

Инструкция-вкладыш QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT[®]) ELISA



2 x 96 (№ по каталогу 0594-0201)



20 x 96 (№ по каталогу 0594-0501)

Тест для определения клеточного ответа на пептидные антигены ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4) по уровню IFN-γ в цельной крови человека



Для диагностики in vitro



0594-0201, 0594-0501



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148 Australia (Австралия)

Тел.: (Австралия) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden, Германия

1075115RU ред. 01



www.QuantiFERON.com



Содержание

1. Назначение	4
2. Общие сведения о тесте	4
Принципы анализа	5
Продолжительность теста	5
3. Реагенты и условия хранения	6
Необходимые материалы, не входящие в комплект набора	7
Хранение и обращение	8
4. Предупреждения и меры предосторожности	9
Для диагностики <i>in vitro</i>	9
Предупреждения	9
Меры предосторожности	10
5. Отбор и обработка образцов	11
6. Инструкция по применению	13
Этап 1. Инкубирование крови и отбор плазмы	13
Этап 2. ELISA для выявления человеческого IFN- γ	14
7. Расчеты и интерпретация результатов теста	18
Получение стандартной кривой	18
Контроль качества теста	18
8. Ограничения	21
9. Рабочие характеристики	22
Клинические исследования	22
10. Техническая информация	25
Сомнительные результаты	25
Образование сгустков в плазме крови	25
Руководство по поиску и устранению неполадок	26
11. Перечень литературы	28
12. Техническое обслуживание	30
13. Краткое описание теста	31
Этап 1. Инкубирование образца крови	31
Этап 2. ELISA для выявления IFN- γ	31
Важные изменения	33

1. Назначение

QuantiFERON-TB Gold (QFT®) — диагностическая тест-система для использования *in vitro*, принцип которой состоит в использовании пептидной смеси, имитирующей протеины ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4), для стимулирования клеток в гепаринизированной цельной крови. Обнаружение гамма-интерферонов (IFN- γ) путем твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа (ELISA) проводится с целью определения *in vitro* клеточного ответа на эти пептидные антигены, ассоциирующиеся с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT является непрямой тестом на инфекцию *M. tuberculosis* (включая саму болезнь). Проведение теста должно сопровождаться оценкой риска, радиографическими и другими медицинскими диагностическими обследованиями.

2. Общие сведения о тесте

Туберкулез — передающаяся контактным путем болезнь, вызываемая инфицированием сложными организмами *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). Заражение, как правило, распространяется воздушно-капельным путем от больного, страдающего туберкулезом дыхательных путей. Инфицированный может заболеть туберкулезом в течение периода от нескольких недель до нескольких месяцев, но большинство инфицированных не заболевает. Латентная туберкулезная инфекция (ЛТБИ), заболевание, не передающееся контактным путем и протекающее асимптоматически, присутствует у некоторых индивидумов, у которых туберкулез может развиться позже, в течение месяцев и лет. Основная цель диагностирования ЛТБИ — назначение медицинского лечения для предотвращения заболевания туберкулезом. До недавнего времени туберкулиновая кожная проба была единственным доступным методом диагностирования ЛТБИ. Чувствительность кожного покрова к туберкулину развивается в течение 2–10 недель после заражения. Тем не менее, у некоторых инфицированных реакция на туберкулин не выявляется. К этой группе относятся больные с нарушенной иммунной функцией по причине ряда заболеваний, а также другие инфицированные, не имеющие каких-либо заболеваний. С другой стороны, у некоторых лиц, которые скорее всего не являются инфицированными *M. tuberculosis*, выявляется чувствительность к туберкулину и положительная реакция на туберкулиновую кожную пробу после вакцинации бациллой Calmette-Guérin (BCG), после инфицирования микобактерией, отличной от комплекса *M. tuberculosis*, или же в силу других неопределенных факторов.

Следует отличать ЛТБИ от туберкулеза, болезни, поражающей легкие и нижние дыхательные пути, болезни, подлежащей регистрации. Иногда поражаются и другие системы органов. Туберкулез диагностируется на основании физических, радиологических, гистологических и микобактериологических данных и данных истории болезней.

Тест QFT является тестом, выявляющим клеточный иммунный ответ на пептидные антигены, симулирующие микобактериальные протеины. Эти протеины ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4) отсутствуют во всех штаммах BCG и в большинстве нетуберкулезных микобактерий, за исключением *M. kansasii*, *M. szulgai* и *M. marinum*.(1) В крови лиц, инфицированных сложными организмами *M. tuberculosis*, как правило, содержатся лимфоциты, которые распознают те или иные микобактериальные антигены. Этот процесс распознавания влечет за собой продуцирование и секрецию цитокина, IFN- γ . Данный тест основан на обнаружении и последующем количественном анализе IFN- γ .

Антигены, используемые в QFT, представляют собой пептидную смесь, имитирующую протеины ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4). Многочисленные исследования показали, что эти пептидные антигены стимулируют образование IFN- γ в Т-клетках инфицированных *M. tuberculosis* лиц. Такого, как правило, не происходит у неинфицированных лиц или лиц, прошедших BCG-вакцинацию, не страдающих туберкулезом или не входящих в группу риска по ЛТБИ.(1–32) Тем не менее, медицинское лечение или какие-либо заболевания, ослабляющие защитные механизмы иммунной системы, потенциально могут ослабить иммунный клеточный ответ

IFN- γ . Организм пациентов, имеющих другие микобактериальные инфекции, может также давать ответную реакцию на протеины ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4), так как гены, в которых закодированы эти протеины, присутствуют в *M. kansasii*, в *M. szulgai* и в *M. marinum*.(1, 23) QFT используется как для выявления ЛТБИ, так и для диагностирования инфекций комплекса *M. tuberculosis* у больных пациентов. Положительный результат теста — одно из доказательств наличия туберкулезной болезни, тем не менее, инфекции могут быть вызваны и другими микобактериями (например, *M. kansasii*), что также приведет к положительному результату. Поэтому необходимы другие медицинские обследования, чтобы подтвердить или исключить наличие туберкулезной болезни.

Принципы анализа

Система QFT представляет собой специальные пробирки для забора крови, предназначенные для забора образцов цельной крови. Последующее инкубирование пробирок с образцами крови длится 16–24 ч, после чего плазма изымается и исследуется на наличие в ней IFN- γ , образующегося в качестве иммунного ответа на пептидные антигены.

Тест QFT выполняется в два этапа. На первом этапе производится забор проб цельной крови в несколько пробирок QFT, а именно в нулевую контрольную пробирку, пробирку с антигеном туберкулина и пробирку с митогеном.

При проведении теста набором QFT пробирка с митогеном может использоваться в качестве положительного контроля. Это особенно целесообразно в том случае, когда есть сомнения относительно иммунного статуса пациента. Кроме того, пробирка с митогеном может быть использована для контроля правильного обращения с пробой крови и ее надлежащей инкубации.

Пробирки следует в кратчайшие сроки (в течение 16 часов после отбора крови) инкубировать при температуре 37 °С. После 16–24х-часовой инкубации пробирки центрифугируют, изымают плазму и посредством метода твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа ELISA в ней определяется количество IFN- γ (в МЕ/мл).

Тест на IFN- γ ответ считается положительным, если значение гамма-интерферона в пробирке с антигеном туберкулина значительно превышает значение IFN- γ (в МЕ/мл) в нулевой контрольной пробирке. В случае использования пробирки с митогеном, проба плазмы, стимулированная митогеном, является положительным контролем IFN- γ для каждой из тестируемых проб. Слабый ответ на митоген (< 0,5 МЕ/мл) указывает на сомнительный результат, когда образец крови также имеет отрицательный ответ на антиген туберкулина. Такой вариант может возникнуть при недостатке лимфоцитов, снижении активности лимфоцитов из-за неправильной обработки образца, неправильного заполнения/перемешивания пробирки с митогеном или невозможности лимфоцитов пациента продуцировать IFN- γ . Нулевая проба охватывает коррекцию неспецифических фоновых реакций, эффектов гетерофильных антител, а также неспецифического IFN- γ в пробе крови. Значение IFN- γ нулевой пробирки отнимается от значения IFN- γ пробирки с антигеном туберкулина и пробирки с митогеном (в случае использования таковой).

Продолжительность теста

Ниже приведены данные по примерной продолжительности теста QFT, а также время, необходимое при одновременном тестировании большого количества проб.

Инкубирование пробирок с кровью при температуре 37 °С: от 16 до 24 часов

ELISA:	прибл. 3 часа на каждый планшет ELISA (28–44 тестируемых) < 1 часа рабочего времени Добавить 10–15 мин. на каждый дополнительный планшет
--------	---

3. Реагенты и условия хранения

Blood Collection Tubes (пробирки для забора крови)*	300 шт.	200 шт.	100 шт.
№ по каталогу	T0590-0301	0590-0201	T0593-0201
Количество образцов для приготовления	100	100	100
QuantiFERON Nil Tube (нулевая контрольная пробирка QuantiFERON) (серая крышка, белое кольцо)	100 шт.	100 шт.	
QuantiFERON TB Antigen Tube (пробирка QuantiFERON с антигеном туберкулина) (красная крышка, белое кольцо)	100 шт.	100 шт.	
QuantiFERON Mitogen Tube (пробирка QuantiFERON с митогеном) (сиреневая крышка, белое кольцо)	100 шт.		100 шт.
Инструкция-вкладыш пробирок для забора крови QFT	1	1	1
High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (пробирки для забора крови на больших высотах (БВ)) (для использования на высотах от 1020 до 1875 метров над уровнем моря)*	300 шт.	100 шт.	100 шт.
№ по каталогу	T0590-0505	0590-0501	T0593-0501
QuantiFERON HA Nil Tube (нулевая контрольная пробирка QuantiFERON для БВ) (серая крышка, желтое кольцо)	100 шт.	100 шт.	
QuantiFERON HA TB Antigen Tube (пробирка QuantiFERON с антигеном туберкулина для БВ) (красная крышка, желтое кольцо)	100 шт.	100 шт.	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (пробирка QuantiFERON с митогеном для БВ) (сиреневая крышка, желтое кольцо)	100 шт.		100 шт.
Инструкция-вкладыш пробирок для забора крови QFT	1	1	1

* Все конфигурации изделия доступны не во всех странах. За дополнительной информацией о доступных для заказа конфигурациях обращайтесь в отдел по работе с клиентами компании QIAGEN (подробная информация на сайте www.qiagen.com).

Компоненты для ELISA	Набор из двух планшетов ELISA	Базовый набор для лаборатории
№ по каталогу	0594-0201	0594-0501
Стрипы для микропланшетов (12 x 8 лунок), покрытые моноклональными антителами мыши против IFN-γ человека	2 набора из 12 x 8-луночных планшетов	20 наборов из 12 x 8-луночных планшетов
Human IFN-γ Standard (человеческий IFN-γ, лиофилизат) (содержит рекомбинант человеческого IFN-γ, коровьего казеина и 0,01 % тимерозала)	1 флакон (8 МЕ/мл восстановленного вещества)	10 флаконов (8 МЕ/мл восстановленного вещества)
Green Diluent (растворитель зеленого цвета) (содержит коровий казеин, нормальную мышиную сыворотку и 0,01 % тимерозала)	1 x 30 мл	10 x 30 мл
Conjugate 100X Concentrate (концентрат конъюгата (100-кратная концентрация), лиофилизированный) (конъюгат антител мыши против IFN-γ человека с пероксидазой хрена, содержит 0,01 % тимерозала)	1 x 0,3 мл (восстановленного вещества)	10 x 0,3 мл (восстановленного вещества)
Wash Buffer 20X Concentrate (промывочный буферный концентрат (20-кратная концентрация) (pH 7,2, содержит 0,05 % ProClin® 300)	1 x 100 мл	10 x 100 мл
Enzyme Substrate Solution (раствор ферментного субстрата) (содержит H₂O₂, 3,3', 5,5' тетраметилбензидин)	1 x 30 мл	10 x 30 мл
Enzyme Stopping Solution (стоп-реагент, содержащий ферменты) (содержит 0,5M H₂SO₄)[†]	1 x 15 мл	10 x 15 мл
Инструкция-вкладыш QFT ELISA	1	1

[†] Содержит серную кислоту. Меры предосторожности см. на стр. 10.

Необходимые материалы, не входящие в комплект набора

- Инкубатор 37 °C. CO₂ не требуется.
- Градуированные пипетки переменного объема для дозирования от 10 мкл до 1000 мкл с одноразовыми наконечниками.
- Градуированная многоканальная пипетка, позволяющая дозировать от 50 до 100 мкл, с одноразовыми наконечниками.
- Шейкер для микропланшетов.
- Деионизированная или дистиллированная вода, 2 литра.
- Промыватель микропланшетов (рекомендуется автоматический промыватель).
- Считывающее устройство для микропланшет, оснащенное фильтром 450 нм и эталонным фильтром от 620 нм до 650 нм.

Хранение и обращение

Пробирки для забора крови

- Пробирки для забора крови хранить при температуре от 4 до 25 °С.

Реагенты для ELISA

- Набор хранить при температуре от 2 до 8 °С.
- Не подвергать раствор ферментного субстрата воздействию прямых солнечных лучей.

Восстановленные и неиспользованные реагенты

Инструкции по подготовке реагентов для анализа представлены в разделе 6 (стр. 14)

- Восстановленный стандартный раствор может храниться до трех месяцев при температуре от 2 до 8 °С.
Запишите дату восстановления стандартного раствора.
- Неиспользованный после восстановления концентрат конъюгата (100х) хранить при температуре от 2 до 8 °С и использовать в течение трех месяцев.
Запишите дату восстановления конъюгата.
- Рабочий конъюгат использовать в течение шести часов с момента приготовления.
- Рабочий промывочный раствор хранить при комнатной температуре не более двух недель.

4. Предупреждения и меры предосторожности

Для диагностики in vitro

Предупреждения

- Отрицательный результат QFT не исключает наличия инфекции *M. tuberculosis* или туберкулеза; ложноотрицательные результаты могут быть обусловлены стадией заражения (например, если образец крови был взят до того, как развилась клеточная иммунная реакция), нарушениями иммунной функции, вызванными другими заболеваниями, ненадлежащим обращением с пробирками после забора крови, несоблюдением инструкции по проведению теста или иными иммунологическими переменными факторами.
- Положительный результат QFT не должен являться единственным основанием для вывода о наличии инфекции *M. tuberculosis*. Несоблюдение инструкции по выполнению теста может привести к ложноположительным результатам.
- Положительный результат QFT должен быть подтвержден дальнейшими медицинскими диагностическими исследованиями. Только так можно выявить активный туберкулез (например, исследование мокроты на кислотоустойчивые бактерии и бактериологическое (культуральное) исследование, рентгеновское обследование грудной клетки).
- Протеины ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4) отсутствуют во всех штаммах BCG и в большинстве известных нетуберкулезных микобактериях, однако положительный результат QFT может быть обусловлен и наличием инфекции *M. kansasii*, *M. szulgai* или *M. marinum*. Если есть подозрение на наличие таких инфекций, необходимы альтернативные диагностические исследования.

Меры предосторожности

Только для диагностики in vitro.

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Дополнительную информацию см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ). Для каждого набора QIAGEN и каждого компонента набора их можно найти, просмотреть и распечатать в интернете по адресу www.qiagen.com/safety, где они размещены в удобном и компактном формате PDF.



ВНИМАНИЕ. С человеческой кровью следует обращаться как с потенциально инфицированной.
Соблюдайте соответствующие инструкции по правилам работы с кровью.

Следующие фразы риска и безопасности относятся к компонентам набора QuantiFERON-TB Gold ELISA.

Стоп-раствор QuantiFERON с ферментами



Xi

Содержит серную кислоту: обладает раздражающим действием.

Фразы риска и безопасности*: R36/38, S26-36/37/39.

- **Растворитель зеленого цвета** содержит нормальную мышиную сыворотку и казеин, которые могут вызвать аллергические реакции. Избегать контакта с кожей.

При чрезвычайной ситуации, вызванной химическими веществами

При разлиии, протечке, воздействии или несчастном случае

Звоните CHEMTREC круглосуточно.

На территории США и Канады: 1-800-424-9300.

На территории других стран: +1-703-527-3887 (принимаются телефонные вызовы за счет вызываемого абонента).

Дополнительная информация

Паспорта безопасности: www.qiagen.com/safety

- Несоблюдение инструкций, приведенных на *инструкции-вкладыше QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*, может привести к ложным результатам. Перед использованием внимательно прочитайте инструкции.
- Не используйте набор, если перед использованием на какой-либо бутылки с реагентом обнаружены признаки повреждения или утечки.
- Не смешивать и не использовать стрипы для микропланшетов, стандарт IFN-γ человека, растворитель зеленого цвета или концентрат конъюгата (100X) с другими QFT-наборами. Другие реагенты (промывочный буферный концентрат (20-кратная концентрация), раствор ферментного субстрата и стоп-реагент, содержащий ферменты) взаимозаменяемы при условии соблюдения сроков годности и записи информации о партии. Утилизировать неиспользованные реагенты и биологические образцы в соответствии с местным, региональным и федеральным законодательством.

* R36/38: раздражает глаза и кожу. S26: в случае попадания в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу. S36/37/39: надевайте соответствующую защитную одежду, перчатки и защиту для глаз/лица.

- Не использовать пробирки для забора крови или реагенты из наборы для ELISA после истечения срока годности.
- Убедитесь в том, что лабораторное оборудование, например промыватели микро-планшетов и считывающие устройства, откалиброваны/одобрены к применению.

5. Отбор и обработка образцов

В наборах QFT используются следующие пробирки для забора крови.

1. Нулевые контрольные пробирки QuantiFERON (серая крышка с белым кольцом; используются на высотах до 810 м над уровнем моря).
2. Пробирки с антигеном туберкулина (красная крышка с белым кольцом; используются на высотах до 810 м над уровнем моря).
3. Контрольные пробирки QuantiFERON с митогеном (сиреневая крышка с белым кольцом; используются на высотах до 810 м над уровнем моря).

Пробирки для забора крови на больших высотах (БВ)

4. Нулевая контрольная пробирка QuantiFERON для БВ (серая крышка с желтым кольцом; используются на высоте от 1020 до 1875 м над уровнем моря).
5. Пробирки с антигеном туберкулина для БВ (красная крышка с желтым кольцом; используются на высоте от 1020 до 1875 м над уровнем моря).
6. Контрольные пробирки QuantiFERON с митогеном для БВ (сиреневая крышка с желтым кольцом; используются на высоте от 1020 до 1875 м над уровнем моря).

Антигены были высушены на внутренней стенке пробирки для забора крови, поэтому очень важно тщательно перемешать содержимое пробирки с кровью. Затем пробирки следует как можно скорее (в течение 16 часов после забора крови) переместить в инкубатор с температурой 37 °С.

Для достижения оптимального результата необходимо соблюдать следующие процедуры.

1. **Для каждого пациента отберите 1 мл венозной крови непосредственно в каждую из пробирок для забора крови QFT. Данная процедура должна проводиться квалифицированным флеботомистом.**
 - Стандартные пробирки QFT для забора крови используются на высотах до 810 м над уровнем моря. Специальные пробирки для больших высот QFT (БВ) используются на высоте от 1020 до 1875 м над уровнем моря.
 - При использовании пробирок QFT для забора крови в других диапазонах высоты или при недостаточном объеме забираемой крови кровь может быть взята с помощью шприца, а затем перенесена в объеме 1 мл в каждую из трех пробирок. Из соображений безопасности это лучше всего делать, сняв со шприца иглу, и с выполнением соответствующих процедур обеспечения безопасности, сняв колпачки с трех пробирок QFT и добавив по 1 мл крови в каждую из них (до уровня черной метки на наклейке на пробирке). Плотно закройте пробирки колпачками и перемешайте, как описано ниже.
 - Так как пробирки, рассчитанные на забор 1 мл крови, наполняются кровью относительно медленно, рекомендуется снимать пробирку с иглы лишь через 2–3 секунды после видимого достижения кровью метки.

Черная метка на стенке пробирки обозначает объем 1 мл. Пробирки для забора крови для теста QFT были проверены для объемов от 0,8 до 1,2 мл. Если уровень крови в любой пробирке не находится рядом с индикаторной линией, рекомендуется получить другой образец крови.

- Если при заборе крови используется катетер типа «бабочка», необходимо использовать «пробную» пробирку, чтобы убедиться в наполнении трубки кровью, прежде чем использовать пробирку для забора крови для теста QFT.
 - Также кровь можно отобрать в одну отдельную пробирку для забора крови, содержащей литий-гепарин в качестве антикоагулянта, а затем перенести кровь в пробирки QFT. В качестве антикоагулянта крови **используйте только литий-гепарин**, так как другие антикоагулянты оказывают влияние на результаты анализа. Заполните пробирки для забора крови (минимальный объем — 5 мл) и осторожно перемешайте содержимое, перевернув пробирку несколько раз, чтобы растворить гепарин. Пробирки **должны быть** помещены в инкубатор как можно скорее (не позднее 16 часов с момента забора крови). Перед инкубацией пробирки должны находиться при комнатной температуре ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$).
- 2. Непосредственно после заполнения пробирки необходимо встряхнуть ее десять (10) раз так, чтобы можно было убедиться в том, что вся их внутренняя поверхность покрыта кровью для растворения антигенов на стенках.**
- Температура пробирок во время забора крови должна составлять $17\text{--}25\text{ °C}$.
 - Слишком сильное встряхивание может привести к неверным результатам из-за разрушения геля.
 - Если кровь была отобрана в пробирку с гепарином, перед разливом в пробирки QFT образцы необходимо равномерно перемешать. Аккуратно переворачивая пробирку **непосредственно перед разливом** убедитесь в том, что кровь тщательно перемешана. Внесите аликвоты 1,0 мл (по одной в каждую пробирку QFT) в соответствующие нулевую контрольную пробирку, пробирку с антигеном туберкулина и контрольную пробирку с митогеном. Из соображений безопасности это лучше всего делать асептически, **с выполнением соответствующих процедур обеспечения безопасности**, сняв колпачки с трех пробирок QFT и добавив по 1 мл крови в каждую из них (до уровня черной метки на наклейке на пробирке). Плотно закройте пробирки колпачками и перемешайте, как описано выше.
- 3. Маркируйте пробирки соответствующим образом.**
- После того как колпачок пробирки снят, убедитесь в том, что каждую пробирку (нулевую, с антигеном туберкулина, с митогеном) можно определить по этикетке или другим признакам.
- 4. После заполнения, перемешивания и маркировки пробирки необходимо как можно скорее (в течение 16 часов после отбора крови) переместить в инкубатор с температурой $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Перед инкубацией пробирки должны находиться при комнатной температуре ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). Не помещайте в холодильник и не замораживайте образцы крови.**

6. Инструкция по применению

Этап 1. Инкубирование крови и отбор плазмы

Материалы, входящие в комплект поставки

- Пробирки для забора крови QFT (см. раздел 3).

Необходимые материалы, не входящие в комплект набора

- См. раздел 3.

Порядок работы

1. Если инкубирование производится не сразу после забора крови, непосредственно перед инкубацией пробирки нужно заново встряхнуть 10 раз.
2. Инкубируйте пробирки **В ВЕРТИКАЛЬНОМ ПОЛОЖЕНИИ** при температуре $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ в течение 16–24 часов. Инкубатор не требует использования CO_2 или увлажнения.
3. После инкубации при температуре 37 °C перед центрифугированием пробирки для забора крови можно хранить при температуре от 4 до 27 °C в течение трех дней.
4. После инкубации пробирок при температуре 37 °C их в течение 15 минут центрифугируют при 2000–3000 ОСЦ (g). Гелевая пробка отделит клетки от плазмы. Если этого не происходит, необходимо центрифугировать пробирки повторно при более высокой скорости.
 - Можно собирать плазму без центрифугирования, но требуется особая осторожность, чтобы удалить плазму, не взбалтывая клетки.
5. Образцы плазмы необходимо собирать только с помощью пипетки.
 - После центрифугирования перед отбором плазмы всеми способами избегайте ее пипетирования или перемешивания. Необходимо проявлять осторожность, чтобы не взболтать материал на поверхности геля.
 - После центрифугирования образцы плазмы из пробирок для забора крови можно загружать непосредственно на планшет QFT для ELISA, в том числе при использовании автоматизированных рабочих станций ELISA.
 - Образцы плазмы можно хранить до 28 дней при температуре от 2 до 8 °C или, если плазма уже отобрана, в течение более продолжительного времени при температуре ниже -20 °C .
 - Для получения необходимого количества образца для теста необходимо отобрать хотя бы 150 мкл плазмы.

Этап 2. ELISA для выявления человеческого IFN-γ

Материалы, входящие в комплект поставки

- Набор реагентов для QFT ELISA (см. раздел 3).

Необходимые материалы, не входящие в комплект набора

- См. раздел 3.

Порядок работы

1. Перед проведением анализа все образцы плазмы и реагенты, кроме 100-кратного концентрата конъюгата, должны быть доведены до комнатной температуры ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). На выравнивание температур выделите по меньшей мере 60 минут.
2. Снимите ненужные стрипы с рамки, запечатайте обратно в пакет из фольги и верните в холодильник для хранения, пока не потребуются.

Приготовьте хотя бы один стрип для стандартных растворов QFT и достаточное количество стрипов для исследуемых проб пациентов (см. рис. 2А и 2В при использовании двух или трех пробирок соответственно). После использования сохраните рамку и крышку для оставшихся неиспользованных стрипов.

3. Восстановите лиофилизированный стандартный образец, входящий в набор реагентов, указанным на этикетке флакона объемом деионизированной или дистиллированной воды. Аккуратно перемешайте содержимое, избегая образования пены, и убедитесь в том, что лиофилизат полностью растворился. При разведении лиофилизата указанным объемом получается раствор, концентрация которого составляет 8,0 МЕ/мл.

Примечание. Объем разводимого стандарта зависит от партии набора.

Используйте разведенный стандарт набора для приготовления серии из четырех рабочих стандартных разведений IFN-γ на растворителе зеленого цвета (GD) (см. рис. 1). S1 (стандарт 1) содержит 4 МЕ/мл, S2 (стандарт 2) содержит 1 МЕ/мл, S3 (стандарт 3) содержит 0,25 МЕ/мл и S4 (стандарт 4) содержит 0 МЕ/мл (чистый GD). Необходимо использовать в тесте хотя бы две серии стандартных разведений.

Последовательность, рекомендуемая при двойной серии стандартов	Последовательность, рекомендуемая при тройной серии стандартов
А. Пометьте четыре пробирки S1, S2, S3, S4.	А. Пометьте четыре пробирки S1, S2, S3, S4.
Б. Внесите 150 мкл растворителя зеленого цвета (GD) в S1, S2, S3, S4.	Б. Внесите 150 мкл растворителя зеленого цвета (GD) в S1.
В. Добавьте 150 мкл разведенного стандарта в S1 и тщательно перемешайте.	В. Внесите 210 мкл GD в S2, S3, S4.
Г. Перенесите 50 мкл из S1 в S2 и тщательно перемешайте.	Г. Добавьте 150 мкл разведенного стандарта в S1 и тщательно перемешайте.
Д. Перенесите 50 мкл из S2 в S3 и тщательно перемешайте.	Д. Перенесите 70 мкл из S1 в S2 и тщательно перемешайте.
Е. Чистый растворитель зеленого цвета (GD) служит нулевым стандартом (S4).	Е. Перенесите 70 мкл из S2 в S3 и тщательно перемешайте.
	Ж. Чистый растворитель зеленого цвета (GD) служит нулевым стандартом (S4).

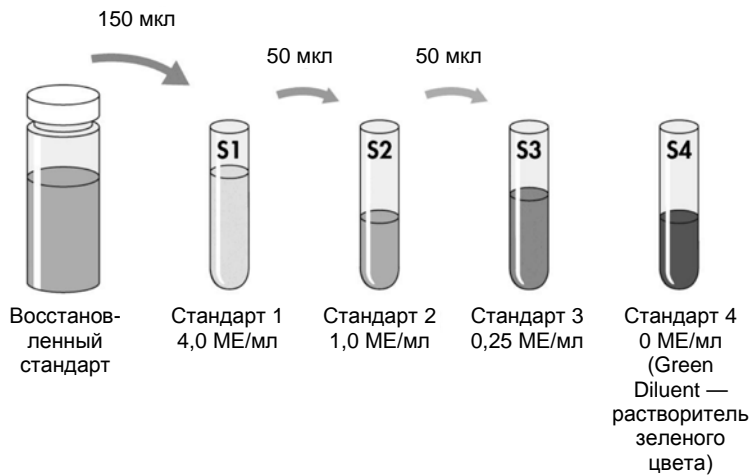


Рисунок 1. Приготовление серии рабочих стандартных разведений. Готовьте свежие рабочие стандартные разведения для каждого цикла ELISA.

4. Восстановите лиофилизированный 100-кратный концентрат конъюгата в 0,3 мл деионизированной или дистиллированной воды. Аккуратно перемешайте содержимое флакона, избегая образования пены, и убедитесь в том, что лиофилизат полностью растворился.

Рабочий раствор конъюгата получается путем разбавления необходимого количества восстановленного 100-кратного концентрата конъюгата в растворителе зеленого цвета, как изложено в таблице 1 «Приготовление конъюгата».

Таблица 1. Приготовление конъюгата

Количество стрипов	Объем 100-кратного концентрата конъюгата	Объем растворителя зеленого цвета
2	10 мкл	1,0 мл
3	15 мкл	1,5 мл
4	20 мкл	2,0 мл
5	25 мкл	2,5 мл
6	30 мкл	3,0 мл
7	35 мкл	3,5 мл
8	40 мкл	4,0 мл
9	45 мкл	4,5 мл
10	50 мкл	5,0 мл
11	55 мкл	5,5 мл
12	60 мкл	6,0 мл

- Перемешайте тщательно, но осторожно, чтобы избежать вспенивания.
- Весь неиспользованный Conjugate 100X Concentrate (100-кратный концентрат конъюгата) сразу же после использования верните на хранение при температуре от 2 до 8 °C.
- Используйте только Green Diluent (растворитель зеленого цвета).

5. Образцы плазмы, отобранные из пробирок для забора крови, а затем замороженные или хранившиеся более 24 часов до момента проведения анализа, должны быть тщательно смешаны перед их внесением в лунки планшета для ELISA.
 - Если образцы плазмы добавляются непосредственно из отцентрифugованных QFT пробирок, необходимо избегать любого перемешивания плазмы.
6. С помощью многоканальной пипетки внесите 50 мкл свежеприготовленного рабочего раствора конъюгата в соответствующие лунки планшета для ELISA.
7. С помощью многоканальной пипетки внесите 50 мкл каждого образца плазмы в соответствующие лунки планшета (см. рекомендуемую схему расположения на приведенных на стр. 16 рисунках 2А и 2В). В последнюю очередь внесите в соответствующие лунки 50 мкл каждого стандартного раствора 1–4.

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

Рисунок 2А. Рекомендуемая схема расположения нулевых контрольных пробирок, пробирок с антигеном туберкулина и пробирок с митогеном (28 тестов на планшете).

- S1 (стандарт 1), S2 (стандарт 2), S3 (стандарт 3), S4 (стандарт 4).
- 1N (образец 1, нулевая контрольная плазма), 1A (образец 1, плазма с антигеном туберкулина), 1M (образец 1, плазма с митогеном).

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

Рисунок 2В. Рекомендуемая схема расположения нулевых контрольных пробирок и пробирок с антигеном туберкулина (44 теста на планшете).

- S1 (стандарт 1), S2 (стандарт 2), S3 (стандарт 3), S4 (стандарт 4).
- 1N (образец 1, нулевая контрольная плазма), 1A (образец 1, плазма с антигеном туберкулина)

8. На шейкере для микропланшетов тщательно перемешайте конъюгат и образцы плазмы/стандарты в течение одной минуты.
9. Каждый планшет накройте крышкой и инкубируйте при комнатной температуре ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 120 минут \pm 5 минут.
 - Во время инкубации планшеты не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.
10. Во время инкубации разведите одну часть 20-кратного буферного промывочного концентрата 19 частями деионизированной или дистиллированной воды и тщательно перемешайте. Количество 20-кратного буферного промывочного концентрата, входящего в объем поставки, достаточно для приготовления двух литров готового к использованию буферного промывочного раствора.

Не менее шести раз промойте каждую лунку 400 мкл подготовленного к работе промывочного буферного раствора. Рекомендуется использовать автоматическую мойку для планшетов.

 - Для проведения анализа очень важна тщательная промывка. Проследите, чтобы во время каждого цикла промывки каждая лунка была **до краев заполнена** промывочным буфером. Между промывочными циклами рекомендуется выдерживать не менее пяти секунд для замачивания.
 - Для обеззараживания потенциально инфекционных материалов в резервуар для отходов необходимо добавлять стандартное лабораторное дезинфицирующее средство и выполнять общепринятые процедуры.
11. Для удаления остатков промывочного буфера положите планшеты вверх дном на фильтровальную бумагу. Затем внесите 100 мкл раствора ферментного субстрата в каждую лунку и перемешайте на шейкере для микропланшетов.
12. Каждый планшет закройте крышкой и инкубируйте 30 минут при комнатной температуре ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).
 - Во время инкубации планшеты не должны подвергаться воздействию прямых солнечных лучей.
13. После 30-минутной инкубации в каждую лунку добавьте по 50 мкл стоп-раствора и перемешайте.
 - Стоп-реагент нужно вносить в лунки в той же последовательности и примерно в том же темпе, что и раствор ферментного субстрата (см. шаг 11).
14. Измерьте оптическую плотность (ОП) каждой лунки планшета в течение пяти минут после добавления стоп-реагента, для измерения используйте считывающее устройство для микропланшет с фильтром 450 нм и референсным фильтром 620–650 нм. Значения оптической плотности необходимы для расчета результатов.

7. Расчеты и интерпретация результатов теста

Для анализа полученных данных и расчета результатов теста применяется программное обеспечение для тест-системы QFT. Получить его можно по адресу www.QuantiFERON.com. Убедитесь, что Вы используете самую последнюю версию программного обеспечения.

Программное обеспечение выполняет оценку контроля качества теста, выстраивает стандартную кривую и обеспечивает результат каждого пациента, как указано в разделе «Интерпретация результатов».

В качестве альтернативы использованию программного обеспечения для анализа QFT результаты могут быть определены в соответствии со следующим методом.

Получение стандартной кривой

(в случае если программное обеспечение тест-системы QFT не используется)

Определите среднее значение оптической плотности дубликатов рабочих стандартов на каждом планшете.

Постройте стандартную кривую $\log_{(e)} - \log_{(e)}$, по оси y нанося $\log_{(e)}$ средних ОП, а по оси x — $\log_{(e)}$ концентрации IFN- γ в стандартах в МЕ/мл, исключив из этих расчетов нулевой стандарт. Методом регрессионного анализа рассчитайте максимально соответствующую стандартной кривой линию.

С помощью стандартной кривой для каждого исследуемого образца плазмы теста определите концентрацию IFN- γ (в МЕ/мл), используя значение ОП для каждого образца.

Эти расчеты можно выполнить с использованием программных пакетов, доступных со считывающими устройствами для микропланшетов, и с помощью стандартных электронных таблиц или статистического программного обеспечения (например, Microsoft® Excel®). Такие пакеты рекомендуется использовать для выполнения регрессионного анализа, расчета коэффициента вариации (%CV) для стандартов и коэффициента корреляции (r) стандартной кривой.

Контроль качества теста

Точность результатов теста зависит от получения точной стандартной кривой. Таким образом, прежде чем можно будет интерпретировать результаты анализа образцов, необходимо проверить результаты, полученные на стандартах.

Полученные методом ELISA результаты считаются действительными, если:

- среднее значение оптической плотности (ОП) для стандарта 1 составляет $\geq 0,600$;
- коэффициент вариации (CV%) репликатных значений ОП для стандартов 1 и 2 $\leq 15\%$;
- репликатные значения ОП для стандарта 3 и стандарта 4 варьируют не более, чем на 0,040 единицы ОП от среднего значения;
- коэффициент корреляции (r), рассчитанный из среднего значения спектральной поглощательной способности стандартов, составляет $\geq 0,98$.

Программное обеспечение тест-системы QFT, проводящее анализ, просчитывает и выдает информацию о параметрах контроля качества.

Если вышеуказанные критерии не соблюдены, то процесс считается недействительным и должен быть повторен.

Среднее значение ОП для нулевой контрольной пробирки (растворитель зеленого цвета) должно составлять $\leq 0,150$. Если этот показатель $> 0,150$, то необходимо проверить проведение процедуры промывки.

Интерпретация результатов

Результаты тестирования, полученные с помощью тест-системы QFT, могут быть интерпретированы на основании следующих критериев.

Примечание. Для подтверждения или исключения туберкулезной болезни, как и для оценки вероятности ЛТБИ, необходима комбинация эпидемиологических, медицинских, диагностических данных и данных истории болезней, которые должны учитываться при интерпретации результатов, полученных с помощью тест-системы QFT (см. таблицы 2 и 3).

Таблица 2. При использовании нулевой контрольной пробирки, пробирки с антигеном туберкулина и пробирки с митогеном

Нулевой контроль (МЕ/мл)	Антиген туберкулина минус нулевой контроль (МЕ/мл)	Митоген минус нулевой контроль (МЕ/мл)*	Результат QFT	Результат/интерпретация
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Отрицательный	Вероятность инфекции <i>M. tuberculosis</i> ОТСУТСТВУЕТ
	≥ 0,35 и < 25 % нулевого контрольного значения	≥ 0,5	Отрицательный	Вероятность инфекции <i>M. tuberculosis</i> ОТСУТСТВУЕТ
	≥ 0,35 и ≥ 25 % нулевого контрольного значения	Любой показатель	Положительный [†]	Инфекция <i>M. tuberculosis</i> вероятна
	< 0,35	< 0,5	Сомнительный [‡]	Результаты сомнительные в силу чувствительности к антигену туберкулина
	≥ 0,35 и < 25 % нулевого контрольного значения	< 0,5	Сомнительный [‡]	Результаты сомнительные в силу чувствительности к антигену туберкулина
> 8,0 [§]	Любой показатель	Любой показатель	Сомнительный [‡]	Результаты сомнительные в силу чувствительности к антигену туберкулина

* Значение ответа на положительный контроль митоген, а иногда и антиген туберкулина часто может лежать вне рабочего диапазона считывающего устройства для микропланшет. Это не оказывает влияния на результаты теста.

[†] В данном случае подозрения на инфекцию *M. tuberculosis* нет, изначально положительный результат может быть подтвержден повторным тестированием оригинальных проб плазмы в дубликate с помощью QFT ELISA. Если повторный тест одного или обоих репликатов окажется положительным, тестируемого следует считать инфицированным.

[‡] Возможные причины см. в разделе «Поиск и устранение неисправностей».

[§] В клинических исследованиях менее чем 0,25 % испытуемых имели уровень IFN-γ > 8,0 МЕ/мл при нулевом контроле.

Величина замеренного уровня IFN- γ не может быть скоррелирована со стадией и степенью инфицирования, уровнем иммунной реактивности или вероятностью прогрессирования болезни к активной стадии.

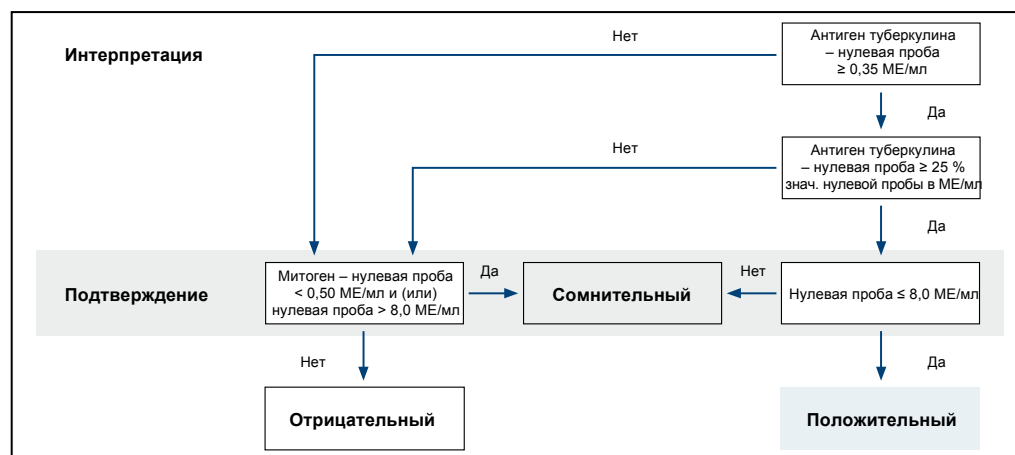


Рисунок 3. Интерпретация схемы последовательности процесса в случае использования пробирок нулевого контроля, антигена туберкулина и митогена.

Таблица 3. При использовании только пробирок нулевого контроля и антигена туберкулина

Нулевой контроль (МЕ/мл)	Антиген туберкулина – нулевая контрольная проба (МЕ/мл)	Результат QFT	Результат/интерпретация
≤ 8,0	< 0,35	Отрицательный	Вероятность инфекции <i>M. tuberculosis</i> ОТСУТСТВУЕТ
	≥ 0,35 и < 25 % нулевого контрольного значения	Отрицательный	Вероятность инфекции <i>M. tuberculosis</i> ОТСУТСТВУЕТ
	≥ 0,35 и ≥ 25 % нулевого контрольного значения	Положительный*	Инфекция <i>M. tuberculosis</i> вероятна
> 8,0 [†]	Любой показатель	Сомнительный [‡]	Результаты сомнительные в силу чувствительности к антигену туберкулина

* В данном случае подозрения на инфекцию *M. tuberculosis* нет, изначально положительный результат может быть подтвержден повторным тестированием оригинальных проб плазмы в дубликate с помощью QFT ELISA. Если повторный тест одного или обоих репликатов окажется положительным, тестируемого следует считать инфицированным.

[†] В клинических исследованиях менее чем 0,25 % испытуемых имели уровень IFN- γ > 8,0 МЕ/мл при нулевом контроле.

[‡] Возможные причины см. в разделе «Поиск и устранение неисправностей».

Величина замеренного уровня IFN-γ не может быть скоррелирована со стадией и степенью инфицирования, уровнем иммунной реактивности или вероятностью прогрессирования болезни к активной стадии.

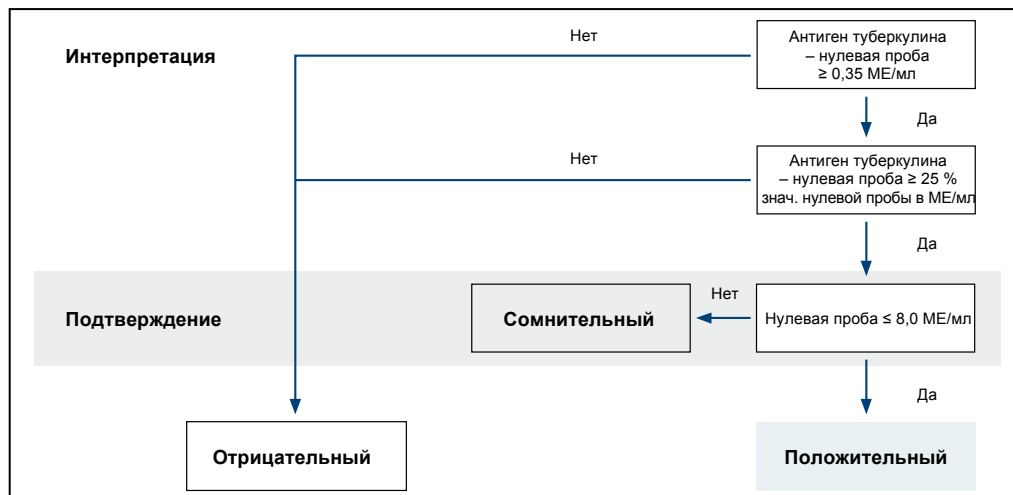


Рисунок 4. Интерпретация схемы последовательности процесса в случае использования пробирок нулевого контроля и антигена туберкулина.

8. Ограничения

Результаты, полученные с помощью системы QFT, должны учитываться вместе с индивидуальной эпидемиологической историей, текущим медицинским статусом и другими диагностическими результатами.

Лица с нулевым контрольным значением выше 8 МЕ/мл классифицируются как «сомнительные», так как результат реакции на антиген туберкулина, превышающий 25 % значения нулевого контроля, может находиться вне зоны измерения, проводимого тест-системой.

Недостоверность или сомнительность результатов может возникнуть по следующим причинам:

- отклонения от инструкции проведения процедуры тестирования, описанной в инструкции-вкладыше *QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*;
- чрезмерно высокий уровень IFN-γ или присутствие гетерофильных антител;
- с момента забора образца крови до его инкубации при температуре 37 °С прошло более 16 часов.

9. Рабочие характеристики

Клинические исследования

В силу отсутствия определенного стандарта для латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) чувствительность и специфичность тест-системы QFT не может быть определена практически. Специфичность системы QFT была примерно выражена посредством оценки ложноположительных показателей у лиц с низким уровнем риска (с отсутствием известных факторов риска) инфицирования туберкулезом. Чувствительность получила свое примерное выражение через оценку групп пациентов с подтвержденным диагнозом туберкулезной болезни в активной стадии культуральным методом.

Специфичность

В исследовании, проведенном в США, в котором принимали участие 866 добровольцев, забор образцов крови для QFT производился во время проведения туберкулиновой кожной пробы. Демографические данные и информация по факторам риска туберкулеза были определены на основании стандартного обследования, проведенного в период тестирования. Из 432 добровольцев, не имеющих каких-либо известных факторов риска, соотносимых с инфекцией *M. tuberculosis*, результаты тестирования с помощью QFT и туберкулиновой кожной пробы были доступны для 391 человека. Ни у кого из них не было проведено вакцинации бациллой Calmette-Guerin (BCG). Второе исследование на специфичность было проведено с использованием тест-системы QFT в Японии. Исследование проводилось с лицами с низким риском заболевания, примерно 90 % получили прививку от Calmette-Guerin (BCG). Результаты первого и второго исследования на специфичность приведены в таблице 4.

Таблица 4. Специфичность QFT: результаты тестирования индивидуумов с отсутствием риска инфицирования *M. tuberculosis*

Исследование	BCG статус (% привитых)	Общее число тестируемых	Кол-во QFT неопределен.	Кол-во QFT положит./ количество действит. тестов	Специфичность QFT (95 % доверит. интервал)	Кол-во положит. на туберкулин/ кол-во протестированных	Туберкулин-тест* специфичность (95 % доверит. интервал)
США (не опубликовано)	0 %	391	1	3/390	99,2 % (98–100)	6/391	98,5 % (97–99)
Япония (15)	~90 %	168	6	2/162	98,8 % (95–100)	–	–
Всего	–	559	7/559 (1,3 %)	5/552	99,1 % (98–100)	–	–

* При пороговом значении туберкулиновой кожной пробы 10 мм у непривитых BCG людей. Специфичность туберкулиновой кожной пробы 99,1 %, если пороговое значение составляет 15 мм.

Чувствительность при активном туберкулезе

Пациенты из США, Австралии и Японии с подозрением на туберкулез, у которых позднее подтвердилось наличие инфекции *M. tuberculosis*, были протестированы для определения чувствительности тест-системы QFT. В силу отсутствия определенного стандартного теста для выявления латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ), подходящим суррогатом стала микробиологическая культура *M. tuberculosis*, так как принимающие участие в тесте по определению являются инфицированными. До забора образцов крови на тестирование системой QFT пациенты проходили курс терапии продолжительностью менее 8 дней.

В таблице 5 приводятся данные исследований, проведенных на трех группах пациентов, позитивных на *M. tuberculosis*, проверенных культуральной диагностикой. Общая чувствительность тест-системы QFT для активного туберкулеза составляет 89 % (157/177).

Таблица 5. QFT: пациенты, у которых наличие инфекции *M. tuberculosis* подтвердилось культуральным методом.

Исследование	Кол-во QFT положит./ количество действит. тестов	Чувствительность QFT (95 % доверит. интервал)
Туберкулезные больные в Японии (15)	86/92	93 % (86–97 %)
Туберкулезные больные в Австралии	24/27	89 % (70–97 %)
Туберкулезные больные в США	47/58	81 % (68–90 %)
Всего	157/177	89 % (83–93 %)

Диагноз ЛТБИ (латентной туберкулезной инфекции)

Некоторые опубликованные исследования демонстрируют работу тест-системы QFT в определенных группах с имеющимся риском ЛТБИ. Основные данные некоторых исследований собраны в таблице 6.

Таблица 6. Выборка из опубликованных исследований по использованию QFT в определенных группах риска по ЛТБИ.

Исследование	Общее число тестируемых	Данные и результаты
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Установление очень высокого показателя туберкулеза. 40 % позитивных, выявленных с помощью QFT, из 41 % позитивных на туберкулиновый тест (10 мм). Высокая согласованность с туберкулиновой кожной пробой, влияние BCG отсутствует. Возраст и продолжительность работы в сфере здравоохранения учитывались в обоих тестах как факторы риска.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	Общая распространенность ЛТБИ в среде ВИЧ-положительных, выявленная тест-системой QFT, составила 4,6 % (27/590). Позитивные результаты были обусловлены риском туберкулеза. Двое из позитивных тестируемых, выявленных QFT, перешли в группу больных с открытой формой туберкулеза в течение одного года. Количество сомнительных реакций (n = 20, 3,4 %) было в большей степени связано с показателем CD4 < 100/мкл.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Дети с подозрением на туберкулез или имеющие историю контакта с больными были протестированы QFT и туберкулиновой кожной пробой. 10,5 % позитивных, выявленных с QFT, из 9,5 % позитивных на туберкулиновой кожной пробе (10 мм). Согласованность между тестами в общей сложности составляла 95,2 % и 100 % среди не прошедших вакцинацию BCG.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	В 15 случаях первичного заболевания были протестированы лица, находящиеся в тесном контакте с заболевшими. 51 % имели вакцину BCG, 27 % были рождены за границей или от иностранного гражданина. 70 % из привитых BCG и 18 % непривитых оказались позитивными на туберкулиновую кожную пробу (5 мм), в то время как 9 % и 11 % были определены системой QFT как позитивные, соответственно. Система QFT рассматривалась параллельно с риском туберкулезной болезни. Туберкулиновая кожная проба — только с вакцинацией BCG.

Многие публикации описывают принцип работы менее чувствительных версий системы QuantiFERON-TB Gold, использующей жидкие антигены (предшественницы QFT) и теста QFT. Эти исследования включают использование результатов тестирования лиц, контактных с больными активным туберкулезом (9, 11, 19, 25), с детьми (6–10, 25, 28), с позитивными на ВИЧ (2, 5, 20), с медицинскими работниками (13, 26, 32), с лицами с иммуносупрессией (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), а также с людьми, имеющими подозрение на туберкулез (7, 8, 10, 18) и с людьми с низким риском заболеваемости (15).

Воспроизводимость и влияние туберкулиновой кожной пробы на последующий тест системой QFT

При проведении в США исследования на специфичность часть из добровольцев, принявших участие в этом исследовании была заново протестирована спустя 4–5 недель после проведения оригинального теста системой QFT и туберкулиновой кожной пробы. Результаты 260 тестов, проведенных с применением системы QFT, были сравнены с такими же тестами, но проведенными раньше, уровень согласованности оказался 99,6 % (259/260). Туберкулиновая кожная проба, предшествовавшая тесту с применением системы QFT, не повлекла возникновения положительных результатов.

10. Техническая информация

Сомнительные результаты

Получение сомнительных результатов должно быть явлением редким, но возможным по причине индивидуального иммунного статуса, а также в силу ряда технических факторов:

- интервал времени между забором крови у пациента и инкубацией при температуре 37 °C превышает 16 часов;
- кровь хранилась в диапазоне температур, не соответствующем рекомендуемому (от 17 до 27 °C);
- недостаточное смешивание содержимого пробирок набора тест-системы;
- нарушение техники промывания планшета при проведении ELISA.

Если причиной сомнительных результатов могли стать либо неправильный забор образцов крови, либо ненадлежащее с ними обращение, повторите весь тест QFT с новыми образцами крови. В случае некачественной промывки или других отклонений при проведении ELISA, анализ необходимо повторить снова. Сомнительные результаты теста, причиной которых являются низкий показатель митогена или высокий показатель нулевого стандарта, не должны быть другими на дубликате, если только не имела место какая-либо ошибка в проведении ELISA. Сомнительные результаты должны регистрироваться как таковые. Врач может принять решение либо в пользу забора нового образца крови, либо в пользу проведения других надлежащих мероприятий.

Образование сгустков в плазме крови

В случае образования фибриновых сгустков в плазме крови образцов, подлежащих продолжительному хранению, необходимо отцентрифуговать плазму, при этом сгустки превратятся в осадок, что обеспечит свободное пипетирование плазмы.

Руководство по поиску и устранению неполадок

Данное руководство по устранению неполадок может быть полезным в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Дополнительную информацию см. также в технической информации по адресу www.QuantiFERON.com. Контактную информацию см. на задней обложке.

Поиск и устранение неполадок при выполнении метода ELISA

Неспецифическое окрашивание

Возможная причина	Решение
а) Неполное промывание планшета	Промойте планшет как минимум шесть раз промывочным буфером из расчета 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться большее количество промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно составлять не менее пяти секунд.
б) Перекрестное загрязнение лунок при проведении ELISA	Соблюдайте осторожность при пипетировании и перемешивании компонентов, чтобы свести риск загрязнения к минимуму.
в) Истечение срока годности компонентов	Используйте набор до истечения срока годности. Используйте стандартный раствор и 100-кратный концентрат конъюгата в течение трех месяцев с момента разведения.
г) Загрязнение раствора ферментного субстрата	Утилизируйте субстрат при окрашивании в синий цвет. Используйте чистые емкости для реагента.
д) Смешивание плазмы в пробирках QFT до отбора	После центрифугирования перед отбором плазмы всеми способами избегайте ее пипетирования или перемешивания. Необходимо проявлять осторожность, чтобы не взболтать материал на поверхности геля.

Низкие показатели оптической плотности рабочих стандартов

Возможная причина	Решение
а) Ошибка в приготовлении рабочих стандартных разведений	Обеспечьте правильное приготовление стандартных разведений согласно инструкции-вкладыша QFT ELISA.
б) Ошибка при пипетировании	Убедитесь, что пипетки откалиброваны и используются в соответствии с инструкциями производителя.
в) Слишком низкая температура инкубации	Инкубирование при проведении ELISA должно проходить при комнатной температуре (22 °C ± 5 °C).
г) Слишком короткое время инкубации	Инкубирование планшета с конъюгатом, стандартными разведениями и пробами должно проводиться в течение 120 мин ± 5 мин. Инкубирование планшета с раствором ферментного субстрата проводится в течение 30 мин.
д) Использование неподходящего фильтра считывающего устройства	Луночный планшет должен анализироваться при 450 нм с помощью референсного фильтра, установленного на длину волн между 620 и 650 нм.
е) Слишком холодные реагенты	Перед проведением анализа все реагенты, за исключением 100-кратного концентрата конъюгата, необходимо довести до комнатной температуры. Для этого достаточно одного часа.
ж) Истечение срока годности компонентов	Используйте набор до истечения срока годности. Используйте стандартный раствор и 100-кратный концентрат конъюгата в течение трех месяцев с момента разведения.

Высокий фон

Возможная причина	Решение
а) Неполное промывание планшета	Промойте планшет как минимум шесть раз промывочным буфером из расчета 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться большее количество промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно составлять не менее пяти секунд.
б) Слишком высокая температура инкубации	Инкубирование при проведении ELISA должно проходить при комнатной температуре ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).
в) Истечение срока годности компонентов	Используйте набор до истечения срока годности. Используйте стандартный раствор и 100-кратный концентрат конъюгата в течение трех месяцев с момента разведения.
г) Загрязнение раствора ферментного субстрата	Утилизируйте субстрат при окрашивании в синий цвет. Используйте чистые емкости для реагента.

Отсутствие линейности в стандартной кривой, вариабельность дубликатов

Возможная причина	Решение
а) Неполное промывание планшета	Промойте планшет как минимум шесть раз промывочным буфером из расчета 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться большее количество промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно составлять не менее пяти секунд.
б) Ошибка в приготовлении рабочего стандартного разведения	Обеспечьте правильное приготовление стандартных разведений согласно инструкции-вкладыша QFT ELISA.
в) Плохое смешивание	Тщательно смешайте реагенты путем перевертывания, или используя вортекс перед внесением на планшет.
г) Непоследовательная техника пипетирования или приостановка во время начальной стадии теста.	Внесение образцов и стандартных разведений должно производиться непрерывно. Все реагенты должны быть подготовлены к началу проведения теста.

Видеозапись процесса тестирования и устранения возможных технических проблем можно найти через Gnowee™, зарегистрировавшись непосредственно на сайте www.gnowee.net. Информация о продукте и технические руководства по эксплуатации продукта предоставляется компанией QIAGEN бесплатно. Их можно также заказать через вашего дистрибьютера или получить по адресу www.QuantiFERON.com.

11. Перечень литературы

Полный перечень литературы по QFT можно найти через Gnowee — справочную библиотеку QuantiFERON по адресу www.gnowee.net.

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

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

12. Техническое обслуживание

По вопросам технического обслуживания обращаться:

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific ■ techservice-ap@qiagen.com

Europe ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

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

USA/Canada ■ techservice-na@qiagen.com

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

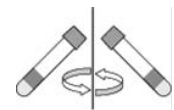
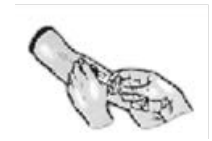
Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

13. Краткое описание теста

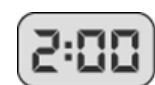
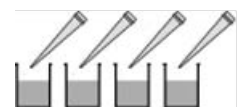
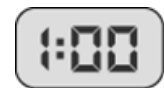
Этап 1. Инкубирование образца крови

1. Взять у пациента пробу крови в вакуумные пробирки для забора крови и тщательно перемешать ее, встряхивая десять (10) раз так, чтобы можно было убедиться, что вся внутренняя поверхность пробирки покрыта кровью, что необходимо для растворения антигенов на стенках пробирки.
2. Инкубировать пробирки в вертикальном положении в течение 16–24 часов при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. После инкубирования пробирки центрифугируют в течение 15 минут при 2000–3000 ОСЦ (g), для того чтобы отделить плазму от эритроцитов.
4. После центрифугирования перед отбором плазмы не допускать набора и выпуска плазмы пипеткой или смешивания плазмы до ее отбора. Всегда будьте осторожны, чтобы не взболтать материал на поверхности геля.

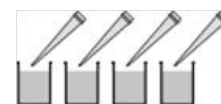
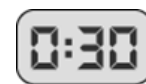
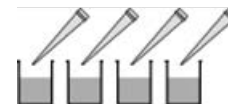


Этап 2. ELISA для выявления IFN-γ

1. Все компоненты для ELISA (кроме 100-кратного концентрата конъюгата) выдержать при комнатной температуре ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) как минимум в течение 60 минут.
2. Развести стандарт деионизированной или дистиллированной водой до концентрации 8,0 МЕ/мл. Приготовить четыре (4) рабочих стандартных разведения.
3. Развести 100-кратный лиофилизированный концентрат конъюгата деионизированной или дистиллированной водой.
4. Развести конъюгат растворителем зеленого цвета и внести по 50 мкл во все лунки.
5. Внести 50 мкл каждой пробы плазмы и 50 мкл каждого стандартного раствора в соответствующие лунки. Перемешать на шейкере.
6. Инкубировать при комнатной температуре в течение 120 мин \pm 5 мин.



7. Не менее 6 раз промыть лунки промывочным буферным раствором (400 мкл на каждую лунку).
8. Внести по 100 мкл раствора ферментного субстрата в каждую лунку. Перемешать на шейкере.
9. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
10. В каждую лунку внести по 50 мкл стоп-реагента. Перемешать на шейкере.
11. Измерить результат реакции, используя фильтр на 450 нм и референсный фильтр 620–650 нм.
12. Проанализировать результаты.



Важные изменения

Основные изменения в данной редакции (1075115RU, ред. 01) инструкции-вкладыша к QFT ELISA приведены в таблице ниже.

Раздел	Страница	Изменения
4 «Предупреждения и меры предосторожности»	9–11	Поправка к использованию определенных компонентов комплекта ELISA между партиями.
12 «Техническое обслуживание»	30	Новые адреса электронной почты для вопросов относительно технического обслуживания.

Товарные знаки: QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (группа QIAGEN); Microsoft®, Excel® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Ограниченное лицензионное соглашение для QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

Использование настоящего продукта означает согласие всех покупателей или пользователей продукта со следующими условиями.

1. Продукт может использоваться исключительно в соответствии с протоколами, прилагаемыми к продукту, и настоящей инструкцией-вкладышем, а также исключительно с компонентами, содержащимися в наборе. Компания QIAGEN не предоставляет лицензии в рамках своей интеллектуальной собственности использовать или объединять прилагаемые компоненты настоящего набора с любыми компонентами, не входящими в настоящий набор, за исключением случаев, описанных в протоколах, поставляемых вместе с продуктом и настоящей инструкцией-вкладышем.
2. Кроме оговоренных лицензий, компания QIAGEN не предоставляет каких-либо гарантий, что данный набор и (или) его использование(я) не нарушает(ют) права третьих лиц.
3. Данный набор и его компоненты лицензированы для одноразового использования и не могут быть использованы повторно, переделаны или перепроданы, если иное не указано компанией QIAGEN.
4. Компания QIAGEN отказывается от любых прочих лицензий, выраженных явно или подразумеваемых, кроме тех, о которых заявлено прямо.
5. Покупатель и пользователь данного набора соглашается не предпринимать или не разрешать кому-либо предпринимать какие-либо меры, которые могут привести или способствовать любым действиям, запрещенным выше. Компания QIAGEN может требовать исполнения требований настоящего ограниченного лицензионного соглашения в судебном порядке в любом суде и получать возмещения всех своих следственных и судебных издержек, включая стоимость юридических услуг, за любые действия, направленные на исполнение требований настоящего ограниченного лицензионного соглашения или любого из своих прав на интеллектуальную собственность, связанных с набором и (или) его компонентами.

Актуальные условия лицензии см. на сайте по адресу www.qiagen.com.

© Cellestis, a QIAGEN Company, 2013. Все права защищены.

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: quantiferon@qiagen.com

