1 ml. Epruvete za odvzem krvi QFT so testirane za volumen od 0,8 do 1,2 ml. Če odvzeta kri v epruveti ne doseže te indikatorske črte, priporočamo nov odvzem krvi.

- Pri uporabi „metuljčkov“ za odvzem krvi je treba s pomočjo prazne epruvete poskrbeti za to, da bo pred namestitvijo epruвет QFT zagotovljena napolnjenost cevnega spoja.
- Kri je mogoče odvzeti v eno generično epruveto za odvzem krvi, ki vsebuje antikoagulant litijev heparin, in jo nato prenesti v epruvete QFT. Kot krvni antikoagulant **uporabite le litijev heparin**, saj drugi antikoagulant ovirajo analizo. Napolnite epruveto za odvzem krvi (najmanjši volumen 5 ml) in jo nežno premešajte, tako da jo večkrat obrnete, da se heparin raztopi. Pred pričetkom inkubacije epruвет QFT morate kri hraniti na sobni temperaturi (22 °C ± 5 °C). Inkubacija se **mora** pričeti v 16 urah po odvzemu krvi.

2. **Ko epruvete napolnite, jih takoj desetkrat (10) tako močno stresite, da postane celotna notranja površina prekrita s krvjo in se antigeni na stenah epruvete raztopijo.**
 - Epruvete morajo imeti v času polnjenja s krvjo temperaturo 17–25 °C.
 - Premočno stresanje lahko povzroči motnje gela in privede do napačnih rezultatov.
 - Če je bila kri odvzeta v epruveto s heparinom, morate vzorce enakomerno premešati, preden jih razdelite v epruvete QFT. Zagotovite, da je kri temeljito premešana, tako da jo **tik pred razdelitvijo** nežno obrnete. Enakomerne deleže po 1,0 ml (en na epruveto QFT) porazdelite v primerno nično epruveto, epruveto antigena TB in epruveto mitogena. Najboljše je aseptično izvajanje in **upoštevanje običajnih varnostnih ukrepov**. Odstranite pokrovčke z vseh treh epruvet QFT in napolnite vsako z 1 ml krvi (do črne oznake na stranskem robu etikete). Nato znova namestite pokrovčke in premešajte, kot je opisano zgoraj.
3. **Epruvete opremite z etiketami.**
 - Zagotovite, da je mogoče po odstranitvi pokrovčka vsako epruveto (nično epruveto ter epruveti antigena TB in mitogena) prepoznati po etiketi ali kako drugače.
4. **Po polnjenju, pretresanju in označevanju z etiketami je treba epruvete čim prej, prenesti v inkubator (37 °C ± 1 °C), obvezno pa v 16 urah po odvzemu krvi. Do pričetka inkubacije morate epruvete hraniti na sobni temperaturi (22°C ± 5°C). Vzorcev krvi ne shranjujte v hladilniku ali zamrzovalniku.**

6. Navodilo za uporabo

1. faza – inkubacija vzorca krvi in odvzem plazme

Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo

- Epruvete za odvzem krvi QFT (glejte 3. poglavje).

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

- Glejte 3. poglavje.

Postopek

1. Če epruвет ne inkubirate takoj po odvzemu, jih morate neposredno pred inkubacijo premešati, tako da jih 10-krat obrnete na glavo.
2. Epruvete inkubirajte v **STOJEČEM POLOŽAJU** pri $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ od 16 do 24 ur. CO_2 ali vlaženje pri tem nista potrebna.
3. Po inkubaciji pri 37 °C lahko epruvete za odvzem krvi pred centrifugiranjem do 3 dni hranite pri temperaturi od 4 do 27 °C .
4. Po inkubaciji epruвет pri 37 °C opravite 15-minutno centrifugiranje pri od 2000 do 3000 RCF (g), kar olajša odvzem plazme. Celice se ločijo od plazme. Če se to ne zgodi, centrifugiranje ponovite pri višji hitrosti.
 - Odvzem plazme je mogoč tudi brez centrifugiranja, vendar je treba pri tem postopati zelo previdno, ker se lahko pri odvzemu celice vzvrtinčijo.
5. **Vzorci plazme odvezajte le s pomočjo pipete.**
 - Po centrifugiranju se izogibajte pipetiranju gor in dol ali kakršnemu koli mešanju plazme pred odvezanjem. Vseskozi pazite, da ne poškodujete materiala na površini gela.
 - Vzorci plazme je mogoče iz epruвет za odvzem krvi prenesti neposredno v ploščo QFT ELISA, tudi pri uporabi avtomata ELISA.
 - Vzorci plazme je mogoče do 28 dni hraniti pri temperaturi $2\text{--}8\text{ °C}$ oziroma dalj časa pri temperaturi, nižji od -20 °C , če se plazma odvzame.
 - Za primerne testne vzorce odvezajte vsaj $150\ \mu\text{l}$ plazme.

2. faza – človeški IFN- γ ELISA

Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo

- Komplet QFT ELISA (glejte 3. poglavje).

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

- Glejte 3. poglavje.

Postopek

1. Vsi vzorci plazme in reagentov z izjemo koncentrata konjugata 100X morajo pred uporabo doseči sobno temperaturo (od 22 do 5 °C). Za ta proces načrtujte najmanj 60 minut.
2. Iz okvira odstranite nepotrebne trakove, jih spravite nazaj v folijsko embalažo in jih do uporabe shranjujte v hladilniku.

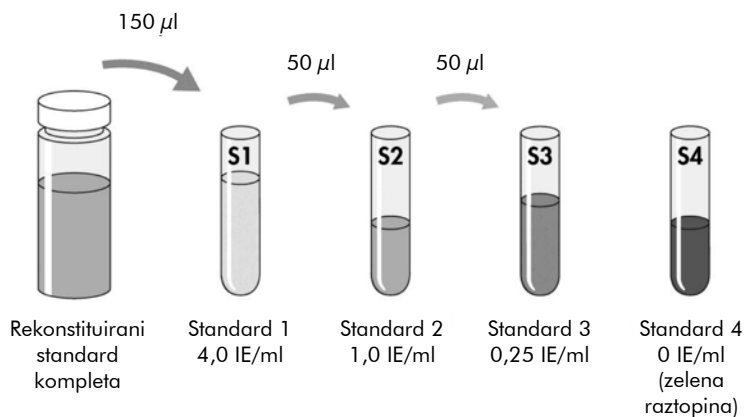
Zagotovite vsaj 1 trak za standarde QFT in zadostno število trakov za število testiranih oseb (glejte slike 2A in 2B za 3-epruvene in 2-epruvene formate). Po uporabi okvir in pokrov shranite za uporabo z ostalimi trakovi.

3. Rekonstituirajte suho zamrznjen standarda kompleta s količino deionizirane ali destilirane vode, ki je navedena na etiketi stekleničke standarda. Previdno premešajte stekleničko (da se vsebina čim manj peni) in preverite, ali se je vsebina popolnoma razpustila. Z rekonstitucijo standarda v kompletu na navedeni volumen pripravite raztopino s koncentracijo 8,0 IE/ml.

Opomba: Rekonstituiran volumen standarda kompleta se bo med serijami razlikoval.

Uporabite rekonstituiran standard kompleta za izdelavo 1 od 4 serij raztopine IFN- γ v zeleni raztopini (GD) (glejte sliko 1). S1 (standard 1) vsebuje 4 IE/ml, S2 (standard 2) vsebuje 1 IE/ml, S3 (standard 3) vsebuje 0,25 IE/ml in S4 (standard 4) vsebuje 0 IE/ml (samo GD). Standardi morajo biti analizirani vsaj podvojeno.

Priporočen postopek za podvojene standarde	Priporočen postopek za potrojene standarde
a. 4 epruvete opremite z napisi „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.	a. 4 epruvete opremite z napisi „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.
b. Dodajte 150 μl GD v S1, S2, S3, S4.	b. Dodajte 150 μl GD v S1.
c. Dodajte 150 μl standarda kompleta v S1 in skrbno premešajte.	c. Dodajte 210 μl GD v S2, S3, S4.
d. Prenesite 50 μl iz S1 v S2 in skrbno premešajte.	d. Dodajte 150 μl standarda kompleta v S1 in skrbno premešajte.
e. Prenesite 50 μl iz S2 v S3 in skrbno premešajte.	e. Prenesite 70 μl iz S1 v S2 in skrbno premešajte.
f. Samo GD velja kot nični standard (S4).	f. Prenesite 70 μl iz S2 v S3 in skrbno premešajte.
	g. Samo GD velja kot nični standard (S4).



Slika 1. Izdelava standardne krivulje. Za vsak postopek ELISA izdelajte novo razredčilo standarda kompleta.

4. Rekonstituirajte suho zamrznjen koncentrat konjugata 100X z 0,3 ml deionizirane ali destilirane vode. Previdno premešajte stekleničko, da je penjenja čim manj, in preverite, ali se je konjugat popolnoma razpusil.

Konjugat je pripravljen za uporabo, ko potrebno količino rekonstituiranega koncentrata 100X razredčite v zeleni raztopini za redčenje, kot je prikazano v preglednici 1 – Priprava konjugata.

Preglednica 1. Priprava konjugata

Število trakov	Količina koncentrata konjugata 100X	Količina zelene raztopine
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

- Temeljito, vendar previdno premešajte; pri tem se izogibajte penjenju.
- Koncentrat konjugata 100X, ki ga ne potrebujete, takoj po uporabi shranite pri temperaturi od 2 do 8 °C.
- Kot razredčilo uporabljajte samo zeleno raztopino za redčenje.

5. Vzorce plazme, ki jih odvezmete iz epruвет za odvzem krvi in nato pred analizo zamrznete ali shranite za več kot 24 ur, pred dodajanjem v vdolbino ELISA skrbno premešajte.

- Če vzorce plazme dodate neposredno iz centrifugiranih epruвет QFT, kakršno koli mešanje plazme ni primerno.

6. Z večkanalno pipeto dajte v vdolbine ELISA po 50 μ l sveže pripravljenega konjugata.

7. Z večkanalno pipeto dajte 50 μ l testnih vzorcev plazme v primerne vdolbine (glejte priporočeno postavitev plošče na strane 15, sliki 2A in 2B). Nazadnje dodajte še po 50 μ l standardov od 1 do 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

Slika 2A. Priporočena postavitev vzorcev za nične epruветe, epruветe antigena TB in epruветe mitogena (28 testov na ploščo).

- S1 (standard 1), S2 (standard 2), S3 (standard 3), S4 (standard 4)
- 1N (1. vzorec, nična plazma), 1A (1. vzorec, plazma antigena TB), 1M (1. vzorec, plazma mitogena)

	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

Slika 2B. Priporočena postavitev vzorcev za nične epruветe in epruветe antigena TB (44 testov na ploščo).

- S1 (standard 1), S2 (standard 2), S3 (standard 3), S4 (standard 4)
- 1N (1. vzorec, nična plazma), 1A (1. vzorec, plazma antigena TB)

8. **Konjugat in vzorce plazme/standarde 1 minuto skrbno mešajte v vibratorju za mikroplošče.**
9. **Vsako ploščo pokrijte s pokrovom in plošče 120 ± 5 minut inkubirajte pri sobni temperaturi (22 °C ± 5 °C).**
 - Med inkubacijo morajo biti plošče zaščitene pred neposrednimi sončnimi žarki.
10. **Med inkubacijo razredčite en del koncentrata pralnega pufra 20X z 19 deli deionizirane ali destilirane vode in skrbno premešajte. Dobavi je priložena dovolj koncentrata pralnega pufra 20X za izdelavo 2 litrov pralnega pufra, pripravljenega za uporabo.**

Vdolbine najmanj 6-krat operite s **400 µl** pralnega pufra, pripravljenega za uporabo. Priporočamo uporabo pralnega avtomata za mikroplošče.

 - Temeljito pranje je zelo pomembno za učinkovitost testiranja. Pri vsakem pralnem ciklusu preverite, ali so vdolbine **popolnoma napolnjene** s pralnim pufrom, torej do zgornjega roba. Med posameznimi pralnimi cikli priporočamo fazo namakanja, ki naj traja vsaj 5 sekund.
 - V lovilno posodo za odpadno tekočino dajte standardno razkužilo, ki se uporablja v laboratorijih. Poleg tega upoštevajte navodila za dekontaminacijo potencialno kužnega materiala, ki veljajo v vašem laboratoriju.
11. **Plošče z vdolbinami obrnjenimi navzdol iztrkajte na brisačo brez bombažnih vlaken in tako odstranite ostanke pralnega pufra. V vsako vdolbino nato nalijte 100 µl raztopine za blokiranje encimov in premešajte ploščo v vibratorju.**
12. **Vsako ploščo pokrijte s pokrovom in plošče 30 minut inkubirajte pri sobni temperaturi (22 °C ± 5 °C).**
 - Med inkubacijo morajo biti plošče zaščitene pred neposrednimi sončnimi žarki.
13. **Po 30-minutni inkubaciji nalijte v vsako vdolbino 50 µl raztopine za blokiranje encimov in premešajte.**
 - Raztopino za blokiranje encimov nalivajte v vdolbine v enakem zaporedju in približno enako hitro kot substrat v 11. koraku.
14. **Z bralnikom mikroplošč izmerite optično gostoto (OD) vsake vdolbine v 5 minutah po dodajanju raztopine za blokiranje – pri tem uporabljajte filter s 450 nm in referenčni filter z od 620 do 650 nm. Za izračunavanje rezultatov se uporabijo vrednosti OD.**

7. Izračunavanje in interpretacija rezultatov

Programska oprema za analizo QFT se uporablja za analizo surovih podatkov in za izračun rezultatov. Na voljo je na spletnem mestu www.QuantiFERON.com. Uporabite najnovejšo različico programske opreme.

Programska oprema izvaja kontrolno oceno kakovosti testiranja, izdelava standardno krivuljo in za vsako testirano osebo posreduje rezultat, kot je opisano v poglavju „Interpretacija rezultatov“.

Alternativno uporabi programske opreme QFT za analizo podatkov se lahko rezultati izračunavajo tudi po spodaj opisani metodi.

Izdelava standardne krivulje

(če ne uporabljate programske opreme za analizo QFT)

Ugotovite srednje vrednosti OD pri ponovitvah standarda kompleta na vsaki plošči.

Izdelajte standardno krivuljo $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ z grafičnim prikazom srednje vrednosti OD $\log_{(e)}$ (y-os) proti $\log_{(e)}$ koncentracije standarda IFN- γ v IE/ml (x-os); nični standard pri tem izpustite. S pomočjo regresivne analize izračunajte linijo, ki se oblikovno najbolj prilagaja standardni krivulji.

S pomočjo standardne krivulje izračunajte koncentracije IFN- γ (IE/ml) za vsak testirani vzorec plazme, pri čemer uporabite vrednost OD vsakega vzorca.

Za te izračune lahko uporabljate pakete programske opreme, ki so v ponudbi za bralnike mikroplošč, oziroma standardne programe z razpredelnicami ali statistične programe (na primer Microsoft® Excel®). Uporabo teh paketov programske opreme priporočamo za izračunavanje regresijske analize in variacijskih koeficientov (% CV) za standard ter korelacijskih koeficientov (r) za standardno krivuljo.

Kontrola kakovosti

Pravilnost testnih rezultatov je odvisna od izdelave pravilne standardne krivulje. Zato je treba rezultate, ki so pridobljeni s standardi, preveriti pred interpretiranjem testnih rezultatov.

ELISA velja, če so izpolnjeni vsi naslednji kriteriji:

- Srednja vrednost OD standarda 1 mora biti $\geq 0,600$.
- % CV repliciranih vrednostih OD standarda 1 in standarda 2 mora biti $\leq 15\%$.
- Replicirane vrednosti OD standarda 3 in standarda 4 ne smejo za več kot 0,040 enote OD odstopati od srednje vrednosti vsakega od njiju.
- Korelacijski koeficient (r), izračunan iz srednjih absorpcijskih vrednosti, mora biti $\geq 0,98$.

Programska oprema za analizo QFT izračuna parametre kontrole kakovosti in o njih poroča.

Če ta merila niso izpolnjena, je test neveljaven in ga je treba ponoviti.

Srednja vrednost OD ničnega standarda (zelena raztopina) mora biti $\leq 0,150$. Če je srednja vrednost OD $> 0,150$, priporočamo, da preverite postopek za pranje plošč.

Interpretacija rezultatov

Rezultati QFT se interpretirajo po naslednjih merilih:

Opomba: Za postavljanje in izključevanje diagnoze tuberkuloze ter ocenjevanje verjetnosti LTBI je potrebno upoštevati kombinacijo ugotovitev anamneze ter epidemioloških, medicinskih in diagnostičnih preiskav pri interpretiranju rezultatov QFT (preglednici 2 in 3).

Preglednica 2. Ko so uporabljene nična epruveta, epruveta antigena TB in epruveta mitogena

Nična (IE/ml)	Antigen TB minus nična (IE/ml)	Mitogen minus nična (IE/ml)*	Rezultati QFT	Poročilo/interpretacija
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	negativno	okužba z <i>M. tuberculosis</i> NI verjetna
	≥ 0,35 in < 25 % nične vrednosti	≥ 0,5	negativno	okužba z <i>M. tuberculosis</i> NI verjetna
	≥ 0,35 in ≥ 25 % nične vrednosti	poljubno	pozitivno [†]	okužba z <i>M. tuberculosis</i> je verjetna
	< 0,35	< 0,5	nejasno [‡]	rezultati za reakcijo na antigen TB so nejasni
	≥ 0,35 in < 25 % nične vrednosti	< 0,5	nejasno [‡]	rezultati za reakcijo na antigen TB so nejasni
> 8,0 [§]	poljubno	poljubno	nejasno [‡]	rezultati za reakcijo na antigen TB so nejasni

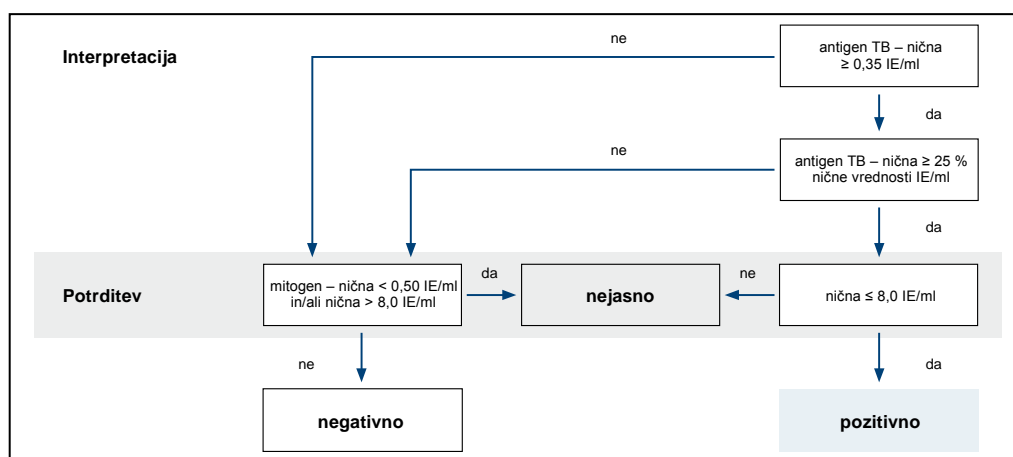
* Reakcije na pozitivno kontrolo mitogena (in občasno antigena TB) so lahko pogosto zunaj obsega bralnika mikroplošč. To ne vpliva na rezultate testa.

[†] Če ni suma na okužbo z *M. tuberculosis*, je mogoče prvotno pozitivne rezultate potrditi s ponovnim testiranjem podvojenih izhodiščnih vzorcev plazme v QFT ELISA. Če je ponovljeni test enega ali obeh podvojenih primerkov pozitiven, se test posameznika obravnava kot pozitiven.

[‡] Možne vzroke poiščite v poglavju „Odpravljanje težav“.

[§] V kliničnih študijah je imelo manj kot 0,25 % oseb za nične vrednosti ravni IFN- γ > 8,0 IE/ml.

Velikosti izmerjene ravni IFN- γ ni mogoče postaviti v soodnosnost s fazo ali stopnjo okužbe, ravnjo imunske reakcije ali verjetnostjo za napredovanje v aktivno bolezen.



Slika 3. Interpretacija diagrama poteka, ko so uporabljene nična epruveta, epruveta antigena TB in epruveta mitogena

Preglednica 3. Ko se uporabita le nična epruveta in epruveta antigena TB QuantiFERON

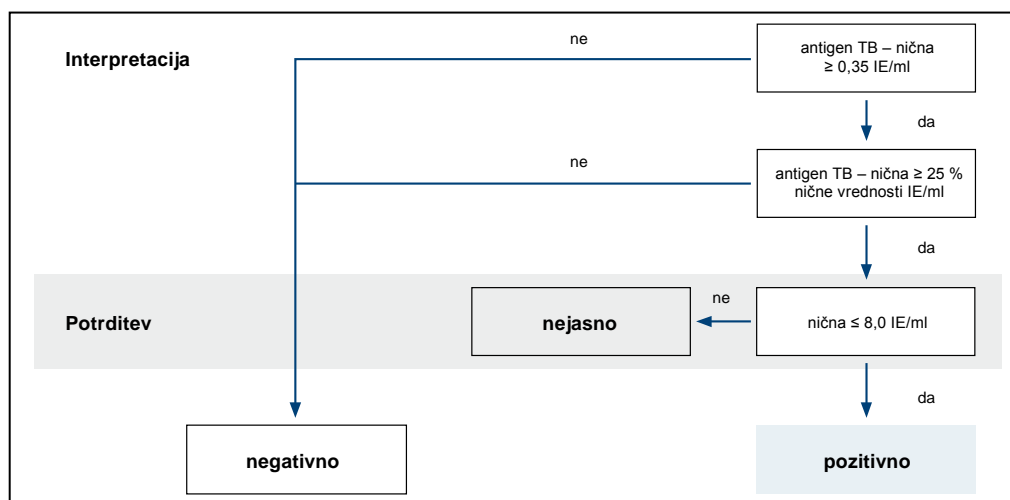
Nična (IE/ml)	Antigen TB minus nična (IE/ml)	Rezultati QFT	Poročilo/interpretacija
	< 0,35	negativno	okužba z <i>M. tuberculosis</i> NI verjetna
≤ 8,0	≥ 0,35 in < 25 % nične vrednosti	negativno	okužba z <i>M. tuberculosis</i> NI verjetna
	≥ 0,35 in ≥ 25 % nične vrednosti	pozitivno*	okužba z <i>M. tuberculosis</i> je verjetna
> 8,0 [†]	poljubno	nejasno [‡]	rezultati za reakcijo na antigen TB so nejasni

* Če ni suma na okužbo z *M. tuberculosis*, je mogoče prvotno pozitivne rezultate potrditi s ponovnim testiranjem podvojenih izhodiščnih vzorcev plazme v QFT ELISA. Če je ponovljeni test enega ali obeh podvojenih primerkov pozitiven, se test posameznika obravnava kot pozitiven.

[†] V kliničnih študijah je imelo manj kot 0,25 % oseb za nične vrednosti ravni IFN- γ > 8,0 IE/ml.

[‡] Možne vzroke poiščite v poglavju „Odpravljanje težav“.

Velikosti izmerjene ravni IFN- γ ni mogoče postaviti v soodnosnost s fazo ali stopnjo okužbe, ravnjo imunske reakcije ali verjetnostjo za napredovanje v aktivno bolezen.



Slika 4. Interpretacija diagrama poteka, ko se uporabita nična epruveta in epruveta antigena TB.

8. Omejitve postopka

Rezultate testa QFT je treba obravnavati v kombinaciji z epidemiološko anamnezo vsakega pacienta, njegovim trenutnim zdravstvenim stanjem in drugimi diagnostičnimi preiskavami.

Rezultati pri posamezniki z ničnimi vrednostmi, višjimi od 8 IE/ml, so uvrščeni v kategorijo „nejasno“, saj je lahko 25-odstotno višja reakcija na antigene TB zunaj merilnega obsega analize.

Vzroki za nezanesljive ali nejasne rezultate so lahko naslednji:

- Odstopanja od postopka, opisanega v navodilih za uporabo QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA.
- Čezmerne ravni kroženja IFN- γ ali prisotnost heterofilnih protiteles.
- Prekoračenje 16-urnega roka med odvzemom vzorca krvi in inkubacijo pri 37 °C.

9. Značilnosti

Klinične študije

Ker za diagnozo latentne okužbe s tuberkulozo (LTBI) ne obstaja noben dokončen standard, analiza občutljivosti in specifičnosti testa QFT praktično ni mogoča. Specifičnost QFT je bila približno izračunana z oceno lažnih pozitivnih stopenj pri osebah z nizko stopnjo tveganja (ni znanih dejavnikov tveganja) okužbe s tuberkulozo. Občutljivost je bila približno izračunana z ocenjevanjem skupine bolnikov, pri katerih je bila s kulturami potrjena aktivna tuberkuloza.

Specifičnost

V študiji v ZDA, v kateri je sodelovalo 866 prostovoljcev, so odvzeli kri za testiranje QFT, ko je bil opravljen test TST. Z uporabo standardne ankete so v času testiranja določili demografske informacije in dejavnike tveganja. Rezultati QFT in TST so bili na voljo za 391 od 432 prostovoljcev, pri katerih ni bilo znanih dejavnikov tveganja za okužbo *M. tuberculosis*. Nihče od njih ni bil cepljen proti BCG. Druga študija specifičnosti s QFT je bila izvedena na Japonskem pri posameznikih z nizko stopnjo tveganja, od katerih je bilo približno 90 % cepljenih proti BCG. Rezultati 2 študij specifičnosti so prikazani v preglednici 4.

Preglednica 4. Specifičnost QFT: Rezultati za osebe, za katere ni znanih tveganj za okužbo *M. tuberculosis*

Študija	Status BCG (% cepljenih)	Skupaj testiranih	Št. nejasnih QFT	Št. pozitivnih QFT/št. veljavnih testov	Specifičnost QFT (95 % CI)	Št. pozitivnih TST/št. testov	Specifičnost TST* (95 % CI)
ZDA (neobjavljeno)	0 %	391	1	3/390	99,2 % (98–100)	6/391	98,5 % (97–99)
Japonska (15)	~90 %	168	6	2/162	98,8 % (95–100)	–	–
Skupaj	–	559	7/559 (1,3 %)	5/552	99,1 % (98–100)	–	–

* Uporaba 10 mm odreza TST pri ljudeh, ki niso bili cepljeni proti BCG. Specifičnost TST ocenjuje 99,1 %, če se uporabi odrez 15 mm.

Občutljivost na aktivno TB

Posameznike s sumom na TB iz ZDA, Avstralije in Japonske, pri katerih so pozneje s kulturami potrdili okužbo z *M. tuberculosis*, so testirali, da bi ocenili občutljivost na QFT. Dokončen standardni test za latentno okužbo s TB (LTBI) ne obstaja, toda primerno nadomestilo zanj je ugotavljanje mikrobiološke kulture *M. tuberculosis*, saj so bolniki s to boleznijo po definiciji okuženi. Bolniki so pred odvzemom krvi za testiranje QFT prejeli manj kot 8 dni zdravljenja.

Preglednica 5 povzema ugotovitve iz 3 skupin bolnikov, ki so imeli pozitivne kulture *M. tuberculosis*. Skupna občutljivost QFT za aktivno TB je bila 89 % (157/177).

Preglednica 5. QFT: Osebe, pri katerih je bila s kulturo potrjena okužba z *M. tuberculosis*

Študija	Št. pozitivnih QFT/št. veljavnih testov	Občutljivost QFT (95 % CI)
Bolniki s TB na Japonskem (15)	86/92	93 % (86–97 %)
Avstralija	24/27	89 % (70–97 %)
ZDA	47/58	81 % (68–90 %)
Skupaj	157/177	89 % (83–93 %)

Diagnoza LTBI

Objavljenih je bilo več študij, ki prikazujejo delovanje QFT v različnih populacijah, pri katerih obstaja tveganje za LTBI. Osnovne ugotovitve nekaterih izbranih študij so prikazane v preglednici 6.

Preglednica 6. Izbrane objavljene študije o QFT v populacijah, pri katerih obstaja tveganje za LTBI

Študija	Skupaj testiranih	Izidi in ugotovitve
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Zelo visoke stopnje tveganja za TB. 40 % pozitivnih QFT in 41 % pozitivnih TST pri 10 mm. Visoka usklajenost s TST, pri obeh vrstah testov brez učinka BCG. Oba testa se navezujeta na dejavnike tveganja v zvezi s starostjo in delovno dobo v zdravstvu.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	Splošna prevalenca za LTBI glede na QFT je bila 4,6 % (27/590) pri osebah, ki so pozitivne na HIV. Pozitivni rezultati so bili povezani s tveganji za TB. Pri dveh osebah s pozitivnim QFT se je v 1 letu razvila aktivna TB. Nejasne reakcije (št. = 20, 3,4 %) so bile znatno povezane s številom CD4 < 100/ μ l.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Otroci, pri katerih je obstajal sum na TB in ki so imeli v anamnezi stik s TB, so bili testirani s QFT in TST. Med njimi je imelo 10,5 % pozitiven QFT in 9,5 % pozitiven TST pri 10 mm. Usklajenost med testoma je bila skupno 95,2-odstotna in 100-odstotna med otroci, ki niso bili cepljeni proti BCG.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	Testiranih je bilo 15 različnih tesnih stikov med posamezniki: od tega je bilo 51 % cepljenih proti BCG, pri čemer je bilo 27 % rojenih v tujini; 70 % cepljenih proti BCG in 18 % posameznikov, ki niso bili cepljeni, je imelo pozitiven TST (5 mm), medtem ko je imelo 9 % in 11 % pozitiven QFT. QFT je bil povezan s tveganjem TB. TST je bil povezan le s cepljenjem proti BCG.

Delovanje manj občutljive tekoče različice antigena QuantiFERON-TB Gold (predhodnika QFT) in test QFT je opisano še v veliko drugih objavah. Te študije vključujejo uporabo testov pri stikih s primeri aktivne TB (9, 11, 19, 25), otrokih (6–10, 25, 28), bolnikih, ki so pozitivni na HIV (2, 5, 20), zdravstvenih delavcih (13, 26, 32), bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), osebah, pri katerih obstaja sum na TB, (7, 8, 10, 18), in posameznikih z nizko stopnjo tveganja (15).

Ponovljivost in učinek TST na poznejših testiranjih QFT

V okviru študije specifične v ZDA je bila podskupina prostovoljcev znova testirana v 4 oziroma 5 tednih po prvih testih QFT in TST. Rezultati QFT za 260 ponovno testiranih so bili na voljo za oba časa izvedbe testov in raven usklajenosti je bila 99,6-odstotna (259/260). Predhodni TST ni pokazal pozitivnih reakcij QFT.

10. Tehnične informacije

Nejasni rezultati

Nejasni rezultati morajo biti neobičajni in so lahko povezani s stanjem imunosti testiranega posameznika, vzrok zanje pa so lahko tudi naslednji tehnični dejavniki:

- Prekoračitev 16-urnega roka med odvzemom krvi in inkubacijo pri 37 °C.
- Skladiščenje vzorcev krvi zunaj predpisanega temperaturnega območja (od 17 do 27 °C).
- Ne zadostno mešanje epruvtov za odvzem krvi.
- Ne zadostno pranje plošče ELISA.

Pri domnevnih tehničnih težavah pri odvzemu krvi ali med rokovanjem z vzorci je treba celoten test QFT ponoviti z novim vzorcem krvi. Če sumite, da je pri testu ELISA stimuliranih vzorcev plazme prišlo do neustreznega pranja ali drugih odstopanj od postopka, ga lahko ponovite. Nejasni rezultati, ki si jih lahko razlagamo z nizkimi vrednostmi mitogena ali visokimi ničnimi vrednostmi, se pri ponovnem testiranju ne smejo ponoviti, razen če je pri testu ELISA prišlo do napake. Nejasni rezultati morajo biti tudi sporočeni kot taki. Zdravniki se lahko odločijo ponovno odvzeti vzorec ali izvesti druge postopke, kot je primerno.

Vzorci strjene plazme

Če se med dolgotrajnim shranjevanjem vzorcev plazme pojavijo fibrinski strdki, vzorce centrifugirajte do usedline strjenega materiala in s tem olajšajte pipetiranje plazme.

Navodila za odpravljanje težav

Ta navodila za odpravljanje težav vam lahko pomagajo pri odpravljanju morebitnih težav. Več lahko izveste v okviru tehničnih informacij, ki so na voljo na spletnem mestu www.QuantiFERON.com. Kontaktne informacije najdete na hrbtni platnici.

ELISA – odpravljanje težav

Razvoj nespecifične barve

Možen vzrok

- a) Nezadostno opranje plošče
- b) Navzkrižna kontaminacija vdolbin ELISA
- c) Pretečen rok uporabnosti kompleta/sestavin kompleta
- d) Kontaminirana raztopina encimskega substrata
- e) Mešanje plazme v epruveh QFT pred odvzemom

Rešitev

- Ploščo operite najmanj 6-krat s 400 μ l pufru na vsako vdolbino. Glede na vrsto uporabljenega pralnega aparata bo morda potrebnih več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje.
- Med pipetiranjem in mešanjem vzorcem ravnajte previdno, da zmanjšate tveganje.
- Komplet uporabite preden mu poteče rok. Rekonstituirani standard in koncentrat konjugata 100X morate porabiti v treh mesecih po datumu rekonstitucije.
- Modrikasto obarvan substrat zavržite. Poskrbite, da bodo uporabljeni čisti rezervoarji reagentov.
- Po centrifugiranju se izogibajte pipetiranju gor in dol ali kakršnemu koli mešanju plazme pred odvzemanjem. Vseskozi pazite, da ne poškodujete materiala na površini gela.

Nizke vrednosti optične gostote za standarde

Možen vzrok

- a) Napaka pri redčenju standarda
- b) Napaka pri pipetiranju
- c) Prenizka inkubacijska temperatura
- d) Prekratek čas inkubacije
- e) Napačen filter plošče
- f) Prehladni reagenti
- g) Pretečen rok uporabnosti kompleta/sestavin kompleta

Rešitev

- Redčenje standarda kompleta opravite natančno po priloženih navodilih QFT ELISA.
- Preverite, ali so pipete kalibrirane in uporabljene točno v skladu z navodili proizvajalca.
- Inkubacija za metodo ELISA mora biti opravljena pri sobni temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Čas inkubacije plošče s konjugatom, standardi in vzorci mora biti 120 ± 5 minut. Raztopina encimskega substrata se mora na plošči inkubirati 30 minut.
- Plošča se mora odčitati pri 450 nm z referenčnim filtrom od 620 do 650 nm.
- Vsi reagenti (razen koncentrata konjugata 100X) morajo biti pred začetkom testa segreti na sobno temperaturo. To traja približno eno uro.
- Komplet uporabite preden mu poteče rok. Rekonstituirani standard in koncentrat konjugata 100X morate porabiti v 3 mesecih po datumu rekonstitucije.

Visoko ozadje

Možen vzrok

- a) Ne zadostno opranje plošče
- b) Previsoka temperatura inkubacije
- c) Pretečen rok uporabnosti kompleta/sestavina kompleta
- d) Kontaminirana raztopina encimskega substrata

Rešitev

Ploščo operite najmanj 6-krat s 400 μ l pufru na vsako vdolbino. Glede na vrsto uporabljenega pralnega aparata bo morda potrebnih več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje.

Inkubacija za metodo ELISA mora biti opravljena pri sobni temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Komplet uporabite preden mu poteče rok. Rekonstituirani standard in koncentrat konjugata 100X morate porabiti v 3 mesecih po datumu rekonstitucije.

Modrikasto obarvan substrat zavržite. Poskrbite, da bodo uporabljeni čisti rezervoarji reagentov.

Nelinearna standardna krivulja in spremenljivost podvojenega vzorca

Možen vzrok

- a) Ne zadostno opranje plošče
- b) Napaka pri redčenju standarda
- c) Slabo mešanje
- d) Nedosledna tehnika pipetiranja ali motnje med pripravo analize

Rešitev

Ploščo operite najmanj 6-krat s 400 μ l pufru na vsako vdolbino. Glede na vrsto uporabljenega pralnega aparata bo morda potrebnih več kot 6 pralnih ciklusov. Priporočamo, da med pralnimi cikli napravite 5-sekundni premor za namakanje.

Redčenje standarda opravite natančno po priloženih navodilih QFT ELISA.

Skrbno premešajte reagente z obračanje na glavo ali z nežnim vrtenjem, preden jih dodate na ploščo.

Dodajanje vzorcev in standardov se mora izvajati neprekinjeno. Vsi reagenti morajo biti pripravljene pred začetkom analize.

Videoposnetek postopka analize in rešitve za večino tehničnih težav lahko najdete v storitvi Gnowee™, za katero se registrirate neposredno na naslovu www.gnowee.net. Informacije o izdelku in tehnični vodiči so brezplačno na voljo pri družbi QIAGEN, prek vašega distributerja oziroma na spletnem mestu www.QuantiFERON.com.

11. Bibliografija

Celoten seznam sklicevanj na teste QFT najdete v knjižnici sklicev QuantiFERON, ki je na voljo na spletnem mestu Gnowee na naslovu 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. Mirtskhulava, 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-g 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. Tehnična služba

Za tehnične storitve se obrnite na:

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

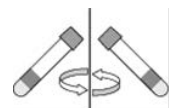
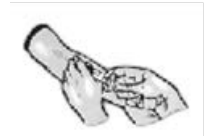
Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

13. Skrajšani testni postopek

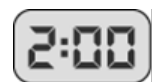
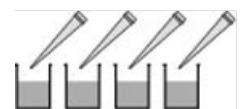
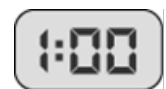
1. faza – inkubacija krvi

1. Zberite kri preiskovancev v epruvete za odvzem krvi, ki jih premešajte, tako da jih takoj desetkrat (10) močno stresite, s čimer zagotovite, da se celotna notranja površina prekrije s krvjo in se antigeni na stenah epruvete raztopijo.
2. Epruvete inkubirajte v stoječem položaju pri temperaturi $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ od 16 do 24 ur.
3. Po inkubaciji epruvete 15 minut centrifugirajte pri 2000 do 3000 g RCF (g), da ločite plazmo in rdeče krvničke.
4. Po centrifugiranju se izogibajte pipetiranju gor in dol ali kakršnemu koli mešanju plazme pred odvzemanjem. Vseskozi pazite, da ne poškodujete materiala na površini gela.

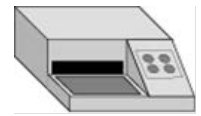
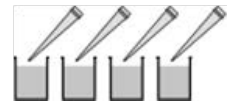
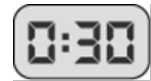


2. faza – IFN- γ ELISA

1. Sestavine ELISA z izjemo koncentrata konjugata 100X postavite na sobno temperaturo ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) za vsaj 60 minut.
2. Rekonstituirajte standard kompleta na 8,0 IE/ml z destilirano ali deionizirano vodo. Pripravite štiri (4) raztopine standarda.
3. Rekonstituirajte suho zamrznjen koncentrat konjugata 100X z destilirano ali deionizirano vodo.
4. V zeleni raztopini za redčenje pripravite konjugat za uporabo in dodajte 50 μl v vse vdolbine.
5. V ustrezne vdolbine dodajte 50 μl testnih vzorcev plazme in 50 μl standarda. Premešajte v vibratorju.
6. Inkubirajte 120 ± 5 minut pri sobni temperaturi.
7. Vdolbine operite najmanj 6-krat s 400 μl pufru na vsako vdolbino.
8. V vdolbine dodajte 100 μl raztopine encimskega substrata. Premešajte v vibratorju.



9. 30 minut inkubirajte pri sobni temperaturi.
10. V vse vdolbine dodajte 50 μ l raztopine za blokiranje encimov. Premešajte v vibratorju.
11. Rezultate odčitajte pri 450 nm z referenčnim filtrom od 620 do 650 nm.
12. Analizirajte rezultate.



Večje spremembe

Večje spremembe v tej izdaji (1075115SL – razl. 01) navodil za uporabo QFT ELISA so povzete v spodnji preglednici:

Poglavje	Stran	Sprememba
4. Previdnosti ukrepi in opozorila	8–9	Dopolnilo k uporabi nekaterih sestavnih delov ELISA med serijami kompletov.
12. Tehnična služba	27	Nov e-poštni naslov tehnične službe.

Blagovne znamke: QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (Skupina QIAGEN); Microsoft®, Excel® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Omejena licenčna pogodba QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

Kupec ali uporabnik izdelka z njegovo uporabo soglaša z naslednjimi pogoji:

1. Izdelek se lahko uporablja zgolj v skladu s protokoli, ki so zagotovljeni z izdelkom, in s temi navodili za uporabo ter skupaj s sestavnimi deli v kompletu. QIAGEN v okviru svoje intelektualne lastnine ne ponuja licenc za uporabo priloženih sestavnih delov tega kompleta s sestavnimi deli, ki niso priloženi temu kompletu, razen kot je opisano v protokolih, ki so zagotovljeni z izdelkom, in v teh navodilih za uporabo.
2. Razen izrecno navedenih licenc QIAGEN ne jamči, da ta komplet in/ali njegova uporaba ne krši pravic drugih strank.
3. Ta komplet in njegovi sestavni deli so licencirani za enkratno uporabo in jih ni dovoljeno znova uporabiti, obnoviti ali prodajati naprej, razen če QIAGEN določi drugače.
4. QIAGEN zlasti zavrača kakršne koli druge licence, izrecne ali nakazane, razen tistih, ki so izrecno navedene.
5. Kupec in uporabnik tega kompleta se strinjata, da ne bosta ukrepala ali dovolila drugim, da ukrepajo v smeri, ki bi vodila v ali omogočala katero od zgoraj prepovedanih dejanj. QIAGEN lahko prepovedi iz tega Sporazuma o licenčnih omejitvah uveljavlja na katerem koli sodišču ter dobi povrnjene vse svoje stroške za preiskavo in sodišče, vključno s stroški za odvetnika, pri katerem koli dejanju za uveljavitev tega Sporazuma o licenčnih omejitvah ali pravice intelektualne lastnine v povezavi s tem kompletom in/ali njegovimi sestavnimi deli.

Za posodobljene licenčne pogoje glejte www.qiagen.com.

© 2013 Cellestis, QIAGEN Company, vse pravice pridržane.

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: quantiferon@qiagen.com

