

Απρίλιος 2019

Ένθετο συσκευασίας QuantiFERON[®]-TB Gold Plus (QFT[®]-Plus) ELISA



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Έκδοση 1

IVD

Για in vitro διαγνωστική χρήση

Δοκιμασία ιντερφερόνης-γ σε ολικό αίμα για τη μέτρηση της απάντησης σε πεπτιδικά αντιγόνα των πρωτεϊνών ESAT-6 και CFP-10



REF

622120, 622822



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Γερμανία

R6 **MAT**

1083163EL

Sample to Insight



Περιεχόμενο

Προβλεπόμενη χρήση	5
Σύνοψη και επεξήγηση της δοκιμασίας	5
Αρχές του προσδιορισμού.....	8
Απαιτούμενος χρόνος για την εκτέλεση του προσδιορισμού.....	10
Συστατικά και αποθήκευση.....	11
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	13
Φύλαξη και χειρισμός των δειγμάτων	14
Σωληνάρια συλλογής αίματος	14
Αντιδραστήρια του κιτ.....	14
Ανασυσταθέντα και αχρησιμοποίητα αντιδραστήρια	14
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.....	15
Προειδοποιήσεις	15
Προφυλάξεις.....	16
Συλλογή και προετοιμασία δοκιμίων.....	19
Οδηγίες χρήσης.....	26
Στάδιο 1 — Επώαση αίματος και συλλογή πλάσματος	26
Στάδιο 2 — Δοκιμασία ELISA για την ιντερφερόνη- γ	27
Υπολογισμοί και ερμηνεία δοκιμασιών	33
Παραγωγή της πρότυπης καμπύλης.....	33
Έλεγχος ποιότητας δοκιμασίας	34

Ερμηνεία αποτελεσμάτων	35
Περιορισμοί	38
Χαρακτηριστικά απόδοσης	39
Κλινικές μελέτες.....	39
Χαρακτηριστικά απόδοσης προσδιορισμού	45
Τεχνικές πληροφορίες	50
Απροσδιόριστα αποτελέσματα	50
Θρομβωμένα δείγματα πλάσματος	50
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	51
Βιβλιογραφία	53
Σύμβολα	62
Στοιχεία επικοινωνίας	63
Συνοπτική διαδικασία δοκιμασίας.....	64
Στάδιο 1 — επώαση αίματος.....	64
Στάδιο 2 — Δοκιμασία ELISA για την ιντερφερόνη-γ.....	64
Σημαντικές αλλαγές.....	66
Ιστορικό αναθεώρησης εγχειριδίου.....	66

Προβλεπόμενη χρήση

Ο προσδιορισμός QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) είναι μια in vitro διαγνωστική δοκιμασία που χρησιμοποιεί ένα μείγμα πεπτιδίων το οποίο μιμείται τις πρωτεΐνες ESAT-6 και CFP-10, προκειμένου να διεγείρει κύτταρα ηπαρινοσμένου ολικού αίματος. Εκτελείται ανίχνευση ιντερφερόνης γ (IFN γ) μέσω ενός ενζυμικού προσδιορισμού ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για τον προσδιορισμό της in vitro απάντησης στα εν λόγω πεπτιδικά αντιγόνα, τα οποία σχετίζονται με λοίμωξη από το *Mycobacterium tuberculosis*.

Η QFT-Plus είναι μια δοκιμασία έμμεσης ανίχνευσης της λοίμωξης από *M. tuberculosis* (συμπεριλαμβανομένης και της νόσου) και προορίζεται για χρήση σε συνδυασμό με εκτιμήσεις κινδύνου, ακτινογραφικές εξετάσεις και άλλες ιατρικές και διαγνωστικές αξιολογήσεις.

Σύνοψη και επεξήγηση της δοκιμασίας

Η φυματίωση είναι μια μεταδοτική νόσος που προκαλείται από μόλυνση από μικροοργανισμούς του συμπλέγματος *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) και η οποία, κατά κανόνα, εξαπλώνεται σε νέους ξενιστές μέσω αερομεταφερόμενων πυρήνων σταγονιδίων από ασθενείς με πνευμονική φυματίωση. Αφού μολυνθεί, ένα άτομο μπορεί να ασθενήσει με φυματίωση μέσα σε μερικές εβδομάδες ή μήνες αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις θα παραμείνει υγιές. Η λανθάνουσα λοίμωξη φυματίωσης (latent tuberculosis infection, LTBI), μια μη μεταδοτική ασυμπτωματική κατάσταση, επιμένει σε κάποια άτομα τα οποία ενδέχεται να αναπτύξουν ενεργή νόσο μερικούς μήνες ή και χρόνια αργότερα. Η διάγνωση της LTBI χρησιμεύει κυρίως στη λήψη απόφασης σχετικά με ενδεχόμενη χορήγηση φαρμακευτικής θεραπείας ώστε να αποφευχθεί η εκδήλωση ενεργής νόσου. Μέχρι πρόσφατα, η μοναδική μέθοδος διάγνωσης της LTBI ήταν η δερματική δοκιμασία φυματίνης (Tuberculin Skin Test, TST ή εξέταση Mantoux). Δερματική ευαισθησία στη φυματίνη αναπτύσσεται από 2 έως 10 εβδομάδες μετά τη

λοίμωξη. Ορισμένα μολυσμένα άτομα ωστόσο, όπως αυτά που πάσχουν από ένα ευρύ φάσμα παθήσεων οι οποίες διαταράσσουν τις ανοσολογικές λειτουργίες, αλλά και άτομα χωρίς τέτοιες παθήσεις, δεν αντιδρούν στη φυματίνη. Αντιστρόφως, κάποια άτομα με μικρές πιθανότητες μόλυνσης από *M. tuberculosis* παρουσιάζουν ευαισθησία στη φυματίνη και θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία TST μετά τον εμβολιασμό με τον βάκιλλο Calmette-Guérin (Bacille Calmette-Guérin, BCG), έπειτα από μόλυνση από άλλα μυκοβακτηρίδια πλην αυτών του συμπλέγματος *M. tuberculosis*, ή λόγω άλλων απροσδιόριστων παραγόντων.

Η LTBI πρέπει να διακρίνεται από την ενεργή φυματίωση, μια νόσο υποχρεωτικής δήλωσης η οποία προσβάλλει συνήθως τους πνεύμονες και το κατώτερο αναπνευστικό, αλλά μπορεί να προσβάλει και άλλα οργανικά συστήματα. Η διάγνωση ενεργής νόσου φυματίωσης γίνεται με βάση ευρήματα ιστορικού, αντικειμενικής εξέτασης, ακτινολογικά, ιστολογικά και μυκοβακτηριολογικά.

Η δοκιμασία QFT-Plus εξετάζει τις απαντήσεις κυτταροεξαρτώμενης ανοσίας (cell-mediated immunity, CMI) ενάντια σε πεπτιδικά αντιγόνα τα οποία μιμούνται τις μυκοβακτηριδιακές πρωτεΐνες. Αυτές οι πρωτεΐνες (ESAT-6 και CFP-10) απουσιάζουν από όλα τα στελέχη BCG και από τα περισσότερα μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια, εκτός από τα *M. kansasii*, *M. szulgai* και *M. marinum* (1). Το αίμα των ατόμων που έχουν μολυνθεί από μικροοργανισμούς του συμπλέγματος MTB συνήθως περιέχει λεμφοκύτταρα που αναγνωρίζουν αυτά και άλλα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα. Αυτή η διαδικασία αναγνώρισης περιλαμβάνει την παραγωγή και έκκριση της κυτοκίνης ιντερφερόνης- γ . Η ανίχνευση και ο επακόλουθος ποσοτικός προσδιορισμός της ιντερφερόνης- γ αποτελούν τη βάση για αυτήν τη δοκιμασία.

Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση QFT-Plus είναι ένα μείγμα πεπτιδίων που μιμείται τις πρωτεΐνες ESAT-6 και CFP-10. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα πεπτιδικά αντιγόνα διεγείρουν απαντήσεις ιντερφερόνης- γ σε T κύτταρα ατόμων με μόλυνση από *M. tuberculosis*, αλλά συνήθως όχι και των ατόμων χωρίς μόλυνση ή των ατόμων που έχουν εμβολιαστεί με τον BCG και δεν εμφανίζουν νόσο ή κίνδυνο LTBI (1–32). Ωστόσο, ορισμένες φαρμακευτικές αγωγές ή παθήσεις που επηρεάζουν τις ανοσολογικές λειτουργίες ενδέχεται να περιορίσουν τις απαντήσεις της ιντερφερόνης- γ . Οι ασθενείς με ορισμένες άλλες

μυκοβακτηριδιακές λοιμώξεις ενδέχεται να παρουσιάσουν και αυτοί αντίδραση στις πρωτεΐνες ESAT-6 και CFP-10, καθώς τα γονίδια που τις κωδικοποιούν βρίσκονται και στα *M. kansasii*, *M. szulgai* και *M. marinum* (1, 23). Η δοκιμασία QFT-Plus αποτελεί ταυτόχρονα εξέταση για την LTBI και χρήσιμο βοήθημα στη διάγνωση της μόλυνσης από μικροοργανισμούς του συμπλέγματος *M. tuberculosis* σε ασθενείς με ενεργή νόσο. Το θετικό αποτέλεσμα υποστηρίζει τη διάγνωση ενεργής νόσου φυματίωσης, αλλά θετικό αποτέλεσμα μπορεί να ληφθεί και έπειτα από μόλυνση από άλλα μυκοβακτηρίδια (π.χ. *M. kansasii*). Απαιτούνται και άλλες ιατρικές και διαγνωστικές αξιολογήσεις για να επιβεβαιωθεί ή να αποκλειστεί η ενεργή φυματίωση.

Η δοκιμασία QFT-Plus περιλαμβάνει δύο διαφορετικά σωληνάρια αντιγόνου TB: το σωληνάριο TB Antigen Tube 1 (TB1) και το σωληνάριο TB Antigen Tube 2 (TB2). Και τα δύο σωληνάρια περιέχουν πεπτιδικά αντιγόνα από τα αντιγόνα που σχετίζονται με το σύμπλεγμα MTB και τις πρωτεΐνες ESAT-6 και CFP-10. Ενώ το σωληνάριο TB1 περιέχει πεπτιδικά από τις πρωτεΐνες ESAT-6 και CFP-10 σχεδιασμένα ώστε να προκαλέσουν απαντήσεις κυτταροεξαρτώμενης ανοσίας από τα CD4⁺ T-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, το σωληνάριο TB2 περιέχει ένα επιπλέον σύνολο πεπτιδίων που στοχεύει την πρόκληση απαντήσεων κυτταροεξαρτώμενης ανοσίας από τα CD8⁺ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Στη φυσική πορεία της μόλυνσης από MTB, τα CD4⁺ T κύτταρα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον ανοσολογικό έλεγχο μέσω της έκκρισης της κυτταροκίνης ιντερφερόνης γ . Νέα στοιχεία υποδεικνύουν ότι τα CD8⁺ T κύτταρα συμμετέχουν στην άμυνα του ξενιστή έναντι του MTB με παραγωγή ιντερφερόνης γ και άλλων διαλυτών παραγόντων, οι οποίοι ενεργοποιούν τα μακροφάγα ώστε να καταστείλουν την ανάπτυξη του MTB, να φονεύσουν τα μολυσμένα κύτταρα ή να προκαλέσουν απευθείας τη λύση των ενδοκυττάρων MTB (33–35). Τα ειδικά για το MTB CD8⁺ κύτταρα έχουν ανιχνευθεί σε άτομα με λανθάνουσα λοίμωξη φυματίωσης και με ενεργή φυματίωση, στα οποία μπορεί συχνά να βρεθούν CD8⁺ κύτταρα τα οποία παράγουν ιντερφερόνη- γ (36–38). Επίσης, τα ειδικά για τις πρωτεΐνες ESAT-6 και CFP-10 CD8⁺ T λεμφοκύτταρα ανιχνεύονται συχνότερα σε άτομα με ενεργή νόσο φυματίωσης απ' ό,τι σε άτομα με LTBI και ενδέχεται να συνδέονται με πρόσφατη έκθεση σε MTB (39–41). Επιπλέον, ειδικά για το MTB CD8⁺ T κύτταρα που παράγουν

ιντερφερόνη- γ έχουν ανιχνευθεί και σε άτομα με ενεργή φυματίωση και συλλοίμωξη με τον HIV (42, 43), καθώς και σε μικρά παιδιά που νοσούν από φυματίωση (44).

Αρχές του προσδιορισμού

Ο προσδιορισμός QFT-Plus χρησιμοποιεί εξειδικευμένα σωληνάρια συλλογής αίματος, στα οποία συλλέγεται ολικό αίμα. Το αίμα επωάζεται μέσα στα σωληνάρια επί 16 έως 24 ώρες και, στη συνέχεια, το πλάσμα συλλέγεται και εξετάζεται ως προς την παρουσία ιντερφερόνης- γ η οποία παράγεται ως απάντηση στα πεπτιδικά αντιγόνα.

Η δοκιμασία QFT-Plus εκτελείται σε δύο στάδια. Αρχικά, συλλέγεται ολικό αίμα σε καθένα από τα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes: ένα σωληνάριο Nil, ένα σωληνάριο αντιγόνου TB1, ένα σωληνάριο αντιγόνου TB2 και ένα σωληνάριο Mitogen. Εναλλακτικά, το αίμα μπορεί να συλλεχθεί σε ένα κοινό σωληνάριο με λιθιούχο ηπαρίνη ή νατριούχο ηπαρίνη ως αντιπηκτικό και κατόπιν να μεταφερθεί σε σωληνάρια QFT-Plus.

Το σωληνάριο Mitogen χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας στη δοκιμασία QFT-Plus. Αυτό μπορεί να είναι σημαντικό στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν αμφιβολίες ως προς την κατάσταση ανοσίας του ατόμου. Το σωληνάριο Mitogen λειτουργεί επίσης ως μάρτυρας για την ορθότητα των χειρισμών και της επώασης του αίματος.

Τα σωληνάρια QFT-Plus θα πρέπει να ανακινηθούν ώστε το αντιγόνο να αναμειχθεί με το αίμα και θα πρέπει να επωαστούν στους 37 °C το συντομότερο δυνατόν και εντός 16 ωρών από τη συλλογή του αίματος. Έπειτα από μια περίοδο επώασης διάρκειας 16 έως 24 ωρών, τα σωληνάρια φυγοκεντρώνται, το πλάσμα αφαιρείται και η ποσότητα της ιντερφερόνης- γ (IU/ml) προσδιορίζεται μέσω ELISA. Ο προσδιορισμός QFT-Plus ELISA χρησιμοποιεί το πρότυπο ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ιντερφερόνης- γ , το οποίο έχει αναλυθεί έναντι ενός παρασκευάσματος ιντερφερόνης- γ αναφοράς (Αρ. αναφ. NIH: Gxg01-902-535). Τα αποτελέσματα για το δείγμα της δοκιμασίας αναφέρονται σε διεθνείς μονάδες ανά ml (International Units per ml, IU/ml) σε σχέση με την πρότυπη καμπύλη, προετοιμασμένη μέσω εξέτασης της αραίωσης του προτύπου που παρέχεται με το kit.

Τα ετερόφιλα αντισώματα (π.χ. ανθρώπινα αντισώματα έναντι των ποντικών) στον ορό ή το πλάσμα ορισμένων ατόμων είναι γνωστό ότι προκαλούν παρεμβολές στους ανοσολογικούς προσδιορισμούς. Η επίδραση των ετερόφιλων αντισωμάτων στον προσδιορισμό QFT-Plus ELISA ελαχιστοποιείται με την προσθήκη φυσιολογικού ορού ποντικού στο πράσινο αραιωτικό και με τη χρήση τμημάτων μονοκλωνικού αντισώματος F(ab')₂ ως δέσμευσης της ιντερφερόνης- γ που επικαλύπτει τη μικροπλάκα.

Ένα δείγμα που εξετάζεται με τον προσδιορισμό QFT-Plus θεωρείται θετικό για την απάντηση ιντερφερόνης- γ όταν οποιοδήποτε από τα δύο σωληνάκια αντιγόνου TB δίνει αποτέλεσμα σημαντικά μεγαλύτερο από την τιμή ιντερφερόνης- γ του Nil σε IU/ml. Το δείγμα πλάσματος από το σωληνάριο Mitogen χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας ιντερφερόνης- γ για καθένα από τα εξεταζόμενα δοκίμια. Οι χαμηλές απαντήσεις στο Mitogen (< 0,5 IU/ml) συνιστούν απροσδιόριστο αποτέλεσμα όταν το δείγμα αίματος παρουσιάζει επίσης αρνητική απάντηση στα αντιγόνα TB. Τέτοιος συνδυασμός αποτελεσμάτων μπορεί να προκύψει εάν υπάρχουν ανεπαρκή λεμφοκύτταρα, μειωμένη λεμφοκυτταρική δραστηριότητα λόγω λανθασμένου χειρισμού του δοκιμίου, λανθασμένη πλήρωση/ανάμειξη του σωληναρίου Mitogen, ή αδυναμία των λεμφοκυττάρων του ασθενούς να παραγάγουν ιντερφερόνη- γ . Αυξημένα επίπεδα ιντερφερόνης- γ στο δείγμα Nil ενδέχεται να προκύψουν με την παρουσία ετερόφιλων αντισωμάτων ή λόγω απέκκρισης ενδογενούς ιντερφερόνης- γ . Το σωληνάριο Nil χρησιμεύει στη διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς το υπόβαθρο (π.χ. αυξημένα επίπεδα ιντερφερόνης- γ στην κυκλοφορία ή παρουσία ετερόφιλων αντισωμάτων). Το επίπεδο ιντερφερόνης- γ στο σωληνάριο Nil αφαιρείται από το επίπεδο ιντερφερόνης- γ στα σωληνάκια αντιγόνου TB και το σωληνάριο Mitogen.

Απαιτούμενος χρόνος για την εκτέλεση του προσδιορισμού

Παρακάτω υπολογίζεται ο χρόνος που απαιτείται για τον προσδιορισμό QFT-Plus ELISA και αναφέρεται επίσης ο χρόνος για την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων σε παρτίδες:

Επώαση σωληναρίων αίματος

στους 37 °C:

16 έως 24 ώρες

ELISA:

Περίπου 3 ώρες για μία πλάκα ELISA

(22 άτομα)

<1 ώρα εργασίας

Υπολογίστε άλλα 10 έως 15 λεπτά για κάθε επιπλέον πλάκα

Συστατικά και αποθήκευση

Σωληνάρια συλλογής αίματος*		200 σωληνάρια	Συσκευασία για έναν ασθενή	Συσκευασία διανομέα	200 σωληνάρια HA	Συσκευασία για έναν ασθενή για HA	Συσκευασία διανομέα για HA
Αρ. καταλόγου		622526	622222	622423	623526	623222	623423
Αριθμός αναλύσεων/συσκευασίας		50	10	25	50	10	25
QuantIFERON Nil Tube (γκρίζο πύμα, λευκός δακτύλιος)	Nil	50 σωληνάρια	10 σωληνάρια	25 σωληνάρια			
QuantIFERON TB1 Tube (πράσινο πύμα, λευκός δακτύλιος)	TB1	50 σωληνάρια	10 σωληνάρια	25 σωληνάρια			
QuantIFERON TB2 Tube (κίτρινο πύμα, λευκός δακτύλιος)	TB2	50 σωληνάρια	10 σωληνάρια	25 σωληνάρια			
QuantIFERON Mitogen Tube (μωβ πύμα, λευκός δακτύλιος)	Mitogen	50 σωληνάρια	10 σωληνάρια	25 σωληνάρια			
QuantIFERON Nil HA Tube (γκρίζο πύμα, κίτρινος δακτύλιος)	Nil HA				50 σωληνάρια	10 σωληνάρια	25 σωληνάρια
QuantIFERON TB1 HA Tube (πράσινο πύμα, κίτρινος δακτύλιος)	TB1 HA				50 σωληνάρια	10 σωληνάρια	25 σωληνάρια
QuantIFERON TB2 HA Tube (κίτρινο πύμα, κίτρινος δακτύλιος)	TB2 HA				50 σωληνάρια	10 σωληνάρια	25 σωληνάρια
QuantIFERON Mitogen HA Tube (μωβ πύμα, κίτρινος δακτύλιος)	Mitogen HA				50 σωληνάρια	10 σωληνάρια	25 σωληνάρια
Ένθετο συσκευασίας QFT-Plus Blood Collection Tubes		1	1	1	1	1	1

* Δεν διατίθενται όλες οι διαμορφώσεις προϊόντων σε κάθε χώρα. Συμβουλευτείτε το τμήμα εξυπηρέτησης πελατών της QIAGEN (για λεπτομέρειες βλ. www.qiagen.com) για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις διαμορφώσεις που είναι διαθέσιμες για παραγγελία.

Συστατικά προσδιορισμού ELISA[†]	Κιτ ELISA 2 πλακών	Συσκευασία αναφοράς εργαστηρίου
Αρ. καταλόγου	622120	622822
Microplate Strips (Σειρές μικροπλάκας) (12 × 8 βυθίσματα) επικαλυμμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού κατά της ανθρώπινης ιντερφερόνης-γ	2 σει σερών μικροπλάκας των 96 βυθισμάτων	20 σει σερών μικροπλάκας των 96 βυθισμάτων
IFN-γ Standard (πρότυπο ιντερφερόνης-γ), λυόφιλο (περιέχει ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ιντερφερόνη-γ, καζεΐνη βοοειδούς, θιμεροσάλη 0,01% κ.ό.)	1 φιαλίδιο (8 IU/ml μετά την ανασύσταση)	10 φιαλίδια (8 IU/ml μετά την ανασύσταση)
Green Diluent (Πράσινο αραιωτικό) (περιέχει καζεΐνη βοοειδούς, φυσιολογικό ορό ποντικού, θιμεροσάλη 0,01% κ.ό.)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x), λυόφιλο (αντίσωμα ποντικού κατά της ανθρώπινης ιντερφερόνης-γ HRP, περιέχει θιμεροσάλη 0,01% κ.ό.)	1 × 0,3 ml (μετά την ανασύσταση)	10 × 0,3 ml (μετά την ανασύσταση)
Wash Buffer 20x Concentrate (Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 20x) (pH 7,2, περιέχει ProClin® 300 0,05% κ.ό.)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Διάλυμα υποστρώματος ενζύμου) (περιέχει H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' τετραμεθυλοβενζιδίνη)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Διάλυμα διακοπής ενζυμικής αντίδρασης) (περιέχει H ₂ SO ₄ 0,5M)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Ένθετο συσκευασίας QFT-Plus ELISA	1	1

[†] Ανατρέξτε στη σελίδα 16 για προφυλάξεις και δηλώσεις επικινδυνότητας.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Επωαστήρας στους $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}^*$. Δεν απαιτείται CO_2
- Βαθμονομημένες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου για χορήγηση* 10 μl έως 1.000 μl, με ρύγχη μίας χρήσης
- Βαθμονομημένη πολυκάναλη πιπέτα* με δυνατότητα χορήγησης 50 μl και 100 μl, με ρύγχη μίας χρήσης
- Καπάκι πλάκας
- Συσκευή ανακίνησης πλακών*
- Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό, 2 λίτρα
- Συσκευή έκπλυσης μικροπλακών (συνιστάται αυτόματη συσκευή)
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών* με φίλτρο 450 nm και φίλτρο αναφοράς 620 nm έως 650 nm

* Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Φύλαξη και χειρισμός των δειγμάτων

Σωληνάρια συλλογής αίματος

- Αποθηκεύστε τα σωληνάρια συλλογής αίματος σε θερμοκρασία 4 °C έως 25 °C.

Αντιδραστήρια του ΚΙΤ

- Αποθηκεύστε τα αντιδραστήρια του ΚΙΤ σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C.
- Να προστατεύετε διαρκώς το διάλυμα υποστρώματος ενζύμου από το άμεσο ηλιακό φως.

Ανασυσταθέντα και αχρησιμοποίητα αντιδραστήρια

Για οδηγίες σχετικά με την ανασύσταση των αντιδραστηρίων, ανατρέξτε στη σελίδα 28.

- Το ανασυσταθέν πρότυπο του ΚΙΤ μπορεί να διατηρηθεί μέχρι και για 3 μήνες εφόσον φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C.

Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του προτύπου του ΚΙΤ.

- Μετά την ανασύσταση, το αχρησιμοποίητο Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x πρέπει να επιστραφεί σε χώρο φύλαξης με θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C και να χρησιμοποιηθεί εντός 3 μηνών.

Σημειώστε την ημερομηνία ανασύστασης του διαλύματος συζευγμένου μορίου.

- Το διάλυμα εργασίας του συζευγμένου μορίου πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός 6 ωρών από την παρασκευή του.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης σε συγκέντρωση εργασίας μπορεί να φυλαχτεί σε θερμοκρασία δωματίου για έως και 2 εβδομάδες.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Αποκλειστικά για in vitro διαγνωστική χρήση.

Προειδοποιήσεις

- Η λήψη αρνητικού αποτελέσματος στη δοκιμασία QFT-Plus δεν αποκλείει το ενδεχόμενο μόλυνσης από *M. tuberculosis* ή ενεργής νόσου φυματίωσης: ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται στο στάδιο της μόλυνσης (π.χ. εάν το δοκίμιο ληφθεί προτού αναπτυχθεί η απάντηση κυτταροεξαρτώμενης ανοσίας), σε συννοσηρές παθήσεις που επηρεάζουν τις ανοσολογικές λειτουργίες, σε λανθασμένο χειρισμό των σωληναρίων συλλογής αίματος μετά τη φλεβοκέντηση, σε λανθασμένη εκτέλεση του προσδιορισμού ή σε άλλες ανοσολογικές μεταβλητές.
- Ένα θετικό αποτέλεσμα στην ανάλυση QFT-Plus δεν θα πρέπει να αποτελεί το μοναδικό ή το καθοριστικό πειστήριο για την ανεύρεση μόλυνσης από *M. tuberculosis*. Η λανθασμένη εκτέλεση του προσδιορισμού μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικές απαντήσεις.
- Τυχόν θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία QFT-Plus θα πρέπει να ακολουθηθεί από περαιτέρω ιατρική και διαγνωστική αξιολόγηση για ενεργή νόσο φυματίωσης [π.χ. επίχρισμα και καλλιέργεια οξυάντοχων βακίλλων (AFB), ακτινογραφία θώρακα].
- Οι πρωτεΐνες ESAT-6 και CFP-10 απουσιάζουν από όλα τα στελέχη BCG και από τα περισσότερα γνωστά μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια, αλλά ένα θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία QFT-Plus δεν αποκλείεται να οφείλεται σε μόλυνση από *M. kansasii*, *M. szulgai* ή *M. marinum*. Εάν υποψιάζεστε το ενδεχόμενο τέτοιας μόλυνσης, ίσως θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν άλλες εναλλακτικές δοκιμασίες.

Προφυλάξεις

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (safety data sheets, SDS). Διατίθενται στο διαδίκτυο σε εύχρηστη και συμπιεσμένη μορφή PDF, στην ιστοσελίδα www.qiagen.com/safety, όπου μπορείτε να βρείτε, να εμφανίσετε και να εκτυπώσετε τα SDS για όλα τα κιτ της QIAGEN καθώς και για τα συστατικά τους.



ΠΡΟΣΟΧΗ: Να χειρίζεστε το ανθρώπινο αίμα και πλάσμα ως δυνητικά μολυσματικό υλικό. Να τηρείτε τις σχετικές κατευθυντήριες οδηγίες περί χειρισμού δειγμάτων αίματος και παραγώγων αίματος. Απορρίψτε τα δείγματα και τα υλικά που ήρθαν σε επαφή με αίμα ή παράγωγα αίματος όπως προβλέπουν οι διεθνείς, κρατικοί και τοπικοί κανονισμοί.

Οι παρακάτω δηλώσεις επικινδυνότητας και προφυλάξεων αφορούν τα συστατικά του QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA.

Δηλώσεις επικινδυνότητας



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Περιέχει: θειικό οξύ. Προειδοποίηση! Μπορεί να διαβρώσει μέταλλα. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Προειδοποίηση! Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.



QuantiFERON Green Diluent

Περιέχει: 5-υδροξυ-1-(4-σουλφοφαινυλο)-4-(4-σουλφοφαινυλαζω)πυραζολο-3-καρβοξυλικό τρινάτριο. Περιέχει: ταρτραζίνη. Προειδοποίηση! Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

QuantiFERON Wash Buffer 20× Concentrate

Περιέχει: μείγμα 5-χλωρο-2-μεθυλο-4-ισοθειαζολίνη-3-όνη και 2-μεθυλο-2H-ισοθειαζόλη-3-όνη (3:1). Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις. Αποφύγετε την ελευθέρωσή του στο περιβάλλον.

Δηλώσεις προφυλάξεων

Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση. Φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτική ενδυμασία/συσκευή προστασίας ματιών/πρόσωπου. **ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ** (ή με τα μαλλιά): Αφαιρέστε αμέσως όλα τα μολυσμένα ενδύματα. Ξεπλύνετε το δέρμα με νερό/στο ντους. **ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ:** Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε. Σε περίπτωση έκθεσης ή πιθανότητας έκθεσης: Συμβουλευθείτε/Επισκεφτείτε γιατρό. Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/Επισκεφτείτε γιατρό. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύνετε τα πριν τα

ξαναχρησιμοποιήσετε. Φυλάσσεται κλειδωμένο. Απορρίψτε το περιεχόμενο/τον περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων.

Περαιτέρω πληροφορίες

Δελτία δεδομένων ασφάλειας: www.qiagen.com/safety

- Οι αποκλίσεις από τις οδηγίες στο *ένθετο συσκευασίας του QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA* ενδέχεται να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Διαβάστε προσεκτικά τις οδηγίες πριν από τη χρήση.
- Μη χρησιμοποιήσετε το κιτ εάν κάποιο φιαλίδιο αντιδραστήριου παρουσιάζει ενδείξεις ζημιάς ή διαρροής πριν από τη χρήση.
- **Σημαντικό:** Επιθεωρήστε τα φιαλίδια πριν από τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε φιαλίδια Συζευγμένου μορίου ή Προτύπου ιντερφερόνης- γ με ενδείξεις ζημιάς ή εάν το σφράγισμα από καουτσούκ έχει παραβιαστεί. Μην πιάνετε σπασμένα σωληνάρια. Λάβετε τις απαραίτητες προφυλάξεις για την ασφαλή απόρριψη των φιαλιδίων.
Σύσταση: Χρησιμοποιήστε εργαλείο αποσφράγισης για να ανοίξετε τα φιαλίδια Συζευγμένου μορίου ή Προτύπου ιντερφερόνης- γ , ώστε να ελαχιστοποιήσετε τον κίνδυνο τραυματισμού από το μεταλλικό πρεσαριστό κάλυμμα.
- Μην αναμειγνύετε και μη χρησιμοποιείτε Σειρές μικροπλάκας, Πρότυπο ιντερφερόνης- γ , Πράσινο αραιωτικό ή Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x από κιτ QFT-Plus διαφορετικών παρτίδων. Για τα υπόλοιπα αντιδραστήρια (Συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 20x, Διάλυμα υποστρώματος ενζύμου και διάλυμα διακοπής ενζυμικής αντίδρασης) μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαλύματα από άλλα κιτ εφόσον δεν έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης και εφόσον καταγραφούν τα στοιχεία των παρτίδων.
- Απορρίψτε τα αχρησιμοποιήτα αντιδραστήρια και τα βιολογικά δείγματα όπως ορίζουν οι τοπικοί και οι εθνικοί κανονισμοί.
- Μη χρησιμοποιείτε τα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes και το κιτ ELISA μετά την ημερομηνία λήξης τους.
- Θα πρέπει να εφαρμόζονται πάντα ορθές εργαστηριακές διαδικασίες.
- Βεβαιωθείτε ότι ο εργαστηριακός εξοπλισμός έχει βαθμονομηθεί και επικυρωθεί για χρήση.

Συλλογή και προετοιμασία δοκιμών

Για τη δοκιμασία QFT-Plus χρησιμοποιούνται τα εξής σωληνάρια συλλογής:

1. Σωληνάρια QuantiFERON Nil (γκρίζο πώμα με λευκό δακτύλιο)
2. Σωληνάρια QuantiFERON TB1 (πράσινο πώμα με λευκό δακτύλιο)
3. Σωληνάρια QuantiFERON TB2 (κίτρινο πώμα με λευκό δακτύλιο)
4. Σωληνάρια QuantiFERON Mitogen (μωβ πώμα με λευκό δακτύλιο)
5. Σωληνάρια QuantiFERON HA Nil (γκρίζο πώμα με κίτρινο δακτύλιο)
6. Σωληνάρια QuantiFERON HA TB1 (πράσινο πώμα με κίτρινο δακτύλιο)
7. Σωληνάρια QuantiFERON HA TB2 (κίτρινο πώμα με κίτρινο δακτύλιο)
8. Σωληνάρια QuantiFERON HA Mitogen (μωβ πώμα με κίτρινο δακτύλιο)

Στο εσωτερικό τοίχωμα των σωληναρίων συλλογής αίματος υπάρχουν αποξηραμένα αντιγόνα και, συνεπώς, το περιεχόμενο των σωληναρίων πρέπει να αναμειγνύεται σχολαστικά με το αίμα. Για αίμα που συλλέγεται απευθείας στα σωληνάρια QFT-Plus, τα σωληνάρια QFT-Plus πρέπει να διατηρούνται και να μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) και να μεταφέρονται σε επωαστήρα $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ το συντομότερο δυνατό και εντός 16 ωρών από τη συλλογή. Εναλλακτικά, το αίμα μπορεί να συλλεχθεί σε ένα σωληνάριο με λιθιούχο ηπαρίνη ή νατριούχο ηπαρίνη για αποθήκευση προτού μεταφερθεί σε σωληνάριο QFT-Plus και επωαστεί. Τα δοκίμια αίματος που συλλέγονται σε σωληνάριο με λιθιούχο ηπαρίνη ή νατριούχο ηπαρίνη μπορούν να αποθηκευτούν για έως και 16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ($17\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) και κατόπιν να μεταφερθούν σε σωληνάρια QFT-Plus αμέσως μετά τη συλλογή. Τα δοκίμια αίματος σε σωληνάρια με λιθιούχο ηπαρίνη ή νατριούχο ηπαρίνη μπορούν επίσης να φυλαχθούν στους $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ για έως και 48 ώρες πριν από τη μεταφορά στα σωληνάρια QFT-Plus. Ανατρέξτε στην ενότητα «Συλλογή αίματος σε ένα σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη και κατόπιν μεταφορά σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes».

Απευθείας συλλογή αίματος σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Επισημάνετε κατάλληλα τα σωληνάρια.

Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σωληνάρια (Nil, TB1, TB2 και Mitogen) μπορούν να αναγνωριστούν από την ετικέτα τους ή με άλλο τρόπο αφού αφαιρεθεί το πώμα.

Συνιστάται να καταγράφετε τον χρόνο και την ημερομηνία συλλογής αίματος.

2. Για κάθε ασθενή, συλλέξτε μέσω φλεβοκέντησης 1 ml αίματος απευθείας σε καθένα από τα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes. Αυτή η διαδικασία πρέπει να εκτελείται από εκπαιδευμένο αιμολήπτη.

Σημαντική σημείωση: Κατά τη στιγμή της πλήρωσης με αίμα, τα σωληνάρια θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία μεταξύ 17 °C και 25 °C.

Τα τυπικά σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε υψόμετρο έως και 810 μέτρων πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας. Τα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes για μεγάλο υψόμετρο (HA) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε υψόμετρο από 1.020 μέτρα πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας έως 1.875 μέτρα πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας.

Επειδή τα σωληνάρια του 1 ml αναρροφούν το αίμα σχετικά αργά, αφήστε το σωληνάριο πάνω στη βελόνα για 2–3 δευτερόλεπτα από τη στιγμή που το σωληνάριο θα φαίνεται να έχει γεμίσει. Έτσι θα βεβαιωθείτε ότι θα ληφθεί ο σωστός όγκος.

- Η μαύρη ένδειξη στο πλάι των σωληναρίων υποδεικνύει το επικυρωμένο εύρος 0,8–1,2 ml. Εάν το επίπεδο αίματος σε κάποιο σωληνάριο είναι εκτός του εύρους που υποδεικνύει η ένδειξη, θα πρέπει να ληφθεί νέο δείγμα αίματος. Η ελλιπής ή υπερβολική πλήρωση των σωληναρίων εκτός του εύρους 0,8 έως 1,2 ml μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Εάν χρησιμοποιείται βελόνα τύπου πεταλούδας για την αιμοληψία, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα σωληνάριο εκκαθάρισης ώστε να διασφαλιστεί ότι η σωλήνωση έχει γεμίσει με αίμα προτού χρησιμοποιηθούν τα σωληνάρια QFT-Plus.
- Εάν τα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes χρησιμοποιηθούν σε υψόμετρο μεγαλύτερο από τα 810 μέτρα ή αν ο όγκος αίματος που λήφθηκε

είναι μικρός, οι χρήστες μπορούν να συλλέξουν αίμα με μια σύριγγα και να μεταφέρουν αμέσως 1 ml αίματος σε καθένα από τα 4 σωληνάρια. Για λόγους ασφάλειας, ο καλύτερος τρόπος να το κάνετε αυτό είναι να αφαιρέσετε τη βελόνα της σύριγγας, σύμφωνα με τις κατάλληλες διαδικασίες ασφάλειας, να αφαιρέσετε τα πώματα από τα 4 σωληνάρια QFT-Plus και να προσθέσετε 1 ml αίματος σε κάθε σωληνάριο (μέχρι το κέντρο της μαύρης ένδειξης στο πλάι της ετικέτας του σωληναρίου). Τοποθετήστε ξανά τα πώματα με ασφάλεια και αναμείξτε τα όπως περιγράφεται παρακάτω. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σωληνάρια (Nil, TB1, TB2 και Mitogen) μπορούν να αναγνωριστούν από την ετικέτα τους ή με άλλο τρόπο αφού αφαιρεθεί το πώμα.

3. Αμέσως μόλις γεμίσετε τα σωληνάρια, ανακινήστε τα δέκα (10) φορές αρκετά έντονα ώστε να βεβαιωθείτε ότι όλη η εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου έχει καλυφθεί με αίμα, αλλά όχι εντονότερα από αυτό. Έτσι θα διαλυθούν τα αντιγόνα που βρίσκονται στα τοιχώματα των σωληναρίων.

Σημαντική σημείωση: Κατά τη στιγμή της ανακίνησης, τα σωληνάρια θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία 17–25 °C. Η υπερβολική ανακίνηση ενδέχεται να προκαλέσει αποδιοργάνωση της γέλης και θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανώμαλα αποτελέσματα.

4. Μετά την επισήμανση, την πλήρωση και την ανακίνηση, τα σωληνάρια πρέπει να τοποθετηθούν σε επωαστήρα στους 37 °C ± 1 °C το συντομότερο δυνατόν και εντός 16 ωρών από τη συλλογή του αίματος. Πριν από την επώαση, φυλάσσετε και μεταφέρετε τα σωληνάρια σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C ± 5 °C). Εάν τα σωληνάρια QFT-Plus δεν επωαστούν στους 37 °C αμέσως μετά τη συλλογή αίματος και την ανακίνηση, αναστρέψτε τα σωληνάρια για να αναμείξετε 10 φορές πριν από την επώαση στους 37 °C.
5. Επώαστε τα σωληνάρια QFT-Plus σε ΚΑΤΑΚΟΡΥΦΗ θέση, στους 37 °C ± 1 °C, για 16 έως 24 ώρες. Για την επώαση δεν απαιτείται ούτε CO₂ ούτε ύγρανση.

Συλλογή αίματος σε σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη και κατόπιν μεταφορά σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Το αίμα μπορεί να συλλεχθεί σε ένα σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη ως αντιπηκτικό και κατόπιν να μεταφερθεί σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes. Χρησιμοποιήστε αποκλειστικά λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη ως αντιπηκτικό αίματος καθώς τα άλλα αντιπηκτικά επηρεάζουν τον προσδιορισμό. Επισημάνετε κατάλληλα τα σωληνάρια.

Συνιστάται να επισημαίνετε το σωληνάριο με την ώρα και την ημερομηνία της συλλογής αίματος.

Σημαντικό: Κατά τον χρόνο της συλλογής αίματος, τα σωληνάρια συλλογής αίματος θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου (17–25 °C).

2. Γεμίστε ένα σωληνάριο συλλογής αίματος με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη (ελάχιστος όγκος 5 ml) και αναμείξτε προσεκτικά αναστρέφοντας το σωληνάριο αρκετές φορές ώστε να διαλυθεί η ηπαρίνη. Αυτή η διαδικασία πρέπει να εκτελείται από εκπαιδευμένο αιμολήπτη.
3. Τηρείτε τις επιλογές χρόνου και θερμοκρασίας για τα σωληνάρια με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη πριν από τη μεταφορά και την επώαση σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes (βλ. Εικόνες 1-3 Επιλογές συλλογής αίματος).

Επιλογή 1 – Φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου και χειρισμός σωληναρίου με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη Το αίμα που συλλέγεται σε σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C ± 5 °C) για 16 ώρες κατά μέγιστο από τον χρόνο συλλογής πριν από τη μεταφορά σε σωληνάρια QFT Plus Blood Collection Tubes και την επακόλουθη επώαση.

Επιλογή 2 – Φύλαξη σε ψυχόμενο χώρο και χειρισμός σωληναρίου με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη

Σημαντικό: Οι βήματα α έως δ της διαδικασίας πρέπει να τηρούνται σε ακολουθία.

- a. Το αίμα που συλλέγεται σε σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη μπορεί να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου (17–25 °C) για έως και 3 ώρες μετά τη συλλογή αίματος.
 - b. Το αίμα που συλλέγεται σε σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη μπορεί να ψυχθεί (2–8 °C) για έως και 48 ώρες.
 - c. Μετά την ψύξη, το σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη πρέπει να εξισορροπήσει σε θερμοκρασία δωματίου (17–25 °C) πριν από τη μεταφορά σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes.
 - d. Τα κλάσματα σωληναρίων QFT-Plus Blood Collection Tubes θα πρέπει να τοποθετηθούν στον επωαστήρα 37 °C εντός 2 ωρών από τη μεταφορά του αίματος. Εάν τα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes δεν επωαστούν στους 37 °C αμέσως μετά τη μεταφορά σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes και την ανακίνηση, αναστρέψτε τα σωληνάρια για να αναμειξείτε 10 φορές πριν από την επώαση στους 37 °C. Ο συνολικός χρόνος από τη συλλογή αίματος μέχρι την επώαση σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τις 53 ώρες.
4. Μεταφορά δοκιμίου αίματος από σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes:
- a. Επισημάνετε καταλλήλως κάθε σωληνάριο QFT-Plus Blood Collection Tube. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σωληνάρια (Nil, TB1, TB2 και Mitogen) μπορούν να αναγνωριστούν από την ετικέτα τους ή με άλλο τρόπο αφού αφαιρεθεί το πώμα. Συνιστάται να μεταφέρετε την καταγεγραμμένη ώρα και ημερομηνία συλλογής αίματος από τα σωληνάρια με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη στα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes.
 - b. Τα δείγματα πρέπει να αναμειχθούν ομοιόμορφα με προσεκτική αναστροφή προτού διανεμηθούν στα σωληνάρια QFT Plus Blood Collection Tubes.
 - c. Η διανομή θα πρέπει να γίνει με άσηπτη τεχνική, σύμφωνα με τις κατάλληλες διαδικασίες ασφάλειας, με αφαίρεση των πωμάτων από τα 4 σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes και προσθήκη 1 ml αίματος σε κάθε σωληνάριο.

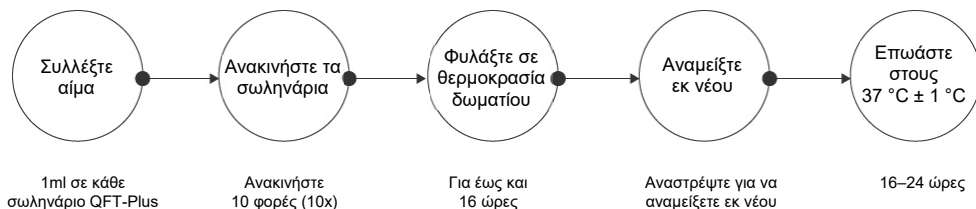
Τοποθετήστε ξανά τα πώματα των σωληναρίων με ασφάλεια και αναμείξτε τα όπως περιγράφεται παρακάτω. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σωληνάρια (Nil, TB1, TB2 και Mitogen) μπορούν να αναγνωριστούν από την ετικέτα τους ή με άλλο τρόπο αφού αφαιρεθεί το πώμα.

5. Αναμείξτε τα σωληνάρια. Αμέσως μόλις γεμίσετε τα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes, ανακινήστε τα δέκα (10) φορές αρκετά έντονα ώστε να βεβαιωθείτε ότι όλη η εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου έχει καλυφθεί με αίμα, αλλά όχι εντονότερα από αυτό. Έτσι θα διαλυθούν τα αντιγόνα που βρίσκονται στα τοιχώματα των σωληναρίων.

Η υπερβολική ανακίνηση ενδέχεται να προκαλέσει αποδιοργάνωση της γέλης και θα μπορούσε να οδηγήσει σε αμφισβητούμενα αποτελέσματα.

6. Μετά την επισήμανση, την πλήρωση και την ανακίνηση, τα σωληνάρια πρέπει να τοποθετηθούν σε επωαστήρα στους $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ εντός 2 ωρών. Εάν τα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes δεν επωαστούν στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ αμέσως μετά τη συλλογή αίματος και την ανακίνηση, αναστρέψτε στα σωληνάρια για να αναμείξετε 10 φορές (10x) πριν από την επώαση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Βλ. Εικόνες 1–3 στην επόμενη σελίδα για τις επιλογές συλλογής αίματος).
7. Επώαστε τα σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes σε ΚΑΤΑΚΟΡΥΦΗ θέση, στους $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, για 16 έως 24 ώρες. Για την επώαση δεν απαιτείται ούτε CO₂ ούτε ύγρανση.

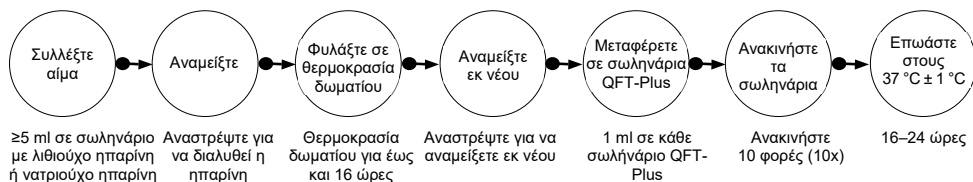
Συλλέξτε αίμα σε σωληνάρια QFT Plus Blood Collection Tubes και φυλάξτε σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 1. Επιλογή συλλογής αίματος: Απευθείας συλλογή αίματος σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes και φυλάξτε σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο συνολικός χρόνος από τη συλλογή αίματος σε σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes μέχρι την επώαση στους 37 °C δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 16 ώρες.

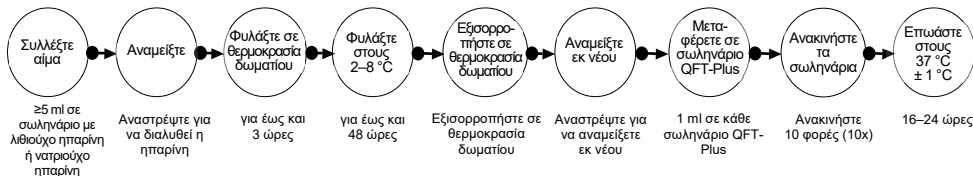
Συλλογή αίματος σε σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη και φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 2. Επιλογή συλλογής αίματος: Συλλογή αίματος σε σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη και φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο συνολικός χρόνος από τη συλλογή αίματος σε σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη μέχρι την επώαση στους 37 °C δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 16 ώρες.

Συλλογή αίματος σε σωληνάρια με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη και φυλάξτε στους 2–8 °C.



Εικόνα 3. Επιλογή συλλογής αίματος: Συλλογή αίματος σε σωληνάριο με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη και φυλάξτε στους 2–8 °C.

Ο συνολικός χρόνος από τη συλλογή αίματος σε σωληνάρια με λιθιούχο ή νατριούχο ηπαρίνη μέχρι την επώαση στους 37 °C δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 53 ώρες.

Οδηγίες χρήσης

Στάδιο 1 — Επώαση αίματος και συλλογή πλάσματος

Υλικά που παρέχονται

- Σωληνάρια QFT-Plus Blood Collection Tubes (βλ. ενότητα 3)

Υλικά που απαιτούνται (αλλά δεν παρέχονται)

- Βλ. ενότητα 3

Διαδικασία

1. Εάν το αίμα δεν επωαστεί αμέσως μετά τη συλλογή, θα πρέπει να γίνει ξανά ανάμειξη των σωληναρίων με αναστροφή τους 10 φορές, ακριβώς πριν από την επώαση.
2. Επωάστε τα σωληνάρια σε ΚΑΤΑΚΟΡΥΦΗ θέση, στους $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, για 16 έως 24 ώρες. Για την επώαση δεν απαιτείται ούτε CO_2 ούτε ύγρανση.
3. Μετά την επώαση στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, τα σωληνάρια συλλογής αίματος μπορούν να φυλαχθούν σε θερμοκρασία μεταξύ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ για έως και 3 ημέρες πριν από τη φυγοκέντρηση.
4. Μετά την επώαση των σωληναρίων στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, η συλλογή του πλάσματος διευκολύνεται με φυγοκέντρηση των σωληναρίων επί 15 λεπτά με ταχύτητα 2.000 έως $3.000 \times \text{RCF}$ (g). Το βύσμα γέλης θα διαχωρίσει τα κύτταρα από το πλάσμα. Εάν δεν συμβεί αυτό, τα σωληνάρια πρέπει να φυγοκεντρηθούν ξανά.

Το πλάσμα μπορεί να συλλεχθεί και χωρίς φυγοκέντρηση, ωστόσο απαιτείται περισσότερη προσοχή ώστε να αφαιρεθεί το πλάσμα χωρίς να διαταραχθούν τα κύτταρα.

5. Τα δείγματα πλάσματος θα πρέπει να συλλέγονται αποκλειστικά και μόνο με πιπέτα.

Σημαντική σημείωση: Μετά τη φυγοκέντρηση, αποφύγετε την παλινδρόμηση του υγρού κατά τη διανομή με πιπέτα και γενικά την ανάδευση του πλάσματος κατ' οποιονδήποτε τρόπο πριν από τη συλλογή. Να φροντίζετε πάντοτε να μη διαταράσσετε το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.

Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να φορτωθούν απευθείας από τα φυγοκεντρημένα σωληνάρια συλλογής αίματος στην πλάκα QFT-Plus ELISA, ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται αυτοματοποιημένοι σταθμοί εργασίας ELISA.

Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να φυλαχθούν για έως και 28 ημέρες σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C ή σε θερμοκρασία μικρότερη των -20 °C για παρατεταμένη χρονική περίοδο εφόσον έχει συλλεχθεί το πλάσμα.

Για να εξασφαλιστεί η επάρκεια των δειγμάτων, συλλέξτε τουλάχιστον 150 μl πλάσματος.

Στάδιο 2 — Δοκιμασία ELISA για την ιντερφερόνη- γ

Υλικά που παρέχονται

- Κιτ QFT-Plus ELISA (βλ. ενότητα 3)

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

- Βλ. ενότητα 3.

Διαδικασία

1. Όλα τα δείγματα πλάσματος και τα αντιδραστήρια, εκτός από το Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x, πρέπει να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (22 °C \pm 5 °C) πριν από τη χρήση. Αφήστε να περάσουν τουλάχιστον 60 λεπτά για εξισορρόπηση.

2. Αφαιρέστε τις περιπτώσεις σειρές από το πλαίσιο, σφραγίστε ξανά τη θήκη αλουμινίου και τοποθετήστε την ξανά στο ψυγείο για φύλαξη μέχρι την επόμενη χρήση.

Χρησιμοποιήστε τουλάχιστον 1 σειρά για τα πρότυπα QFT-Plus και επαρκή αριθμό σειρών για τον αριθμό των εξεταζόμενων ατόμων (βλ. Εικόνα 5). Μετά τη χρήση, φυλάξτε το πλαίσιο για χρήση με τις υπόλοιπες σειρές.

3. Ανασυστήστε το Πρότυπο ιντερφερόνης-γ με τον όγκο αποιονισμένου ή αποσταγμένου νερού που αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου. Αναμείξτε ήπια ώστε να περιοριστεί στο ελάχιστο ο σχηματισμός αφρού και να διασφαλιστεί πλήρης επαναδιαλυτοποίηση. Η ανασύσταση του προτύπου μέχρι τον καθορισμένο όγκο θα δώσει ένα διάλυμα με συγκέντρωση 8,0 IU/ml.

Σημαντική σημείωση: Ο όγκος ανασύστασης του προτύπου του kit διαφέρει ανάλογα με την παρτίδα.

Χρησιμοποιήστε το ανασυσταθέν πρότυπο του kit για να σχηματίσετε μια σειρά αραιώσεων ιντερφερόνης-γ σε Πράσινο αραιωτικό (GD) σε αναλογία 1 προς 2 και, στη συνέχεια, 1 προς 4 (βλ. Εικόνα 4). Το πρότυπο S1 (Πρότυπο 1) περιέχει 4,0 IU/ml, το S2 (Πρότυπο 2) περιέχει 1,0 IU/ml, το S3 (Πρότυπο 3) περιέχει 0,25 IU/ml και το S4 (Πρότυπο 4) περιέχει 0 IU/ml (GD μόνο). Τα πρότυπα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον εις διπλούν. Παρασκευάστε νέες αραιώσεις του προτύπου του kit για κάθε περίοδο εργασίας ELISA.

Συνιστώμενη διαδικασία για διπλά πρότυπα

Επισημάνετε 4 σωληνάρια ως «S1», «S2», «S3», «S4».

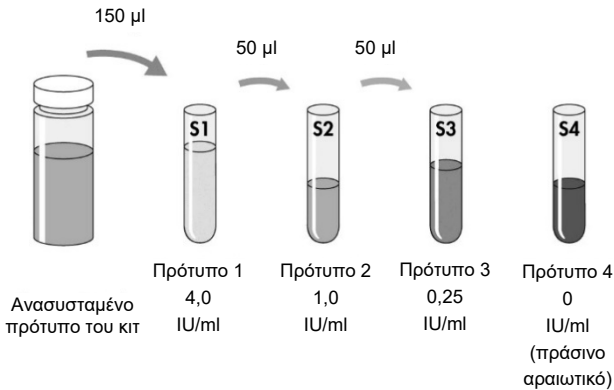
Προσθέστε 150 μl GD στα S1, S2, S3, S4.

Προσθέστε 150 μl του προτύπου του kit στο S1 και αναμείξτε καλά.

Μεταφέρετε 50 μl από το S1 στο S2 και αναμείξτε καλά.

Μεταφέρετε 50 μl από το S2 στο S3 και αναμείξτε καλά.

Ένα σωληνάριο με GD μόνο θα χρησιμοποιηθεί ως μηδενικό πρότυπο (S4).



Εικόνα 4. Προετοιμασία της πρότυπης καμπύλης.

4. Ανασυστήστε το λυόφιλο Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x με 0,3 ml απιονισμένου ή απεσταγμένου νερού. Αναμείξτε ήπια ώστε να περιοριστεί στο ελάχιστο ο σχηματισμός αφρού και να διασφαλιστεί πλήρης διαλυτοποίηση του συζευγμένου μορίου.

Η συγκέντρωση εργασίας του συζευγμένου μορίου παρασκευάζεται με αρραίωση της απαιτούμενης ποσότητας ανασυσταθέντος Συμπυκνώματος συζευγμένου μορίου 100x σε Πράσινο αραιωτικό (Πίνακας 1. Παρασκευή συζευγμένου μορίου). Επιστρέψτε το αχρησιμοποίητο Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x στους 2 °C έως 8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Χρησιμοποιήστε αποκλειστικά Πράσινο αραιωτικό.

Πίνακας 1. Παρασκευή συζευγμένου μορίου

Αριθμός σειρών	Όγκος Συμπυκνώματος συζευγμένου μορίου 100x	Όγκος Πράσινου αραιωτικού
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

5. Τα δείγματα πλάσματος που **λαμβάνονται από σωληνάρια συλλογής αίματος και κατόπιν φυλάσσονται (ψύχονται ή καταψύχονται) πρέπει να αναμειγνύονται προτού προστεθούν στο βύθισμα ELISA.**

Σημαντική σημείωση: Εάν τα δείγματα πλάσματος πρόκειται να προστεθούν απευθείας από τα φυγοκεντρημένα σωληνάρια QFT-Plus, θα πρέπει να αποφευχθεί οποιαδήποτε ανακίνηση του πλάσματος. Να φροντίζετε πάντοτε να μη διαταράσσετε το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.

6. Προσθέστε 50 µl πρόσφατα παρασκευασμένου διαλύματος συζευγμένου μορίου σε συγκέντρωση εργασίας στα απαιτούμενα βυθίσματα ELISA, χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα.
7. Προσθέστε 50 µl από κάθε εξεταζόμενο δείγμα πλάσματος στα κατάλληλα βυθίσματα χρησιμοποιώντας πολυκάναλη πιπέτα (ανατρέξτε στη συνιστώμενη διάταξη πλάκας της Εικόνα 5). Τέλος, προσθέστε 50 µl από καθένα από τα πρότυπα 1 έως 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
Γ	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
Δ	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
ΣΤ	2 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
Z	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Εικόνα 5. Συνιστώμενη διάταξη δειγμάτων (22 αναλύσεις ανά πλάκα)

S1 (Πρότυπο 1), S2 (Πρότυπο 2), S3 (Πρότυπο 3), S4 (Πρότυπο 4)

1 N (Δείγμα 1. Πλάσμα Nil), 1 TB1 (Δείγμα 1. Πλάσμα TB1), 1 TB2 (Δείγμα 1. Πλάσμα TB2), 1 M (Δείγμα 1. Πλάσμα Mitogen)

8. Καλύψτε κάθε πλάκα και αναμείξτε σχολαστικά το συζευγμένο μόριο και τα δείγματα πλάσματος/πρότυπα χρησιμοποιώντας συσκευή ανακίνησης μικροπλακών επί 1 λεπτό. Αποφύγετε την εκτίναξη υγρού.

9. Καλύψτε κάθε πλάκα και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (22 ± 5 °C) επί 120 ± 5 λεπτά.

Οι πλάκες δεν θα πρέπει να εκτεθούν σε άμεσο ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της επώασης.

10. Κατά τη διάρκεια της επώασης, αραιώστε ένα μέρος συμπυκνώματος ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 20x με 19 μέρη απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού και αναμείξτε σχολαστικά. Παρέχεται επαρκές συμπύκνωμα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης 20x για να παρασκευαστούν 2 λίτρα ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης σε συγκέντρωση εργασίας.

Εκπλύνετε τα βυθίσματα με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης σε συγκέντρωση εργασίας επί 6 κύκλους τουλάχιστον. Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακών.

Η σχολαστική έκπλυση είναι πολύ σημαντική για την εκτέλεση του προσδιορισμού. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα βυθίσματα **γεμίζουν εντελώς** με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης μέχρι το χείλος του βυθίσματος για κάθε κύκλο έκπλυσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας τουλάχιστον 5 δευτερολέπτων μεταξύ των κύκλων.

Θα πρέπει να προστίθεται τυπικό απολυμαντικό εργαστηρίου στη δεξαμενή εκροής και θα πρέπει να εφαρμόζονται οι καθιερωμένες διαδικασίες για την απολύμανση των δυνητικά λοιμογόνων υλικών.

11. **Χτυπήστε τις πλάκες ανάποδα πάνω σε απορροφητικό χαρτί που δεν αφήνει χνούδι για να απομακρυνθεί το εναπομένον ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Προσθέστε 100 μl διαλύματος υποστρώματος ενζύμου σε κάθε βύθισμα, καλύψτε κάθε πλάκα και αναμείξτε σχολαστικά με μια συσκευή ανακίνησης μικροπλακών.**
12. **Καλύψτε κάθε πλάκα και επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου (22 ± 5 °C) επί 30 λεπτά.**

Οι πλάκες δεν θα πρέπει να εκτεθούν σε άμεσο ηλιακό φως κατά τη διάρκεια της επώασης.

13. **Μετά την 30λεπτη επώαση, προσθέστε 50 μl διαλύματος διακοπής ενζυμικής αντίδρασης σε κάθε βύθισμα και αναμείξτε.**

Το διάλυμα διακοπής ενζυμικής αντίδρασης θα πρέπει να προστίθεται στα βυθίσματα με την ίδια σειρά και με την ίδια περίπου ταχύτητα όπως και το υπόστρωμα στο βήμα 11.

14. **Μετρήστε την οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) σε κάθε βύθισμα εντός 5 λεπτών από τη διακοπή της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών που διαθέτει φίλτρο 450 nm και φίλτρο αναφοράς 620 nm έως 650 nm. Οι τιμές OD χρησιμοποιούνται για να υπολογιστούν τα αποτελέσματα.**

Υπολογισμοί και ερμηνεία δοκιμασιών

Το λογισμικό ανάλυσης QFT-Plus μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πρωτογενών δεδομένων και τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων. Μπορείτε να το προμηθευτείτε από τη διεύθυνση www.QuantiFERON.com. Φροντίστε να χρησιμοποιήσετε την πιο πρόσφατη έκδοση του λογισμικού ανάλυσης QFT-Plus.

Το λογισμικό εκτελεί εκτίμηση ελέγχου ποιότητας του προσδιορισμού, σχεδιάζει την πρότυπη καμπύλη και δίνει ένα αποτέλεσμα δοκιμασίας για κάθε εξεταζόμενο, όπως περιγράφεται στην ενότητα περί ερμηνείας αποτελεσμάτων.

Εναλλακτικά, αντί για τη χρήση του λογισμικού ανάλυσης QFT-Plus, ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει με την εξής μέθοδο.

Παραγωγή της πρότυπης καμπύλης

(Εάν δεν χρησιμοποιείται το λογισμικό ανάλυσης QFT-Plus)

Προσδιορίστε τις μέσες τιμές OD από τις επαναλήψεις του προτύπου του κιτ σε κάθε πλάκα.

Κατασκευάστε μια πρότυπη καμπύλη $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$, σχεδιάζοντας τις τιμές $\log_{(e)}$ της μέσης OD (άξονας y) έναντι των τιμών $\log_{(e)}$ της συγκέντρωσης ιντερφερόνης- γ των προτύπων, σε IU/ml (άξονας x), παραλείποντας το μηδενικό πρότυπο από τους υπολογισμούς αυτούς. Μέσω ανάλυσης παλινδρόμησης, υπολογίστε την καμπύλη καλύτερης προσαρμογής για την πρότυπη καμπύλη.

Χρησιμοποιήστε την πρότυπη καμπύλη για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση της ιντερφερόνης- γ (IU/ml) για καθένα από τα εξεταζόμενα δείγματα πλάσματος, με βάση την τιμή OD κάθε δείγματος.

Αυτοί οι υπολογισμοί μπορούν να εκτελεστούν με τα πακέτα λογισμικού που συνοδεύουν τις συσκευές ανάγνωσης μικροπλακών ή με κοινό λογισμικό λογιστικών φύλλων ή στατιστικής επεξεργασίας (όπως το Microsoft® Excel®). Συνιστάται η χρήση αυτών των πακέτων για την εκτέλεση της ανάλυσης παλινδρόμησης και για τον υπολογισμό του συντελεστή διακύμανσης (Coefficient of Variation, %CV) για τα πρότυπα και του συντελεστή συσχέτισης (r) για την πρότυπη καμπύλη.

Έλεγχος ποιότητας δοκιμασίας

Η ορθότητα των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας εξαρτάται από την παραγωγή μιας ορθής πρότυπης καμπύλης. Συνεπώς, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα πρότυπα πρέπει να εξετάζονται προτού ερμηνευτούν τα αποτελέσματα των εξεταζόμενων δειγμάτων.

Για μια έγκυρη ανάλυση ELISA:

- Η μέση τιμή OD για το πρότυπο 1 πρέπει να είναι $\geq 0,600$.
- Ο συντελεστής %CV για τις τιμές OD των επαναληπτικών μετρήσεων του προτύπου 1 και του προτύπου 2 πρέπει να είναι $\leq 15\%$.
- Οι τιμές OD των επαναληπτικών μετρήσεων του προτύπου 3 και του προτύπου 4 δεν πρέπει να διαφέρουν από τη μέση τιμή κατά περισσότερες από 0,040 μονάδες οπτικής πυκνότητας.
- Ο συντελεστής συσχέτισης (r) που υπολογίζεται από τις μέσες τιμές απορρόφησης των προτύπων πρέπει να είναι $\geq 0,98$.

Το λογισμικό ανάλυσης QFT-Plus υπολογίζει και αναφέρει αυτές τις παραμέτρους ελέγχου ποιότητας.

Εάν δεν πληρούνται τα παραπάνω κριτήρια, η ανάλυση είναι άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.

Η μέση τιμή OD για το μηδενικό πρότυπο (πράσινο αραιωτικό) πρέπει να είναι $\leq 0,150$. Εάν οι μέσες τιμές OD είναι $> 0,150$ τότε θα πρέπει να ελεγχθεί η διαδικασία έκπλυσης των πλακών.

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας QFT-Plus ερμηνεύονται με βάση τα παρακάτω κριτήρια (Πίνακας 2):

Σημαντική σημείωση: Για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό της ενεργής νόσου φυματίωσης, καθώς και για την εκτίμηση της πιθανότητας ύπαρξης LTBI, απαιτείται ένας συνδυασμός επιδημιολογικών, ιστορικών, ιατρικών και διαγνωστικών ευρημάτων που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της QFT-Plus.

Πίνακας 2. Ερμηνεία αποτελεσμάτων της δοκιμασίας QFT-Plus

Nil (IU/ml)	TB1 μείον Nil (IU/ml)	TB2 μείον Nil (IU/ml)	Mitogen μείον Nil (IU/ml)*	Αποτέλεσμα QFT-Plus	Αναφορά/Ερμηνεία
≤ 8,0	≥ 0,35 και ≥ 25% της τιμής Nil	Οποιοδήποτε	Οποιοδήποτε	Θετικό [†]	Μόλυνση από <i>M. tuberculosis</i> πιθανή
	Οποιοδήποτε	≥ 0,35 και ≥ 25% της τιμής Nil			
	< 0,35 ή ≥ 0,35 και < 25% της τιμής Nil	< 0,35 ή ≥ 0,35 και < 25% της τιμής Nil	≥ 0,5	Αρνητικό	Μόλυνση από <i>M. tuberculosis</i> ΟΧΙ πιθανή
	< 0,35 ή ≥ 0,35 και < 25% της τιμής Nil	< 0,35 ή ≥ 0,35 και < 25% της τιμής Nil	< 0,5	Απροσδιόριστο [‡]	Η πιθανότητα μόλυνσης από <i>M. tuberculosis</i> δεν μπορεί να προσδιοριστεί
> 8,0 [§]		Οποιοδήποτε		Απροσδιόριστο [‡]	Η πιθανότητα μόλυνσης από <i>M. tuberculosis</i> δεν μπορεί να προσδιοριστεί

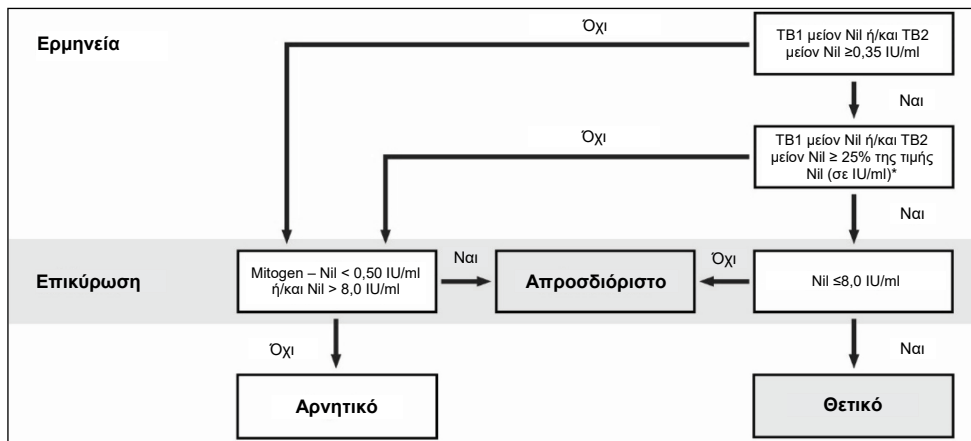
*Οι απαντήσεις στον θετικό μάρτυρα Mitogen (και ενίοτε στα αντιγόνα TB) βρίσκονται εκτός της κλίμακας της συσκευής ανάγνωσης μικροπλακών. Αυτό δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της δοκιμασίας. Οι τιμές > 10 ml αναφέρονται από το λογισμικό QFT-Plus ως > 10 IU/ml.

[†] Όταν δεν υπάρχουν υποψίες για μόλυνση από *M. tuberculosis*, ένα αρχικά θετικό αποτέλεσμα μπορεί να επιβεβαιωθεί με επανεξέταση των αρχικών δειγμάτων πλάσματος εις διπλούν με τη δοκιμασία QFTPlus ELISA. Εάν η μία ή και οι δύο επαναλήψεις δώσουν θετικό αποτέλεσμα στην επανεξέταση, το άτομο θα πρέπει να θεωρείται θετικό στη δοκιμασία.

[‡]Ανατρέξτε στην ενότητα περί αντιμετώπισης προβλημάτων για να βρείτε τις πιθανές αιτίες.

[§]Σε κλινικές μελέτες, λιγότερο από το 0,25% των ασθενών έδωσε επίπεδα ιντερφερόνης-γ > 8,0 IU/ml για την τιμή Nil.

Το μέγεθος του μετρούμενου επιπέδου ιντερφερόνης-γ δεν συσχετίζεται με το στάδιο ή τον βαθμό της λοίμωξης, το επίπεδο ανοσολογικής απάντησης ή την πιθανότητα εξέλιξης σε ενεργή νόσο. Οι θετικές απαντήσεις TB σε άτομα που είναι αρνητικά στο Mitogen είναι σπάνιες, ωστόσο έχουν διαπιστωθεί σε ασθενείς που νοσούν από φυματίωση. Αυτό υποδεικνύει ότι η απάντηση ιντερφερόνης-γ στο αντιγόνο TB είναι μεγαλύτερη από την απάντηση στο Mitogen, κάτι που είναι πιθανό καθώς το επίπεδο Mitogen δεν διεγείρει στον μέγιστο βαθμό την παραγωγή ιντερφερόνης-γ από τα λεμφοκύτταρα.



* Για να είναι έγκυρο το TB1 μείον Nil ή το TB2 μείον Nil, ποσότητα $\geq 25\%$ της τιμής Nil σε IU/ml πρέπει να προέρχεται από το ίδιο σωληνάριο όπως το αρχικό αποτέλεσμα $\geq 0,35$ IU/ml.

Εικόνα 6. Διάγραμμα ροής για την ερμηνεία της δοκιμασίας QFT-Plus

Περιορισμοί

Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών QFT-Plus πρέπει να αξιολογούνται σε συνδυασμό με πληροφορίες από το επιδημιολογικό ιστορικό, την υφιστάμενη κατάσταση της υγείας και άλλες διαγνωστικές αξιολογήσεις του ατόμου.

Τα άτομα με τιμές Nil μεγαλύτερες από 8,0 IU/ml χαρακτηρίζονται «απροσδιόριστα» επειδή μια απάντηση κατά 25% υψηλότερη στα αντιγόνα TB ενδέχεται να είναι εκτός της κλίμακας μέτρησης του προσδιορισμού.

Αναξιόπιστα ή απροσδιόριστα αποτελέσματα ενδέχεται να ληφθούν λόγω:

- Αποκλίσεων από τη διαδικασία που περιγράφεται σε αυτό το ένθετο συσκευασίας
- Υπερβολικών επιπέδων ιντερφερόνης- γ στην κυκλοφορία ή παρουσίας ετερόφιλων αντισωμάτων
- Παρέλευσης διαστήματος μεγαλύτερου από 16 ώρες μεταξύ της συλλογής αίματος και της επώασης στους 37 °C. Αυτό δεν ισχύει εάν χρησιμοποιήθηκε η ροή εργασίας με το σωληνάριο με λιθιούχο ηπαρίνη ή νατριούχο ηπαρίνη με φύλαξη στους 2–8 °C.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Κλινικές μελέτες

Καθώς δεν υπάρχει καθορισμένο πρότυπο για την LTBI, δεν είναι πρακτικά εφικτό να αξιολογηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα της δοκιμασίας QFT-Plus. Η ειδικότητα της δοκιμασίας QFT-Plus προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση μέσω αξιολόγησης των ποσοστών ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων σε άτομα με χαμηλό κίνδυνο λοίμωξης φυματίωσης (χωρίς γνωστούς παράγοντες κινδύνου). Η ευαισθησία προσδιορίστηκε κατά προσέγγιση μέσω αξιολόγησης ομάδων ασθενών με ενεργή νόσο φυματίωσης επιβεβαιωμένη με καλλιέργεια.

Ειδικότητα

Διεξήχθη μελέτη αξιολόγησης της δοκιμασίας QFT-Plus σε 409 άτομα. Δημογραφικά στοιχεία και παράγοντες κινδύνου για την έκθεση στη φυματίωση προσδιορίστηκαν με ένα τυποποιημένο ερωτηματολόγιο κατά τη διάρκεια της εξέτασης.

Σε μια περίληψη των ευρημάτων από τις 2 ομάδες ασθενών με χαμηλό κίνδυνο λοίμωξης φυματίωσης (χωρίς γνωστούς παράγοντες κινδύνου), η συνολική ειδικότητα της δοκιμασίας QFT-Plus ήταν 97,6% (399/409) (Πίνακας 3 και Πίνακας 4).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα μελέτης ειδικότητας της δοκιμασίας QFT-Plus ανά ερευνητικό κέντρο

Μελέτη	Θετικό	Αρνητικό	Απροσδιόριστο	Ειδικότητα (95% CI)
Ιαπωνία	4	203	0	98% (95–100%)
Αυστραλία	6	196	0	97% (94–99%)

Πίνακας 4. Αποτελέσματα μελέτης ειδικότητας της δοκιμασίας QFT-Plus ανά σωληνάριο αντιγόνου TB

Μελέτη	TB1	TB2	QFT-Plus
Θετικό	5	10	10
Αρνητικό	404	399	399
Απροσδιόριστο	0	0	0
Ειδικότητα (95% CI)	98,8% (97,2-99,6)	97,6% (95,6-98,8)	97,6% (95,6-98,8)

Ευαισθησία για την ενεργή φυματίωση

Δεν υπάρχει καθοριστική πρότυπη δοκιμασία για την LTBI, αλλά ένα κατάλληλο υποκατάστατο είναι η μικροβιολογική καλλιέργεια του *M. tuberculosis* καθώς οι ασθενείς με τη νόσο είναι μολυσμένοι εξ ορισμού. Ασθενείς με πιθανολογούμενη φυματίωση από 4 ερευνητικά κέντρα στην Αυστραλία και την Ιαπωνία, στους οποίους αργότερα επιβεβαιώθηκε η μόλυνση από *M. tuberculosis* μέσω καλλιέργειας, εξετάστηκαν ώστε να αξιολογηθεί η ευαισθησία της QFT-Plus (Πίνακας 5 και Πίνακας 6). Οι ασθενείς είχαν λάβει θεραπεία επί λιγότερες από 14 ημέρες όταν ελήφθησαν δείγματα για δοκιμασία QFT-Plus.

Σε μια περίληψη των ευρημάτων από τις 4 ομάδες ασθενών με θετική καλλιέργεια *M. tuberculosis*, η συνολική ευαισθησία της QFT-Plus ως προς την ενεργή φυματίωση ήταν 95,3% (164/172). Στις 4 ομάδες, 159 ασθενείς βρέθηκαν θετικοί και με τα δύο σωληνάρια (TB1 και TB2), 1 ασθενής βρέθηκε θετικός μόνο με το TB1 και 4 βρέθηκαν θετικοί μόνο με το TB2. Συνολικά, το 1,1% (2/174) των αποτελεσμάτων ήταν απροσδιόριστο. Με το αποτέλεσμα του σωληναρίου TB2 ταυτοποιήθηκε ορθά 1 ασθενής με μόλυνση επιβεβαιωμένη μέσω καλλιέργειας, του οποίου το αποτέλεσμα θα ήταν απροσδιόριστο (λόγω χαμηλού Mitogen) μόνο με το σωληνάριο TB1 (βλ. Πίνακας 5 και Πίνακας 6).

Πίνακας 5. Αποτελέσματα της μελέτης ευαισθησίας της δοκιμασίας QFT-Plus ανά ερευνητικό κέντρο

Ερευνητικά κέντρα	Θετικό	Αρνητικό	Απροσδιόριστο	Ευαισθησία QFT-Plus* (95% CI)
Ιαπωνία — κέντρο 1	36	7	0	84% (69–93)
Ιαπωνία — κέντρο 2	53	1	2	98% (90–100)
Ιαπωνία — κέντρο 3	54	0	0	100% (93–100)
Κέντρο Αυστραλίας	21	0	0	100% (84–100)

*Η ευαισθησία βασίζεται στον συνολικό αριθμό έγκυρων δοκιμασιών, αφού εξαιρεθούν τα απροσδιόριστα αποτελέσματα.

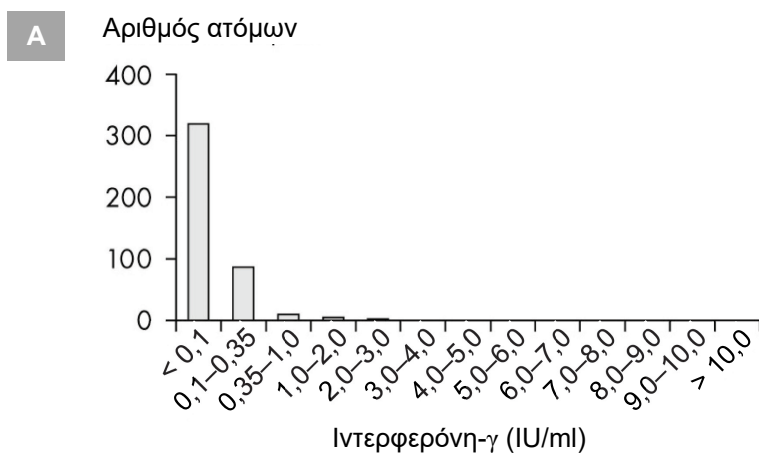
Πίνακας 6. Αποτελέσματα μελέτης ευαισθησίας της μεθόδου QFT-Plus ανά σωληνάριο αντιγόνου TB

	TB1	TB2	QFT-Plus
Θετικό	160	163	164
Αρνητικό	11	9	8
Απροσδιόριστο	3	2	2
Ευαισθησία [†] (95% CI)	93,6% (88,8–96,7)	94,8% (90,3–97,6)	95,3% (90,9–97,9)

*Η ευαισθησία βασίζεται στον συνολικό αριθμό έγκυρων δοκιμασιών, αφού εξαιρεθούν τα απροσδιόριστα αποτελέσματα.

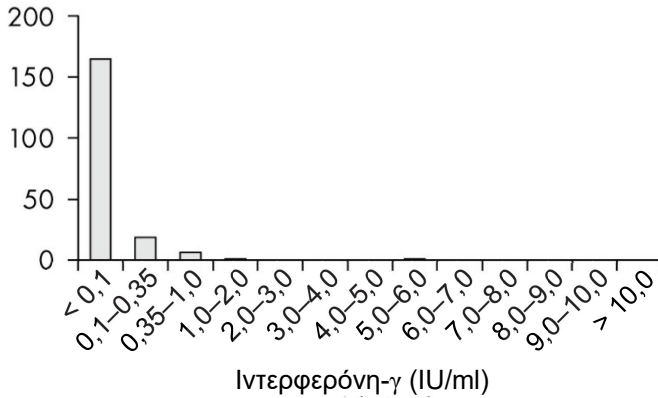
Παρατηρηθείσες κατανομές απαντήσεων — στρωματοποιημένες ανάλογα με τον κίνδυνο

Σε κλινικές δοκιμές παρατηρήθηκε ένα εύρος απαντήσεων της ιντερφερόνης- γ στα σωληνάρια TB1, TB2 και ορού ελέγχου που στρωματοποιήθηκαν ανάλογα με τον κίνδυνο για λοίμωξη από *M. tuberculosis* (Εικόνες 7-9). Η ομάδα μικτού κινδύνου αποτελείται από άτομα αντιπροσωπευτικά ενός γενικού εξεταζόμενου πληθυσμού και συμπεριλαμβάνει άτομα με και χωρίς παράγοντες κινδύνου για έκθεση στη φυματίωση και άτομα με μικρές πιθανότητες ενεργής φυματίωσης (π.χ. LTBI).

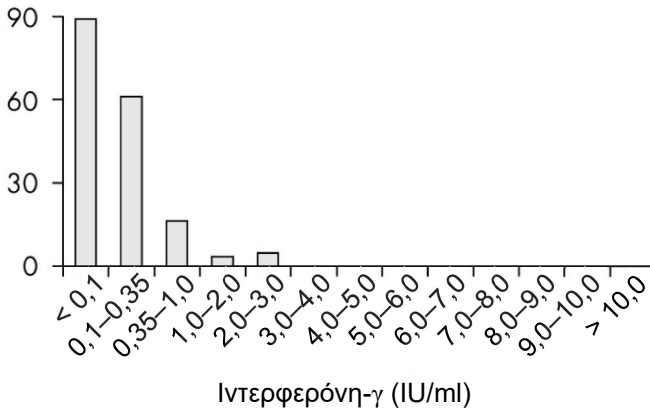


Β

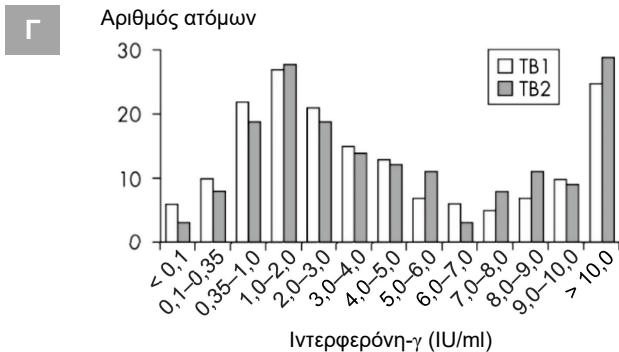
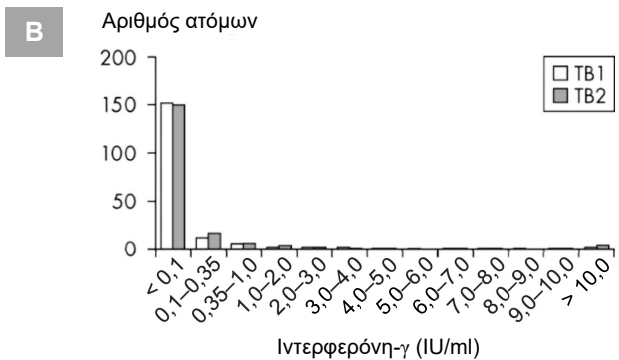
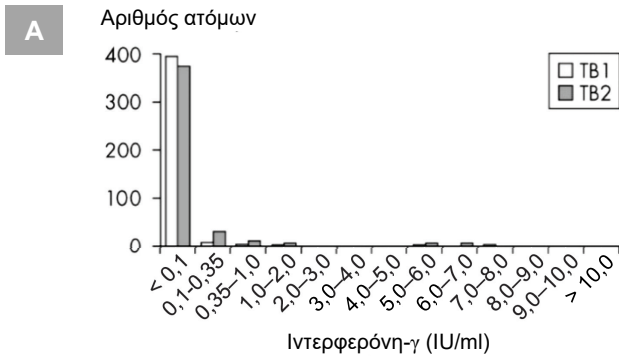
Αριθμός ατόμων

**Γ**

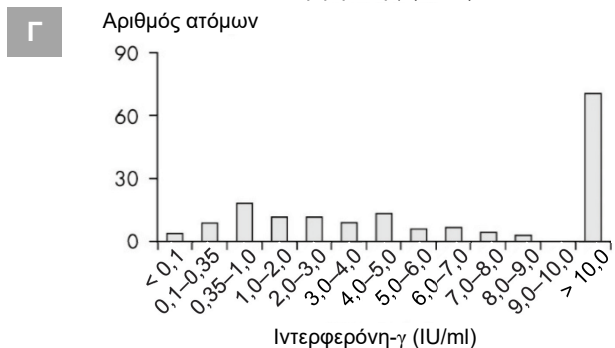
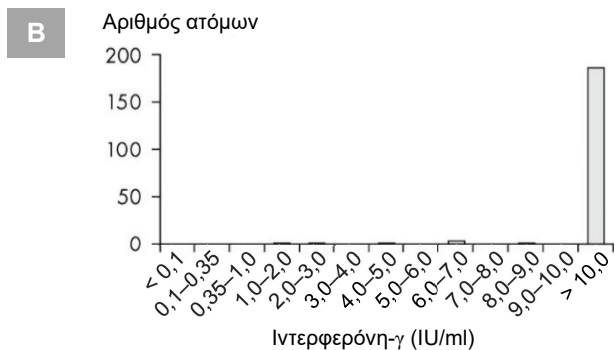
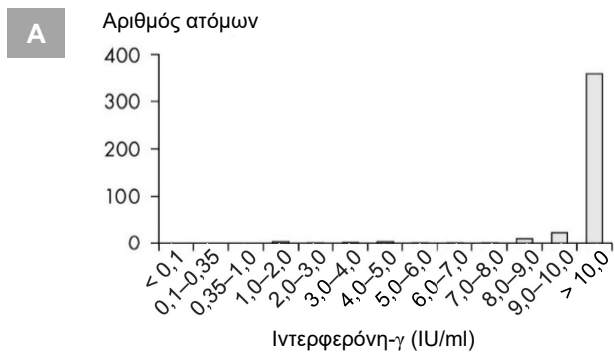
Αριθμός ατόμων



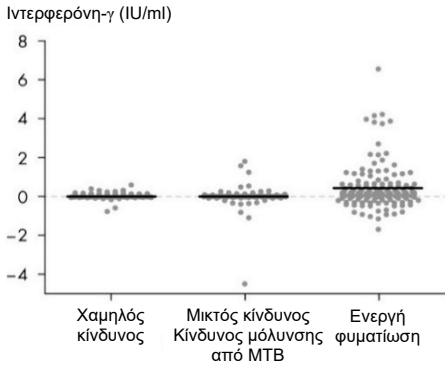
Εικόνα 7. Κατανομή αποτελεσμάτων Nil. **Α.** Κατανομή τιμών Nil σε πληθυσμό χαμηλού κινδύνου (n = 409). **Β.** Κατανομή τιμών Nil σε πληθυσμό μικτού κινδύνου (n = 194). **Γ.** Κατανομή τιμών Nil σε πληθυσμό με μόλυνση από *M. tuberculosis* επιβεβαιωμένη μέσω καλλιέργειας (n=174).



Εικόνα 8. Κατανομή αποτελεσμάτων TB1 και TB2 (μετά την αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα). **A.** Κατανομή τιμών TB1 και TB2 (μετά την αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα) σε πληθυσμό χαμηλού κινδύνου (n = 409). **B.** Κατανομή τιμών TB1 και TB2 (μετά την αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα) σε πληθυσμό μικτού κινδύνου (n = 194). **Γ.** Κατανομή τιμών TB1 και TB2 (μετά την αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα) σε πληθυσμό με μόλυνση από *M. tuberculosis* επιβεβαιωμένη μέσω καλλιέργειας (n = 174).



Εικόνα 9. Κατανομή αποτελεσμάτων Mitogen (μετά την αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα). Α. Κατανομή τιμών Mitogen (μετά την αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα) σε πληθυσμό χαμηλού κινδύνου (n = 409). **Β.** Κατανομή τιμών Mitogen (μετά την αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα) σε πληθυσμό μικτού κινδύνου (n = 194). **Γ.** Κατανομή τιμών Mitogen (μετά την αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα) σε πληθυσμό με μόλυνση από *M. tuberculosis* επιβεβαιωμένη μέσω καλλιέργειας (n = 169).

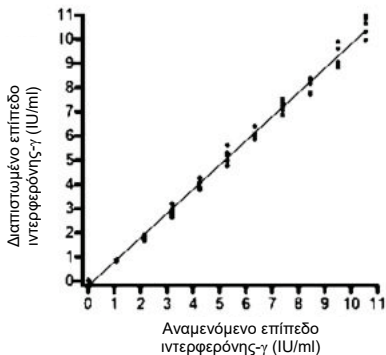


Εικόνα 10. Παρατηρηθείσα διαφορά μεταξύ των τιμών TB1 και TB2 (μετά την αφαίρεση του μηδενικού μάρτυρα), στρωματοποιημένη ανάλογα με τον κίνδυνο. Πληθυσμός χαμηλού κινδύνου (n = 409), πληθυσμός μικτού κινδύνου (n = 189) και πληθυσμός με μόλυνση από *M. tuberculosis* επιβεβαιωμένη μέσω καλλιέργειας (n = 141). Οι τιμές TB1 αφαιρέθηκαν από τις τιμές TB2. Εξαίρεθηκαν άτομα με τιμές TB1 ή TB2 > 10,0 IU/ml, επειδή οι τιμές αυτές βρίσκονται εκτός της γραμμικής περιοχής της μεθόδου.

Χαρακτηριστικά απόδοσης προσδιορισμού

Η γραμμικότητα του προσδιορισμού QFT-Plus ELISA αποδείχθηκε με τυχαία τοποθέτηση 5 επαναληπτικών δειγμάτων από 11 δεξαμενές πλάσματος με γνωστές συγκεντρώσεις ιντερφερόνης-γ πάνω στην πλάκα ELISA. Η καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης έχει κλίση $1,002 \pm 0,011$ και συντελεστή συσχέτισης 0,99 (Εικόνα 11).

Το όριο ανίχνευσης του προσδιορισμού QFT-Plus ELISA είναι 0,065 IU/ml, ενώ ο προσδιορισμός δεν εμφανίζει στοιχεία φαινομένου προζώνης (υψηλών δόσεων) σε συγκεντρώσεις ιντερφερόνης-γ έως και 10.000 IU/ml.



Εικόνα 11. Προφίλ γραμμικότητας του προσδιορισμού QFT-Plus ELISA

Η ανακρίβεια εντός και μεταξύ αναλύσεων (% CV) του προσδιορισμού QFT-Plus ELISA υπολογίστηκε με εξέταση 20 δειγμάτων πλάσματος με ποικίλες συγκεντρώσεις ιντερφερόνης- γ σε 3 επαναλήψεις, σε 3 διαφορετικά εργαστήρια, σε 3 μη διαδοχικές ημέρες και από 3 διαφορετικούς χειριστές. Συνεπώς κάθε δείγμα εξετάστηκε 27 φορές σε 9 ανεξάρτητες σειρές αναλύσεων. Το ένα δείγμα ήταν δείγμα ελέγχου Nil και είχε υπολογιζόμενη συγκέντρωση ιντερφερόνης- γ ίση με 0,08 IU/ml (95% CI: 0,07–0,09). Στα υπόλοιπα 19 δείγματα πλάσματος, οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 0,33 (95% CI: 0,31–0,34) έως 7,7 IU/ml (95% CI: 7,48–7,92).

Η ανακρίβεια εντός σειράς αναλύσεων εκτιμήθηκε με υπολογισμό του μέσου όρου των συντελεστών %CV για κάθε εξεταζόμενο πλάσμα που περιείχε ιντερφερόνη- γ από κάθε σειρά αναλύσεων πλάκας (n = 9) και κυμάνθηκε από 4,1 έως 9,1 %CV. Η μέση συνδιακύμανση εντός σειράς αναλύσεων (\pm 95% CI) ήταν 6,6% \pm 0,6%. Η μέση τιμή του πλάσματος μηδενικής ιντερφερόνης- γ ήταν 14,1 %CV.

Η συνολική ανακρίβεια (μεταξύ αναλύσεων) προσδιορίστηκε με σύγκριση των 27 υπολογισμένων συγκεντρώσεων ιντερφερόνης- γ για κάθε εξεταζόμενο δείγμα πλάσματος. Η ανακρίβεια μεταξύ αναλύσεων κυμάνθηκε από 6,6 έως 12,3 %CV. Η συνολική μέση τιμή %CV (\pm 95% CI) ήταν 8,7% \pm 0,7%. Το δείγμα πλάσματος μηδενικής ιντερφερόνης- γ είχε 26,1 %CV. Αυτό το επίπεδο μεταβλητότητας είναι αναμενόμενο επειδή η υπολογιζόμενη συγκέντρωση ιντερφερόνης- γ είναι χαμηλή και η μεταβλητότητα γύρω από τις χαμηλές εκτιμώμενες τιμές συγκέντρωσης θα είναι υψηλότερη απ' ό,τι γύρω από υψηλές συγκεντρώσεις.

Η αναπαραγωγιμότητα της δοκιμασίας QFT-Plus προσδιορίστηκε με χρήση δειγμάτων αίματος από 102 άτομα με μικτούς παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από *M. tuberculosis*. Αξιολογήθηκαν τρεις διαφορετικοί χειριστές και εργαστηριακές συνθήκες.

Διενεργήθηκαν συνολικά 3 διαγνωστικοί προσδιορισμοί για κάθε άτομο και 306 προσδιορισμοί στο σύνολο, για όλα τα άτομα. Συνολικά, η διαγνωστική αναπαραγωγιμότητα ήταν 99% (95% CI: 97,2–99,7), με 303 από τους 306 προσδιορισμούς να παρουσιάζουν συμφωνία των διαγνωστικών αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα 3 ατόμων που ήταν κοντά στην οριακή τιμή αποκοπής ευθύνονταν για ολόκληρη την έκταση της διακύμανσης.

Διάγνωση LTBI

Έχει δημοσιευτεί μια σειρά μελετών που δείχνουν τις επιδόσεις της δοκιμασίας QFT, που υπήρξε πρόδρομος της QFT-Plus, σε διάφορους πληθυσμούς υπό κίνδυνο λοίμωξης από MTB. Τα κυριότερα ευρήματα ορισμένων από τις μελέτες αυτές φαίνονται στον Πίνακας 7.

Πίνακας 7. Επιλεγμένες δημοσιευμένες μελέτες για τη δοκιμασία QFT

Πληθυσμός/ κατάσταση	Εκβάσεις και ευρήματα	Συνολικός αριθμός δημοσιευμένων μελετών
Παιδιατρικός πληθυσμός	Αποδεδειγμένες επιδόσεις σε παιδιά, συμπεριλαμβανομένων παιδιών ηλικίας κάτω των 5 ετών (45–46), με υψηλότερη ορθότητα από τη βασισόμενη σε ELISpot μέθοδο IGRA (8). Η μεγαλύτερη μέχρι σήμερα μελέτη που συνέκρινε τις δοκιμασίες QFT και TST σε παιδιά από το Βιετνάμ, τις Φιλιππίνες και το Μεξικό υποστηρίζει ότι είναι προτιμητέα η χρήση της δοκιμασίας QFT σε σχέση με τη δοκιμασία TST για την εξέταση παιδιών γεννημένων στο εξωτερικό, ως προς την παρουσία LTBI (46). Μια μελέτη σε παιδιά με περιορισμένες επαφές δείχνει καλύτερη προβλεπτική αξία της δοκιμασίας QFT σε σχέση με την TST σε παιδιά (47) και 8πλάσιο κίνδυνο εξέλιξης σε ενεργή φυματίωση εντός δύο ετών μεταξύ των ατόμων με μετατροπή της κατάστασης QFT σε σχέση με άτομα χωρίς μετατροπή QFT (48). Η ασυμφωνία μεταξύ QFT-αρνητικών και TST-θετικών είναι υψηλή σε παιδιά που έχουν λάβει το εμβόλιο BCG (46, 49), ωστόσο δεν υπήρξε επίδραση στην απάντηση στο Mitogen σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών (49) και βρέθηκαν χαμηλά ποσοστά απροσδιόριστου αποτελέσματος κατά τον προληπτικό έλεγχο ρουτίνας σε παιδιά μεταναστών (46).	152
Εγκυμοσύνη	Σε περιβάλλον χαμηλής επιβάρυνσης, η δοκιμασία QFT έχει εξίσου καλές επιδόσεις σε όλα τα τρίμηνα της εγκυμοσύνης, με αποτελέσματα συγκρίσιμα με των μη εγκύων γυναικών, είναι πολύ πιο ειδική, είναι τουλάχιστον εξίσου ευαίσθητη και ίσως προβλέπει την εξέλιξη της νόσου καλύτερα από τη δοκιμασία TST (50). Σε περιβάλλον υψηλής επιβάρυνσης, η δοκιμασία QFT ήταν σταθερότερη καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και προσέγγιζε περισσότερο τον επιπολασμό υποβάθρου της LTBI σε σύγκριση με τη δοκιμασία TST, ωστόσο οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η εγκυμοσύνη επηρεάζει τόσο την QFT όσο και την TST (51).	6

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Πίνακας 7. Επιλεγμένες δημοσιευμένες μελέτες για τη μέθοδο QFT (συνέχεια)

Πληθυσμός/ κατάσταση	Εκβάσεις και ευρήματα	Συνολικός αριθμός δημοσιευμένων μελετών
HIV/AIDS	Τόσο οι δοκιμασίες IGRA όσο και η δοκιμασία TST επηρεάζονται από τη λοίμωξη με τον HIV και το σύνολο των στοιχείων υποδηλώνει ότι απαιτείται προσοχή κατά την ερμηνεία αποτελεσμάτων σε άτομα με αριθμό CD4+ < 200 (52). Έχει δείχθει ότι η δοκιμασία QFT επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από τη βασιζόμενη σε ELISpot IGRA και την TST (53–55). Επειδή οι δοκιμασίες IGRA χρειάζονται μόνο μία επίσκεψη, παρακάμπτεται το πρόβλημα της δοκιμασίας TST λόγω του χαμηλού ποσοστού επιστροφής για επανεξέταση στον πληθυσμό αυτό (53).	101
Ανοσοκατασταλτικές θεραπείες	Η δοκιμασία QFT επηρεάζεται από τις ανοσοκατασταλτικές θεραπείες σε μικρότερο βαθμό από τη δοκιμασία TST και συσχετίζεται καλύτερα με τους παράγοντες κινδύνου για φυματίωση (23, 27). Η δοκιμασία QFT έχει υψηλή ειαισθησία σε ασθενείς με ρευματική νόσο (23, 56, 57) και υψηλότερη ειδικότητα από τη δοκιμασία TST, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιεί τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα και να μειώνει τον κίνδυνο χορήγησης περιττής θεραπείας όπως θα συνέβαινε με την TST (23, 57, 58).	112
Εργαζόμενοι στον τομέα της υγείας	Έχει αποδειχθεί ότι είναι υψηλότερης ειδικότητας και με λιγότερα ψευδώς θετικά αποτελέσματα από την TST, καθώς και ότι είναι οικονομικά πιο συμφέρουσα από την TST (59–62). Η μεταβλητότητα γύρω από την τιμή κατωφλίου είναι αναμενόμενο εύρημα στις διαδοχικές εξετάσεις, λόγω του διχοτομικού σημείου διαχωρισμού και της εγγενούς μεταβλητότητας που εμφανίζει μια βιολογική δοκιμασία (63). Μελέτες έχουν δείξει υψηλότερα ποσοστά μετατροπής/επανάδου σε αρνητικά αποτελέσματα απ' ό,τι με την TST σε διαδοχικές εξετάσεις που έγιναν σε εργαζόμενους χαμηλού κινδύνου στον τομέα της υγείας (64, 65). Το αμερικανικό Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) αναγνωρίζει ότι, λόγω της επείκειας του κριτηρίου της δοκιμασίας IGRA για τον ορισμό της μετατροπής, ενδέχεται να λαμβάνονται περισσότερα αποτελέσματα μετατροπής από εκείνα που παρατηρούνται με τα αυστηρότερα ποσοτικά κριτήρια της δοκιμασίας TST, καθώς και ότι οι στρατηγικές επανεξέτασης έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση του φαινομένου μετατροπής/επανάδου (65–68).	111
Επαφές με TB	Υψηλότερη θετική προγνωστική αξία (PPV) και αρνητική προγνωστική αξία (NPV) σε σχέση με τη δοκιμασία TST (47) ευκολία της μίας μόνο επίσκεψης για όσα άτομα έχουν μικρές πιθανότητες επιστροφής για επανεξέταση (63), καλύτερη συσχέτιση με την έκθεση (69), που σημειώνεται ιδιαίτερα σε άτομα που έχουν εμβολιαστεί με τον BCG και σε πληθυσμούς από χώρες στις οποίες γίνεται εμβολιασμός με τον BCG (70, 71).	89
Μεταμόσχευση	Έχει αποδειχθεί ότι είναι τουλάχιστον εξίσου αποτελεσματική με την TST, αλλά επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από την οργανική νόσο τελικού σταδίου απ' ό,τι η TST (22).	23

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα

Πίνακας 7. Επιλεγμένες δημοσιευμένες μελέτες για τη μέθοδο QFT (συνέχεια)

Πληθυσμός/ κατάσταση	Εκβάσεις και ευρήματα	Συνολικός αριθμός δημοσιευμένων μελετών
Διαβήτης	Αντικρουόμενα στοιχεία από μικρό αριθμό δημοσιεύσεων με περιορισμένο αριθμό συμμετεχόντων. Σε μελέτη από περιοχή χαμηλής επιβάρυνσης διαπιστώθηκε ότι η ευαισθησία της QFT δεν επηρεάζεται αρνητικά από το διαβήτη σε ασθενείς με φυματίωση (72). Σε μελέτη από την Τανζανία, όπου το περιβάλλον είναι υψηλής επιβάρυνσης, η οποία υποδηλώνει ότι υπάρχει αρνητικός αντίκτυπος του διαβήτη στην παραγωγή ιντερφερόνης- γ , δεν ελήφθησαν υπόψη συγχυτικοί παράγοντες όπως οι λοιμώξεις με HIV και έλμινθες (73). Σε μελέτες που διεξήχθησαν στο Βιετνάμ με 838 άτομα με αυτοαναφερόμενη ύπαρξη διαβήτη για τα οποία υπήρχε υποψία φυματίωσης λόγω μη φυσιολογικής ακτινογραφίας θώρακα ή στα οποία επιβεβαιώθηκε μέσω καλλιέργειας ότι είχαν ενεργή νόσο φυματίωσης (n = 128), η θετικότητα με τη δοκιμασία QFT ήταν ίση ή μεγαλύτερη από αυτή που βρέθηκε με τα σημεία διαχωρισμού της δοκιμασίας TST, των 10 και 15 mm (74).	9
Νεφροπάθεια τελικού σταδίου	Τα θετικά στη δοκιμασία QFT αποτελέσματα συσχετίζονται με παράγοντες κινδύνου για φυματίωση καλύτερα από τα αποτελέσματα της δοκιμασίας TST και συνδέονται σε μικρότερο βαθμό με τον BCG (75).	45
Μετανάστες	Μελέτες καταδεικνύουν ότι η δοκιμασία QFT δεν επηρεάζεται από τον BCG και την ηλικία, σε αντίθεση με τη δοκιμασία TST (74). Αποδεικνύεται ότι η QFT είναι η πιο συμφέρουσα οικονομικά μέθοδος (76). Σε περιβάλλοντα χαμηλής επιβάρυνσης, η πλειονότητα των περιστατικών με φυματίωση προέρχεται από άτομα γεννημένα στην αλλοδαπή και από επανενεργοποίηση λανθάνουσας φυματίωσης μετά την άφιξη (77). Η μεγαλύτερη μέχρι σήμερα μελέτη σύγκρισης των δοκιμασιών QFT και TST σε παιδιά μεταναστών υποστηρίζει ότι είναι προτιμητέα η χρήση της δοκιμασίας QFT σε σχέση με την TST για την εξέταση παιδιών γεννημένων στο εξωτερικό ως προς την παρουσία λανθάνουσας λοίμωξης φυματίωσης (46).	29

Τεχνικές πληροφορίες

Απροσδιόριστα αποτελέσματα

Η λήψη απροσδιόριστων αποτελεσμάτων είναι σπάνια και ενδέχεται να οφείλεται στην κατάσταση ανοσίας του εξεταζόμενου ατόμου, αλλά μπορεί και να συνδέεται με μια σειρά τεχνικών παραγόντων σε περίπτωση που δεν ακολουθηθούν οι παραπάνω οδηγίες χρήσης.

Εάν υποπτεύεστε τεχνικά προβλήματα κατά τη φύλαξη των αντιδραστηρίων, τη συλλογή του αίματος ή τον χειρισμό των δειγμάτων αίματος, επαναλάβετε ολόκληρη τη δοκιμασία QFT-Plus με νέο δείγμα αίματος. Μπορείτε να επαναλάβετε την ανάλυση ELISA σε διεγερμένα δείγματα πλάσματος εάν υποψιάζεστε ανεπαρκή πλύση ή άλλη διαδικαστική απόκλιση στη δοκιμασία ELISA. Τα απροσδιόριστα αποτελέσματα που οφείλονται σε χαμηλά επίπεδα Mitogen ή υψηλές τιμές Nil δεν αναμένεται να μεταβληθούν κατά την επανάληψη, εκτός εάν είχε προκύψει κάποιο σφάλμα κατά την ανάλυση ELISA. Τα απροσδιόριστα αποτελέσματα πρέπει να αναφέρονται ως τέτοια. Ο ιατρός μπορεί να επιλέξει να επαναλάβει την αιμοληψία ή να εκτελέσει άλλες κατάλληλες διαδικασίες.

Θρομβωμένα δείγματα πλάσματος

Εάν σχηματιστούν θρόμβοι ινώδους κατά τη μακροχρόνια φύλαξη των δειγμάτων πλάσματος, φυγοκεντρήστε τα δείγματα ώστε να κατακρημνιστεί το θρομβωμένο υλικό και να διευκολυνθεί η διανομή του πλάσματος με πιπέτα.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, βλέπε επίσης τις τεχνικές πληροφορίες που παρέχονται στον ιστότοπο **www.QuantiFERON.com**. Για πληροφορίες επικοινωνίας, βλέπε το οπισθόφυλλο.

Αντιμέτωπιση προβλημάτων με την ανάλυση ELISA

Μη ειδική ανάπτυξη χρώματος

Πιθανή αιτία	Λύση
a) Ατελής έκπλυση της πλάκας	Εκπλύνετε την πλάκα τουλάχιστον 6 φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά βύθισμα. Πιθανόν να χρειαστούν περισσότεροι από 6 κύκλοι έκπλυσης, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη συσκευή πλύσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας 5 δευτερολέπτων τουλάχιστον μεταξύ των κύκλων.
b) Διασταυρούμενη μόλυνση των βυθισμάτων ELISA	Απαιτείται προσοχή κατά τη διανομή με πιπέτα και την ανάμιξη των δειγμάτων ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι κίνδυνοι.
c) Το κιτ ή τα συστατικά του έχουν λήξει	Βεβαιωθείτε ότι το κιτ θα χρησιμοποιηθεί πριν από την ημερομηνία λήξης. Βεβαιωθείτε ότι το ανασυσταθέν πρότυπο και το συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x θα χρησιμοποιηθούν εντός τριών μηνών από την ημερομηνία ανασύστασης.
d) Το διάλυμα υποστρώματος-ενζύμου είναι ακάθαρτο	Απορρίψτε το υπόστρωμα εάν παρουσιάζει μπλε χρωματισμό. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιούνται καθαρά δοχεία αντιδραστηρίων.
e) Ανάμιξη του πλάσματος στα σωληνάρια QFT-Plus πριν από τη συλλογή	Μετά τη φυγοκέντρηση, αποφύγετε την παλινδρόμηση του υγρού κατά τη διανομή με πιπέτα και γενικά την ανάδευση του πλάσματος κατ' οποιοδήποτε τρόπο πριν από τη συλλογή. Να φροντίζετε πάντοτε να μη διαταράσσετε το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.

Χαμηλές μετρήσεις οπτικής πυκνότητας με τα πρότυπα

Πιθανή αιτία	Λύση
a) Σφάλμα αραιώσης προτύπου	Βεβαιωθείτε ότι οι αραιώσεις του προτύπου του κιτ παρασκευάζονται σωστά, σύμφωνα με αυτό το ένθετο συσκευασίας.
b) Σφάλμα διανομής με πιπέτα	Βεβαιωθείτε ότι οι πιπέτες βαθμονομούνται και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
c) Πολύ χαμηλή θερμοκρασία επώασης	Η επώαση της ELISA θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (22 ± 5 °C).
d) Πολύ μικρός χρόνος επώασης	Η επώαση της πλάκας με το συζευγμένο μόριο, τα πρότυπα και τα δείγματα θα πρέπει να διαρκεί 120 ± 5 λεπτά. Το διάλυμα υποστρώματος-ενζύμου επωάζεται στην πλάκα επί 30 λεπτά.

Αντιμετώπιση προβλημάτων με την ανάλυση ELISA

- | | |
|---|---|
| e) Δεν χρησιμοποιήθηκε το σωστό φίλτρο στη συσκευή ανάγνωσης πλακών | Η ανάγνωση της πλάκας θα πρέπει να γίνει στα 450 nm με φίλτρο αναφοράς μεταξύ 620 και 650 nm. |
| f) Υπερβολικά ψυχρά αντιδραστήρια | Όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από το Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x, πρέπει να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου προτού ξεκινήσει ο προσδιορισμός. Για να γίνει αυτό χρειάζεται περίπου μία ώρα. |
| g) Το κιτ ή τα συστατικά του έχουν λήξει | Βεβαιωθείτε ότι το κιτ θα χρησιμοποιηθεί πριν από την ημερομηνία λήξης. Βεβαιωθείτε ότι το ανασυσταθέν πρότυπο και το Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x θα χρησιμοποιηθούν εντός 3 μηνών από την ημερομηνία ανασύστασης. |

Υψηλό υπόβαθρο

- | | |
|---|--|
| Πιθανή αιτία | Λύση |
| a) Ατελής έκπλυση της πλάκας | Εκπλύνετε την πλάκα τουλάχιστον 6 φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά βύθισμα. Πιθανόν να χρειαστούν περισσότεροι από 6 κύκλοι έκπλυσης, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη συσκευή πλύσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας 5 δευτερολέπτων τουλάχιστον μεταξύ των κύκλων. |
| b) Πολύ υψηλή θερμοκρασία επώασης | Η επώαση της ELISA θα πρέπει να εκτελείται σε θερμοκρασία δωματίου (22 ± 5 °C). |
| c) Το κιτ ή τα συστατικά του έχουν λήξει | Βεβαιωθείτε ότι το κιτ θα χρησιμοποιηθεί πριν από την ημερομηνία λήξης. Βεβαιωθείτε ότι το ανασυσταθέν πρότυπο και το Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100x θα χρησιμοποιηθούν εντός 3 μηνών από την ημερομηνία ανασύστασης. |
| d) Το διάλυμα υποστρώματος-ενζύμου είναι ακάθαρμο | Απορρίψτε το υπόστρωμα εάν παρουσιάζει μπλε χρωματισμό. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιούνται καθαρά δοχεία αντιδραστηρίων. |

Μη γραμμική πρότυπη καμπύλη και μεταβλητότητα επαναλήψεων

- | | |
|--|--|
| Πιθανή αιτία | Λύση |
| a) Ατελής έκπλυση της πλάκας | Εκπλύνετε την πλάκα τουλάχιστον 6 φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά βύθισμα. Πιθανόν να χρειαστούν περισσότεροι από 6 κύκλοι έκπλυσης, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη συσκευή πλύσης. Συνιστάται η εκτέλεση διαβροχής διάρκειας 5 δευτερολέπτων τουλάχιστον μεταξύ των κύκλων. |
| b) Σφάλμα αραιώσης προτύπου | Βεβαιωθείτε ότι οι αραιώσεις του προτύπου παρασκευάζονται σωστά, σύμφωνα με αυτό το ένθετο συσκευασίας. |
| c) Κακή ανάμιξη | Αναμείξτε σχολαστικά τα αντιδραστήρια με αναστροφή ή μαλακή περιδίνηση προτού τα προσθέσετε στην πλάκα. |
| d) Ανομοιομορφη τεχνική διανομής με πιπέτα με πιπέτα ή διακοπή κατά την προετοιμασία του προσδιορισμού | Η προσθήκη δειγμάτων και προτύπων θα πρέπει να γίνεται με συνεχή τρόπο. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να παρασκευάζονται πριν από την έναρξη του προσδιορισμού. |

Πληροφορίες προϊόντων και τεχνικοί οδηγοί διατίθενται δωρεάν από την QIAGEN, μέσω του αντιπροσώπου σας ή μέσω της διεύθυνσης www.QuantiFERON.com.

Βιβλιογραφία

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. Drobniowski, 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.
33. Turner, J. et al. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. *Immunology* 87, 339.
34. Brookes, R.H. et al. (2003) CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. *Eur. J. Immunol.* 33, 3293.
35. Stenger, S. et al. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282, 121.

-
36. Lalvani, A. et al. (1998) Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 270.
 37. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. J. Immunol. 166, 439.
 38. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. PLoS Pathol. 3, 1240.
 39. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. J. Immunol. 187, 2222.
 40. Rozot, V. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur. J. Immunol. 43, 1568.
 41. Nikolova, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 75, 277.
 42. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.009. Epub.
 43. Ongaya, A. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis 93, S60.
 44. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 185, 206.

-
45. Long, G., Ji-Chun, M., Min, Jin-Long, L., Jin-Hui, T. (2014) Interferon- γ release assay for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis. Clin. Pediatr. 53, 1255.
 46. Howley, M.M. et al. (2015) Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and tuberculin skin tests among immigrant children being screened for latent tuberculosis infection. Ped. Infect. Dis. 34, 35.
 47. Diel, R., Loddenkemper, R., Niemann, S., Meywald-Walter, K., and Nienhaus, A. (2011) Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon- γ release assay for developing active tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 183, 88.
 48. Machingadaize, S. et al. (2012) Predictive value of recent QuantiFERON conversion for tuberculosis disease in adolescents. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 186, 1051.
 49. Riazi, S. et al. (2012) Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children using interferon-gamma release assays (IGRAs). Allergy Asthma Proc. 33, 217.
 50. Lighter-Fisher, J. and Surette, A-M. (2012) Performance of an interferon-gamma release assay to diagnose latent tuberculosis infection during pregnancy. Obstet. Gynecol. 119, 1088.
 51. Mathud, J.S. et al. (2014) Pregnancy differentially impacts performance of latent tuberculosis diagnostics in a high-burden setting. PLoS ONE 9, e92308.
 52. Hoffman, M. and Ravn, P. (2010) The use of interferon-gamma release assays in HIV-positive individuals. Eur. Infect. Dis. 4, 23.
 53. Cheallagh, C.N. et al. (2013) Interferon gamma release assays for the diagnosis of latent TB infection in HIV-infected individuals in a low TB burden country. PLoS ONE 8, e53330.














-
54. Ramos, J. M. et al. (2012) Contribution of interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: A comparison of QuantiFERON-TB gold in tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test. *BMC Infect. Dis.* 12, 169.
 55. Wolf, T. et al. (2013) Tuberculosis skin test, but not interferon- γ releasing assays is affected by BCG vaccination in HIV patients. *J. Infect.* 66, 376.
 56. Hsia, E.C. et al. (2012) Interferon- γ release assay versus tuberculin skin test prior to treatment with golimumab, a human anti-tumor necrosis factor antibody, in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, or ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 64, 2068.
 57. Garcovich, S. et al. (2012) Clinical applicability of QuantiFERON-TB-Gold testing in psoriasis patients during long-term anti-TNF-alpha treatment: a prospective, observational study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Ven.* 26, 1572.
 58. Kwakernaak, A.J. et al. (2011) A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor α inhibitor. *Clin. Rheumatol.* 30, 505.
 59. Vinton, P. et al. (2009) Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and tuberculin skin test for identification of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthcare staff and association between positive test results and known risk factors for infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30, 215.
 60. de Perio, M.A., Tsevat, J., Roselle, G.A., Kralovic, S.M., and Eckman, M.H. (2009) Cost-effectiveness of interferon gamma release assays vs tuberculin skin tests in health care workers. *Arch. Intern. Med.* 169, 179.

-
61. Nienhaus, A. et al. (2008) Evaluation of the interferon- γ release assay in healthcare workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 81, 295.
 62. Nienhaus, A. et al. (2011) Systematic review of cost and cost-effectiveness of different TB-screening strategies. *BMC Health Serv. Res.* 11, 247.
 63. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Updated guidelines for using interferon-gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection — United States, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* 59 (RR-5), 1.
 64. Dorman, S.E. et al. (2014) Interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 77.
 65. Fong, K.S. et al. (2012) Challenges of interferon-gamma release assay conversions in serial testing of health care workers in a tuberculosis control program. *Chest* 142, 55.
 66. Thanassi, W. et al. (2012) Delineating a retesting zone using receiver operating characteristic analysis on serial QuantiFERON tuberculosis test results in US healthcare workers. *Pulm. Med.* doi: 10.1155/2012/291294. Epub.
 67. Behrman, A. et al. (2013) Protecting Health Care Workers from Tuberculosis, 2013: ACOEM Medical Center Occupational Health Section Task Force on Tuberculosis and Health Care Workers. *J. Occup. Environ. Med.* 55, 985.
 68. Nienhaus, A., Ringshausen, F.C., Costa, J.T, Schablon, A., and Tripodi, D. (2013) IFN- γ release assay versus tuberculin skin test for monitoring TB infection in healthcare workers. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 37.
 69. Arend, S.M. et al. (2007) Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing TB contact. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 618.

-
70. Mandalakas, A.M., Detjen, A.K., Hesselning, A.C., Benedetti, A., and Menzies, D. (2011) Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15, 1018.
 71. Grinsdale, J.A., Ho, C.S., Banouvong, H., Kwamura, L.M. (2011) Programmatic impact of using QuantiFERON-TB Gold in routine contact investigation activities. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15, 1614.
 72. Walsh, M.C. et al. (2011) Sensitivity of interferon- γ release assays is not compromised in tuberculosis patients with diabetes. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15, 179.
 73. Faurholt-Jespén, D. et al. (2014) Diabetes is associated with lower tuberculosis antigen-specific interferon gamma release in Tanzanian tuberculosis patients and non-tuberculosis controls. *Scand. J. Infect. Dis.* 46, 384.
 74. Painter, J.A. et al. (2013) Tuberculosis screening by tuberculosis skin test or QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay among an immigrant population with a high prevalence of tuberculosis and BCG vaccination. *PLoS ONE* 8, e82727.
 75. Rogerson, T.E. et al. (2012) Tests for latent tuberculosis in people with ESRD: a systematic review. *Amer. J. Kidney Dis.* 61, 33.
 76. Pareek, M. et al. (2013) Community-based evaluation of immigrant tuberculosis screening using interferon γ release assays and tuberculin skin testing: observational study and economic analysis. *Thorax.* 68, 230.
 77. CDC, Tuberculosis — United States, 2018.
https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6811a2.htm?s_cid=mm6811a2_w
Accessed 22 March 2019.

Σύμβολα

Τα παρακάτω σύμβολα ενδέχεται να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση:

Σύμβολο	Ορισμός συμβόλου
 2 × 96	Επαρκής ποσότητα για την προετοιμασία 2 × 96 δειγμάτων
	Νόμιμος κατασκευαστής
	Σύμβολο σήμανσης CE-IVD
	Για in vitro διαγνωστική χρήση
	Κωδικός παρτίδας
	Αριθμός καταλόγου
	Διεθνής Κωδικός Μονάδων Εμπορίας
	Ημερομηνία λήξης
	Περιορισμός θερμοκρασίας
	Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
	Μην επαναχρησιμοποιείτε
	Διατηρήστε το προϊόν μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία
	Αριθμός υλικού
Rn	Η ένδειξη R αφορά την αναθεώρηση των οδηγιών χρήσης και n είναι ο αριθμός αναθεώρησης

Στοιχεία επικοινωνίας

Για τεχνική υποστήριξη και περισσότερες πληροφορίες, καλέστε απευθείας το 00800-22-44-6000, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στην ιστοσελίδα **www.qiagen.com/contact** ή απευθυνθείτε σε κάποιο από τα τμήματα Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN (βλέπε το οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε την ιστοσελίδα **www.qiagen.com**).

Συνοπτική διαδικασία δοκιμασίας

Στάδιο 1 — επώαση αίματος

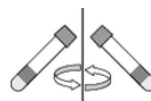
1. Συλλέξτε το αίμα του ασθενούς σε σωληνάρια συλλογής αίματος και αναμείξτε ανακινώντας τα δέκα (10) φορές, αρκετά καλά ώστε να βεβαιωθείτε ότι ολόκληρη η εσωτερική επιφάνεια του σωληναρίου έχει καλυφθεί με αίμα, αλλά όχι εντονότερα από αυτό. Έτσι θα διαλυθούν τα αντιγόνα που βρίσκονται στα τοιχώματα των σωληναρίων.



2. Επώαστε τα σωληνάρια σε κατακόρυφη θέση, στους $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ επί 16 έως 24 ώρες.



3. Μετά την επώαση, φυγοκεντρήστε τα σωληνάρια επί 15 λεπτά σε ταχύτητα $2.000\text{ έως }3.000 \times g$ RCF (g) για να διαχωρίσετε το πλάσμα από τα ερυθροκύτταρα.



4. Μετά τη φυγοκέντρηση, αποφύγετε την παλινδρόμηση του υγρού κατά τη διανομή με πιπέτα και γενικά την ανάδευση του πλάσματος κατ' οποιοδήποτε τρόπο πριν από τη συλλογή. Να φροντίζετε πάντοτε να μη διαταράσσετε το υλικό που βρίσκεται στην επιφάνεια της γέλης.



Στάδιο 2 — Δοκιμασία ELISA για την ιντερφερόνη-γ

1. Αφήστε τα συστατικά της ELISA, εκτός του Συμπυκνώματος συζευγμένου μορίου 100x, να ισορροπήσουν σε θερμοκρασία δωματίου ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) επί 60 λεπτά τουλάχιστον.



2. Ανασυστήστε το πρότυπο του κιτ σε συγκέντρωση 8,0 IU/ml με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Παρασκευάστε τέσσερις (4) τυπικές αραιώσεις.

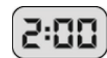


3. Ανασυστήστε το λυοφιλιωμένο Συμπύκνωμα συζευγμένου μορίου 100× με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

4. Παρασκευάστε ένα διάλυμα εργασίας συζευγμένου μορίου σε Πράσινο αραιωτικό και προσθέστε 50 μl σε όλα τα βυθίσματα.



5. Προσθέστε 50 μl των εξεταζόμενων δειγμάτων πλάσματος και 50 μl προτύπων στα κατάλληλα βυθίσματα. Αναμείξτε με συσκευή ανακίνησης.

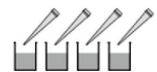


6. Επωάστε επί 120 ± 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

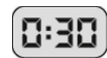
7. Εκπλύνετε τα βυθίσματα τουλάχιστον 6 φορές με 400 μl ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης ανά βύθισμα.



8. Προσθέστε 100 μl Διαλύματος υποστρώματος ενζύμου στα βυθίσματα. Αναμείξτε με συσκευή ανακίνησης.



9. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



10. Προσθέστε 50 μl Διαλύματος διακοπής ενζυμικής αντίδρασης στα βυθίσματα. Αναμείξτε με συσκευή ανακίνησης.



11. Διαβάστε τα αποτελέσματα στα 450 nm, με φίλτρο αναφοράς στα 620 έως 650 nm.



12. Αναλύστε τα αποτελέσματα.



Σημαντικές αλλαγές

Ενότητα	Σελίδα	Αλλαγές
Διάφορες	Διάφορες	Προστέθηκαν οδηγίες σχετικά με τη χρήση του σωληναρίου με λιθιούχο ηπαρίνη ή νατριούχο ηπαρίνη
Διάφορες	Διάφορες	Προστέθηκαν οδηγίες σχετικά με τη ροή εργασίας συλλογή αίματος με φύλαξη στους 2–8 °C
Διάφορες	Διάφορες	Το καπάκι πλάκας είναι πλέον ένα υλικό που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

Ιστορικό αναθεώρησης εγχειριδίου

Έγγραφο	Αλλαγές
R6 04/2019	Αλλαγές όσον αφορά το σωληνάριο με λιθιούχο ηπαρίνη/νατριούχο ηπαρίνη Νέες οδηγίες εργασίας για τη ροή εργασίας συλλογής αίματος με φύλαξη στους 2–8 °C Τα καπάκια πλάκας αφαιρούνται από τις πλάκες QF

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (Όμιλος QIAGEN), Microsoft®, Excel® (Microsoft), ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Άδεια περιορισμένης χρήσης για τη δοκιμασία QuantiFERON-TB Gold Plus (QFTPlus) ELISA

Η χρήση του προϊόντος αυτού συνεπάγεται την αποδοχή εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος των παρακάτω όρων:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται σε αυτό το ένθετο συσκευασίας, και μόνο με τα συστατικά που περιλαμβάνονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του σετ σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και αυτό το ένθετο συσκευασίας.
2. Εκτός από τις άδειες που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το σετ ή/και η χρήση(-εις) του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του παραχωρούνται με άδεια για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η ανακατασκευή ή η μεταπώλησή τους, παρά μόνον εάν ορίζεται διαφορετικά από την QIAGEN.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας χρήσης, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από εκείνες που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να πράξει σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης ή οποιαδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας της σχετικά με το kit ή/και τα εξαρτήματά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

www.QuantiFERON.com

Ασία-Ειρηνικός | techservice-ap@qiagen.com

Ευρώπη | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Μέση Ανατολή/Αφρική | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Λατινική Αμερική (δεν περιλαμβάνεται η Βραζιλία και το Μεξικό) | techservice-latam@qiagen.com

Σημειώσεις

Σημειώσεις

