

QuantiFERON[®]-TB **Gold** *(in vitro)*

Тест на содержание гамма-интерферона
в образцах цельной крови
для определения иммунного ответа на
пептидные антигены ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4)

Инструкция-вкладыш

Диагностика *in vitro*



СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ТЕСТЕ	2
Принцип анализа	3
Продолжительность теста	3
3. РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ИХ ХРАНЕНИЯ	4
Оборудования и материалы, не входящие в комплект поставки	5
Условия хранения	5
Вакуумные пробирки для забора крови	6
Реагенты для ИФА (ELISA)	6
Подготовленные и неизрасходованные реагенты	6
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ТРЕБОВАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ	6
Меры предосторожности	6
Требования по безопасности	7
5. ВЗЯТИЕ ПРОБ И ПОРЯДОК ОБРАЩЕНИЯ С НИМИ	8
6. ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ИФА	10
1.ЭТАП: Инкубирование образцов крови и отбор плазмы	10
2.ЭТАП: ИФА для выявления человеческого гамма-интерферона	11
7. РАСЧЁТЫ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА	15
Построение калибровочной кривой	15
Контроль качества проведения теста	16
Интерпретация результатов	17
8. ОГРАНИЧЕНИЯ	21
9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	21
10. ТЕХНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ	24
Сомнительные результаты	24
Образование сгустков в плазме крови	24
Возможные проблемы и способы их решения при проведении ИФА (ELISA)	25
Неспецифическое окрашивание	25
Низкий показатель оптической плотности у рабочих стандартов	25
Высокий фон	26
Отсутствие линейности у калибровочной кривой, вариабельность дубликатов	26
11. Библиография	27
12. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	29
13. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА	30

1. НАЗНАЧЕНИЕ

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) - диагностическая тест-система, принцип которой состоит в использовании пептидной смеси, симулирующей протеины-ESAT-6, CFP-10, TB7.7(p4), для стимулирования клеток в гепаринизированной цельной крови. Выявление гамма-интерферонов (IFN- γ) с помощью метода твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа, ИФА (ELISA), проводится с целью определения *in vitro* иммунных реакций на данные пептидные антигены, ассоциирующиеся с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis*.

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) является непрямым 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

Туберкулёз – передающаяся контактным путём болезнь, вызываемая инфицированием сложными организмами *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). Заражение, как правило, происходит воздушно-капельным путем от больного, страдающего туберкулёзом дыхательных путей. Инфицированный может заболеть туберкулёзом в течение периода от нескольких недель до нескольких месяцев, но большинство инфицированных не заболевают. Латентная туберкулёзная инфекция (ЛТБИ), заболевание, не передающееся контактным путём и протекающее асимптоматически, персистирует у некоторых индивидуумов, у которых туберкулёз может развиться позже, в течение месяцев и лет. Основная цель диагностирования ЛТБИ – назначение медицинского лечения для предотвращения заболевания туберкулёзом. До недавнего времени кожный туберкулиновый тест был 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 испытуемых, которые с высокой долей вероятности не являются инфицированными *M. tuberculosis*, выявляется чувствительность к туберкулину и положительная реакция на туберкулиновый кожный тест после вакцинации бациллой Calmette-Guérin (BCG), после инфицирования микобактерией, отличной от комплекса *M. tuberculosis*, или же в силу других неопределённых факторов.

Нужно отличать ЛТБИ от туберкулёза, болезни, поражающей лёгкие и нижние дыхательные пути, болезни, подлежащей регистрации. Иногда поражаются и другие системы органов. Туберкулёз диагностируется на основании физических, радиологических, гистологических и микобактериологических данных и данных истории болезней.

Тест-система QuantiFERON®-TB Gold In-Tube IT 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 нетуберкулёзных микобактерий, за исключением *M.kansasii*, *M.szulagai* и *M. marinum*.¹ В крови индивидуумов, инфицированных сложными организмами *M. tuberculosis*, как правило, имеются лимфоциты, которые распознают те или иные микобактериальные антигены. Этот процесс распознавания влечёт за собой генерирование и секрецию цитокина, гамма-интерферона. Выявление и последующий количественный анализ гамма-интерферона является основой данного теста.

Антигены, используемые в диагностической тест-системе QuantiFERON®-TB Gold In-Tube IT, представляют собой пептидную смесь, симулирующую протеины ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4). Многочисленные исследования показали, что эти пептидные антигены стимулируют образование гамма-интерферона в Т-клетках инфицированных *M. tuberculosis* индивидуумов, такого, как правило, не происходит у неинфицированных индивидуумов или индивидуумов, прошедших BCG-вакцинацию, не страдающих туберкулёзом или не входящих в группу риска по ЛТБИ¹⁻³². Тем не менее медицинское лечение или какие-либо заболевания, ослабляющие защитные механизмы иммунной системы, потенциально могут ослабить иммунный клеточный ответ, т.е. снизить образование гамма-интерферона (IFN- γ). Организм пациентов, имеющих другие микобактериальные инфекции, может так же давать ответную реакцию на протеины ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4), так как гены, в которых закодированы эти протеины, присутствуют, и в *M.kansasii*, и в *M.szulagai*, и *M. marinum*.^{1,2,3} Тест-система QuantiFERON®-TB Gold In-Tube IT используется, и для выявления ЛТБИ, и для диагностирования инфекций комплекса *M. tuberculosis* у больных пациентов. Позитивный результат теста - одно из доказательств наличия туберкулёзной болезни, тем не менее инфекции могут быть вызваны и другими микобактериями

(*M.kansasii*), что так же приведёт к положительному результату. Поэтому необходимы другие медицинские обследования, чтобы подтвердить или исключить наличие туберкулёзной болезни.

Принцип анализа

Тест-система QuantiFERON®-TB Gold IT представляет собой специальные пробирки для забора крови, предназначенные для забора образцов цельной крови. Последующее инкубирование пробирок с образцами крови длится 16-24 ч. Затем плазма изымается и исследуется на наличие в ней гамма-интерферона, образующегося в качестве иммунного ответа на пептидные антигены.

Тест QuantiFERON®-TB Gold IT состоит из двух этапов. На 1 этапе производится забор проб цельной крови в несколько вакуумных пробирок QuantiFERON®-TB Gold, а именно нулевую контрольную пробирку, пробирку с антигеном туберкулина и опциональную пробирку с митогеном.

При проведении теста диагностическим набором QuantiFERON®-TB Gold IT пробирка с митогеном может использоваться в качестве положительного контроля. Это особенно целесообразно в том случае, если иммунный статус пациента не выяснен. Кроме того, пробирка с митогеном может быть использована для контроля правильного обращения с пробой крови и её надлежащей инкубации.

Пробирка должна быть инкубирована при 37°C в кратчайшие сроки, не позднее 16 часов с момента забора крови. После 16-24х-часовой инкубации пробирка центрифугируется. Затем плазма изымается, и посредством метода твердофазного гетерогенного иммуноферментного анализа ИФА (ELISA) в ней определяется количество гамма-интерферона (в МЕ/мл).

Тест считается положительным в отношении реакции гамма-интерферона, если значение гамма-интерферона в пробирке с антигеном туберкулина значительно превышает значение гамма-интерферона (в МЕ/мл) в нулевой контрольной пробирке. В случае использования пробирки с митогеном, проба плазмы, стимулированная митогеном, является положительным контролем гамма-интерферона для каждой из тестируемых проб. Незначительная реакция на митоген (< 0,5 МЕ/мл) считается сомнительным результатом, если проба крови показывает негативную реакцию на антиген туберкулина. Такая картина может наблюдаться при недостаточном количестве лимфоцитов, их низкой активности вследствие ненадлежащего обращения с пробами, ненадлежащего наполнения или встряхивания пробирок, или если лимфоциты пациента не в состоянии вырабатывать гамма-интерферон. Нулевая проба охватывает коррекцию неспецифичных фоновых реакций, эффектов гетерофильных антител, а также неспецифичного гамма-интерферона в пробе крови. Значение гамма-интерферона нулевой пробирки отнимается от значения гамма-интерферона пробирки с антигеном туберкулина и пробирки с митогеном (в случае использования таковой).

Продолжительность теста

Ниже приведены данные по примерной продолжительности ИФА с применением диагностического набора QuantiFERON®-TB Gold IT, а также время, необходимое при одновременном тестировании большого количества проб.

Инкубирование пробирок с пробами при 37 °C:

16 – 24 часа

ИФА (ELISA):

около 3 ч. на каждый планшет ИФА (28 -44 тестируемых)

- < 1 ч. рабочего времени
- +10-15 мин. на каждый дополнительный планшет

3. РЕАГЕНТЫ И УСЛОВИЯ ИХ ХРАНЕНИЯ

Вакуумные пробирки с антигеном туберкулина и контрольным антигеном

№ по каталогу 0590 0301

- | | |
|--|---------|
| 1. Нулевая контрольная пробирка (серая крышка) | 100 шт. |
| 2. Пробирка с антигеном туберкулина (красная крышка) | 100 шт. |
| 3. Контрольная пробирка с митогеном (сиреневая крышка) | 100 шт. |

ПРИМЕЧАНИЕ: Кроме того, в наличии имеются япробирки в следующей комплектации:

№ по каталогу: 0590- 0201: 100 нулевых контрольных пробирок + 100 пробирок с антигеном туберкулина

№ по каталогу: 0593 0201: 100 контрольных пробирок с митогеном

№ по каталогу 590 0501: (для использования на больших высотах над уровнем моря) 100 нулевых контрольных пробирок, 100 пробирок с антигеном туберкулина

№ по каталогу 0590 0505: (для использования на больших высотах над уровнем моря) 100 нулевых контрольных пробирок, 100 пробирок с антигеном туберкулина и 100 контрольных пробирок с митогеном

№ по каталогу T0593 0501: (для использования на больших высотах над уровнем моря) 100 контрольных пробирок с митогеном

Реагенты для ИФА (ELISA)

№ по каталогу 0594 0201

- | | |
|--|--------------|
| 1. Стрипы для микропланшетов | 24 x 8 лунок |
| 2. Человеческий гамма-интерферон, лиофилизат для приготовления стандартного раствора | 1 флакон |
| 3. Растворитель зелёного цвета | 1 x 30 мл |
| 4. Концентрат конъюгата (100-кратная концентрация), лиофилизированный | 1 x 0,3 мл |
| 5. Промывочный буферный концентрат (20-кратная концентрация) | 1 x 100 мл |
| 6. Раствор фермент-субстрата | 1 x 30 мл |
| 7. Стоп-реагент, содержащий ферменты | 1 x 15 мл |

Оборудование и материалы, не входящие в комплект поставки

- Инкубатор 37 °С; СО₂ не требуется.
- Градуированные переменные пипетки (позволяющие отбирать объемы жидкостей от 10 мкл до 1000 мкл) с одноразовыми наконечниками
- Градуированная многоканальная пипетка, позволяющая отбирать 50 мкл и 100 мкл жидкости, с одноразовыми наконечниками
- Встряхиватель для микропланшетов
- Деионизированная или дистиллированная вода (2 л)
- Моющее устройство для микропланшетов (предпочтительнее автоматическое)
- Спектрофотометр (анализатор) микропланшетный с фильтрами 450 нм и 620 - 650 нм

Условия хранения

Вакуумные пробирки для забора крови

- Хранить вакуумные пробирки для забора крови при 4 - 25 °С.
- Срок годности вакуумных пробирок для забора крови QuantiFERON®-TB Gold: 15 месяцев со дня выпуска при хранении при 4 – 25 °С.

Реагенты для ИФА (ELISA)

- Хранить реагенты при 2 – 8 °С.
- Не подвергать раствор фермент-субстрата воздействию прямых солнечных лучей.
- Срок годности реагентов для ИФА (ELISA) QuantiFERON®-TB Gold IT: 3 года со дня выпуска при хранении при 2 - 8°С.

Подготовленные и неизрасходованные реагенты

Инструкции по подготовке реагентов для анализа представлены в разделе 6 в пункте „Подготовка реагентов“.

- Разведённый стандартный раствор можно хранить 3 месяца при 2-8 °С.
 - *Запишите дату приготовления стандартного раствора.*
- Оставшийся после разведения конъюгата неиспользованный концентрат конъюгата (100х) хранить при 2-8°С и использовать в течение трёх месяцев.
 - *Запишите дату приготовления конъюгата.*
- Рабочий конъюгат использовать в течение 6 часов с момента приготовления.
- Рабочий промывочный раствор хранить при комнатной температуре не более двух недель.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И ТРЕБОВАНИЯ ПО БЕЗОПАСНОСТИ

Меры предосторожности

- Отрицательный результат ИФА, полученный с помощью тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT, не исключает наличия инфекции *M. tuberculosis* или туберкулёза; 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 ИФА, полученный с помощью тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT, не должен являться единственным основанием для вывода о наличии инфекции *M. tuberculosis*; несоблюдение инструкции по проведению теста может привести к ложноположительным результатам.
- Положительный результат ИФА, полученный с помощью тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT, должен быть подтверждён дальнейшими медицинскими диагностическими исследованиями; только таким образом можно выявить активный туберкулёз (например, исследование мокроты на кислотоустойчивые бактерии и бактериологическое (культуральное) исследование, а также рентгеновское обследование грудной клетки).
- Протеины ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4) отсутствуют во всех штаммах BCG и в большинстве известных нетуберкулёзных микобактерий, однако положительный результат ИФА с применением тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT может быть обусловлен и наличием инфекции *M. kansasii*, *M. szulgai* или *M. marinum*. Если предполагается наличие таких инфекций, то необходимы альтернативные диагностические исследования.

Требования по безопасности

- **Использовать только для диагностики *in vitro*.**
- **Осторожно: Раствор энзим-субстрата** содержит 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, оказывающий чрезвычайно вредное воздействие при проглатывании, ингаляции и попадании на кожу. Оказывает мутагенное действие. При работе с раствором использовать защитные очки и перчатки, обращаться с раствором как с потенциально карциногенным.
- **Осторожно: Стоп-раствор с энзимами** содержит серную кислоту H₂SO₄, представляющую опасность при проглатывании, ингаляции и при попадании на кожу и в глаза. При работе с раствором использовать защитные очки, перчатки и одежду для лабораторий. При попадании стоп-раствора на кожу или в глаза промыть большим количеством воды и обратиться к врачу.
- **Осторожно: Стандартный образец человеческого гамма-интерферона и 100-кратный концентрат конъюгата** могут вызвать недомогания при проглатывании и раздражения при попадании на кожу. Надевать защитную одежду и перчатки для лабораторий.
- **Всегда рассматривать образцы человеческой крови как потенциально инфицированные!** Соблюдать соответствующие инструкции по работе с образцами крови.
- Некоторые реагенты содержат **тимерозал** в качестве консерванта. При проглатывании, ингаляции и попадании на кожу он может оказывать токсичное действие.
- **Раствор зелёного цвета** содержит нормальную сыворотку мыши и казеин; эти вещества могут вызвать аллергические реакции. Избегать попадания на кожу.
- Несоблюдение требований и рекомендаций, указанных в прилагаемой инструкции, может привести к ложным результатам. Перед использованием внимательно прочитать инструкцию по проведению теста.
- Не использовать набор реагентов, если один из пузырьков (или несколько пузырьков) с реагентами повреждён или негерметично закрыт.
- Не использовать с компонентами данной упаковки реагенты для ИФА (ELISA) из других наборов QuantiFERON[®]-TB Gold IT.
- Неиспользованные реагенты и биологические образцы подлежат утилизации согласно инструкциям местного и государственного значения.
- Не использовать вакуумные пробирки для забора крови и реагенты набора для ИФА (ELISA) с истёкшим сроком годности.

5. ВЗЯТИЕ ПРОБ И ПОРЯДОК ОБРАЩЕНИЯ С НИМИ

Тест-система QuantiFERON®-TB Gold IT включает в себя следующие вакуумные пробирки для забора крови:

1. нулевая контрольная (серая крышка с белым кольцом) (используется на высоте от уровня моря до 810м)
2. с антигеном туберкулина (красная крышка с белым кольцом) (используется на высоте от уровня моря до 810м)
3. контрольная с митогеном (сиреневая крышка с белым кольцом) (используется на высоте от уровня моря до 810м)
4. нулевая контрольная (серая крышка с желтым кольцом) (используется на высоте от 1,020м до 1,875м)
5. с антигеном туберкулина (красная крышка с желтым кольцом) (используется на высоте от 1,020м до 1,875м)
6. контрольная с митогеном (сиреневая крышка с желтым кольцом) (используется на высоте от 1,020м до 1,875м)

Внутренняя поверхность вакуумной пробирки для забора крови покрыта антигенами в сухом виде. Поэтому нужно тщательно премешать образец крови с содержимым пробирки. Затем пробирки должны быть как можно скорее помещены в инкубатор (37 °C), не позднее, чем через 16 ч. с момента забора крови.

Для достижения оптимальных результатов необходимо соблюдать следующие инструкции:

1. Взять у каждого пациента по 1 мл венозной крови в каждую из вакуумных пробирок тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT.

- Стандартные пробирки QuantiFERON® для забора крови используются до высоты 810 м над уровнем моря. На высоте более 1020 м над уровнем моря необходимо использовать специальные пробирки (HA) QuantiFERON® для забора крови.

При использовании пробирок QuantiFERON® 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 1мл в каждую из трех пробирок. При этом, исходя из необходимости соблюдения мер предосторожности, перенос образцов крови в пробирки рекомендуется проводить без иглы, сняв крышки с трех пробирок QuantiFERON® для забора крови и добавив по 1мл крови в каждую из пробирок (до уровня черной метки, нанесенной на этикетку пробирки.) После чего пробирки хорошо закрываются, а содержимое встряхивается, 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. Это является гарантией того, что взято необходимое количество крови.

Чёрная метка на стенке пробирки соответствует 1 мл крови. Объем крови, полученный с помощью вакуумных пробирок QuantiFERON®-TB Gold, может составлять от 0,8 до 1,2 мл. Если при заборе крови уровень заполнения пробирки не достигает метки, то рекомендуется взять новую пробу крови.

- При использовании для забора крови иглы-бабочки необходимо обеспечить заполнение кровью гибкой соединительной трубки с помощью пустой пробирки, а затем присоединять пробирку QuantiFERON®-TB Gold.

2. **Сильно встряхивать** пробирку в течение **5 секунд** (или встряхнуть её 10 раз). Убедиться в том, что **вся внутренняя поверхность пробирки** покрыта кровью.

- Тщательное встряхивание является важным условием для полного перемешивания содержимого пробирки с образцом крови.
 - При встряхивании обычно образуется некоторое количество пены. Это не влияет на результат теста и не является основанием для беспокойства.
3. Подписать пробирки.
 4. Пробирки должны быть помещены в инкубатор (37 °С) как можно скорее (не позднее 16 часов с момента забора крови). Не хранить образцы крови в холодильнике или морозильной камере!

6. ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ИФА

1. Этап: инкубирование образцов крови и отбор плазмы

Материалы, входящие в комплект поставки

Вакуумные пробирки для забора крови QuantiFERON®-TB Gold IT (см. раздел 3).

Необходимые материалы и оборудование (не входят в комплект поставки)

См. раздел 3.

Порядок работы

1. Если инкубирование производится не сразу после забора крови, то **непосредственно перед инкубацией пробирки нужно встряхнуть ещё раз**, см. раздел 5.
2. Инкубировать пробирки **в вертикальном положении** в течение 16–24 часов при 37 °С. При этом не требуется CO₂ или увлажнение.
3. После инкубации при 37°С вакуумные пробирки для забора крови можно хранить при температуре от 2 до 27°С до 3 дней непосредственно перед центрифугированием
4. После инкубации при 37 °С пробирки центрифугируют в течение 5-15 минут при 1500 – 2200 g (ОЦ) для более лёгкого отбора плазмы. Разделительный гель отделит плазму от форменных элементов. Если этого не произошло, то необходимо повторное центрифугирование пробирок на более высокой скорости.
 - Плазму можно отобрать и без центрифугирования, однако делать это нужно очень осторожно, чтобы не захватить форменные элементы.
5. Пробы плазмы могут быть помещены из вакуумных пробирок для забора крови непосредственно в микропланшеты QuantiFERON®-TB Gold для ИФА, особенно при использовании автоматического ИФА-анализатора.
6. В качестве альтернативы образцы плазмы до ИФА можно хранить непосредственно в центрифугированных пробирках или поместить их в контейнер для хранения плазмы (например, поместить образцы плазмы (>150 мкл) в лунки микропланшета или в микропробирки в штативе на 96 мест), при этом образцы закрыть, чтобы избежать расплёскивания и испарения.
 - При температуре от 2 до 8 °С Образцы плазмы можно хранить не более 4 недель; более длительное хранение допустимо при температуре ниже –20 °С (предпочтительнее ниже –70°С).

2. этап: ИФА для выявления человеческого гамма-интерферона

Материалы, входящие в комплект поставки

Набор реагентов для ИФА QuantiFERON®-TB Gold (см. раздел 3).

Необходимые материалы и оборудование (не входят в комплект поставки)

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 ($22 \pm 5^\circ\text{C}$). Для этого Вам понадобится не менее 60 минут.
2. Извлеките лишние стрипы из рамки, положите их в алюминиевый пакет и храните в холодильнике до использования.
Приготовьте хотя бы один стрип для стандартных растворов QuantiFERON®-TB Gold и достаточное количество стрипов для исследуемых проб пациентов (см. схемы 2А и 2В при использовании 2 или 3 пробирок соответственно). После использования сохраните рамку и крышку для оставшихся неиспользованных стрипов.
3. Разведите лиофилизированный стандартный образец гамма-интерферона, входящий в набор реагентов, указанным на этикетке флакона объёмом деионизированной или дистиллированной воды. Аккуратно перемешайте содержимое, избегая образования пены и убедитесь в том, что лиофилизат полностью растворился. При разведении лиофилизата указанным объёмом получается раствор, концентрация которого составляет 8,0 МЕ/мл.

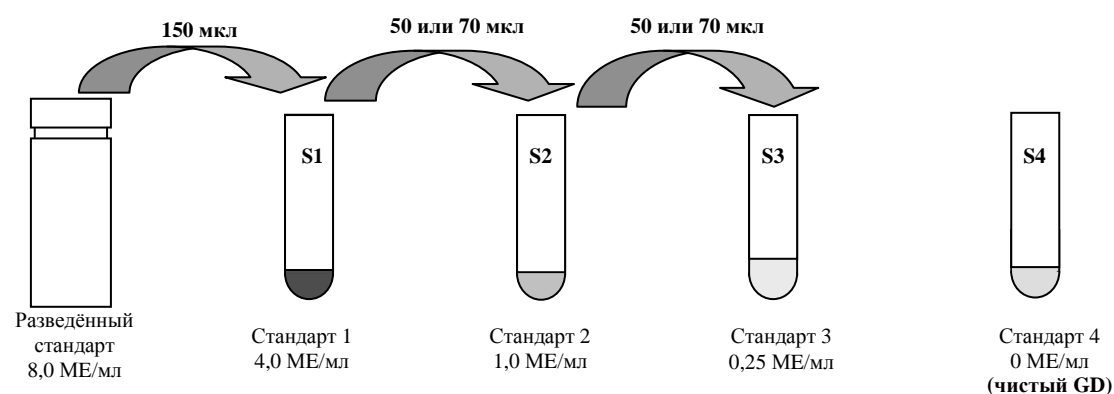
Примечание: объём разводимого стандарта зависит от количества тестируемых образцов!

Используйте разведённый стандарт набора для приготовления серии из 4 рабочих стандартных разведений гамма-интерферона на зелёном растворителе (**GD**) – см. схему 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
a. Подпишите 4 пробирки: „S1”, „S2”, „S3” und „S4”.
b. Внесите 150 мкл зелёного растворителя (GD) в S1, S2, S3, S4.
c. Добавьте 150 мкл разведённого стандарта в S1 и тщательно перемешайте.
d. Перенесите 50 мкл из S1 в S2 и тщательно перемешайте.
e. Перенесите 50 мкл из S2 в S3 и тщательно перемешайте.
f. „Чистый GD ” служит нулевым стандартом (S4).

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ, РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРИ ТРОЙНОЙ СЕРИИ СТАНДАРТОВ
a. Подпишите 4 пробирки: „S1”, „S2”, „S3” und „S4”.
b. Внесите 150 мкл зелёного растворителя (GD) в S1.
c. Внесите 210 мкл GD в S2, S3, S4.
d. Добавьте 150 мкл разведённого стандарта в S1 и тщательно перемешайте.
e. Перенесите 70 мкл из S1 в S2 и тщательно перемешайте.
f. Перенесите 70 мкл из S2 в S3 и тщательно перемешайте.
g. „Чистый GD ” служит нулевым стандартом (S4).

Схема 1. Приготовление серии рабочих стандартных разведений



- Для каждого цикла ИФА готовьте новые рабочие стандартные разведения.
4. Разведите 100-кратный лиофилизированный концентрат конъюгата 0,3 мл деионизированной или дистиллированной воды. Аккуратно перемешайте содержимое флакона, избегая образования пены, и убедитесь в том, что лиофилизат полностью растворился.

Для приготовления рабочего раствора конъюгата необходимо развести нужное количество разведённого 100-кратного конъюгата растворителем зелёного цвета согласно таблице 1 (Приготовление конъюгата).

ТАБЛИЦА 1. Приготовление конъюгата

Количество стрипов	Объём 100-кратного концентрата конъюгата	Объём растворителя зелёного 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

- Перемешивать основательно, но аккуратно, чтобы избежать образования пены.
 - Сразу после использования 100-кратный концентрат конъюгата снова хранить при температуре от 2 до 8°C .
 - Для разведения использовать только раствор зелёного цвета.
5. Перед проведением теста плазму перемешать, чтобы гамма-интерферон равномерно распределился по образцу.
 6. С помощью многоканальной пипетки внести 50 мкл свежеприготовленного рабочего раствора конъюгата в соответствующие лунки планшета для ИФА.
 7. С помощью многоканальной пипетки внести 50 мкл каждого образца плазмы в соответствующие лунки планшета для ИФА (см. рекомендуемую схему расположения в приведённых ниже схемах 2А

и 2B). В последнюю очередь внесите в соответствующие лунки 50 мкл каждого стандартного раствора 1 - 4 .

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

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

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

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

ряд	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	16°	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17°	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18°	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19°	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

- 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).

- С помощью встряхивателя для микропланшетов тщательно перемешать рабочий конъюгат, образцы плазмы и стандартные разведения в течение 1 минуты.
- Накрыть каждый планшет крышкой и инкубировать планшеты в течение 120 ± 5 минут при комнатной температуре ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Во время инкубации не подвергать планшеты воздействию прямых солнечных лучей.
- Во время процесса инкубации разведите 20-кратный буферный промывочный концентрат деионизированной или дистиллированной водой в соотношении 1:19 и тщательно перемешайте. Количества 20-кратного буферного промывочного концентрата, входящего в объём поставки, достаточно для приготовления 2 литров готового к использованию буферного промывочного раствора.

Не менее 6 раз промыть каждую лунку 400 мкл подготовленного к работе промывочного буферного раствора. Рекомендуется применение автоматического промывающего устройства для микропланшетов.

- Тщательная отмывка планшетов очень важна для достоверности результатов теста. При каждом промывочном цикле следить за тем, чтобы все лунки **заполнялись буферным промывочным раствором полностью, до самого верха.** Между промывочными циклами рекомендуется выдерживать не менее 5 секунд для замачивания.

- В ёмкость для жидких отходов необходимо добавлять обычное дезинфицирующее средство для лабораторий. Соблюдать действующие лабораторные инструкции по обеззараживанию потенциально инфицированных материалов.
11. Повернуть планшеты лунками вниз и вытряхнуть их на фильтровальную бумагу, чтобы удалить оставшийся буферный промывочный раствор. Затем внести 100 мкл раствора энзим-субстрата в каждую лунку и перемешать с помощью встряхивателя для микропланшетов.
 12. Закрыть каждый планшет крышкой и инкубировать 30 минут при комнатной температуре ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Во время инкубации не подвергать планшеты воздействию прямых солнечных лучей.
 13. После 30-минутной инкубации внести в каждую лунку 50 мкл стоп-реагента и перемешать.
 - Стоп-реагент нужно вносить в лунки в той же последовательности и примерно в том же темпе, что и раствор энзим-субстрата (см. шаг 11).
 14. Измерить оптическую плотность (ОП) каждой лунки планшета в течение 5 минут после добавления стоп-реагента, для измерения использовать микропланшетный спектрофотометр (ридер, иммуноферментный анализатор) с фильтром 450 нм и референсным фильтром 620-650 нм.
Значения оптической плотности необходимы для расчёта результатов.

7. РАСЧЁТЫ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ТЕСТА

Компания Cellestis предоставляет программное обеспечение для тест-системы QuantiFERON®-TB Gold In-Tube IT, необходимое для анализа полученных данных и расчёта результатов теста.

Программа производит оценку контроля качества теста, выстраивает калибровочную кривую и обеспечивает результат для каждой анализируемой пробы, как это показано в разделе «Интерпретация результатов».

Альтернативой программному обеспечению тест-системы QuantiFERON®-TB Gold In-Tube IT может служить следующий метод для интерпретации результатов теста:

Построение калибровочной кривой

(В случае, если программное обеспечение тест-системы QuantiFERON®-TB Gold In-Tube IT не используется)

Определите среднее значение оптической плотности дубликатов рабочих стандартов на каждом планшете. В системе координат постройте калибровочную кривую в логарифмическом масштабе, причём по оси у откладываются значения оптической плотности, а по оси x – значение концентрации гамма-интерферона в стандартах (в МЕ/мл), при этом нулевой стандарт в расчётах не учитывается. Методом регрессивного анализа вычислите линию, максимально соответствующую калибровочной кривой.

Калибровочная кривая применяется для определения концентрации гамма-интерферона в стандартах (в МЕ/мл) для каждого тестируемого образца плазмы, при этом используется значение оптической плотности каждого образца.

Эти расчёты могут быть произведены с помощью программного обеспечения, имеющегося в наличии вместе с микропланшетными считывающими устройствами (ридерами) и стандартной крупноформатной таблицей или статистической программой (типа Microsoft Excel). Программное обеспечение рекомендуется для проведения регрессивного анализа, коэффициента вариабельности (CV %) стандартов и коэффициента корреляции (r) калибровочной кривой.

Контроль качества проводимого теста

Точность результатов теста зависит от точности построения калибровочной кривой. Поэтому интерпретация результатов тестирования проб должна производиться после анализа значений рабочих стандартных разведений (рабочих стандартов).

Для ИФА (ELISA) должно соблюдаться следующее:

- Среднее значение оптической плотности (ОП) для стандарта 1 должно составлять ≥ 0.600 .
- Коэффициент вариабельности (CV %) репликатных значений ОП для стандартов 1 и 2 должен быть $\leq 15\%$.
- Репликатные значения ОП для стандарта 3 и стандарта 4 не должны варьировать более, чем на 0.040 единицы ОП от среднего значения.
- Коэффициент корреляции (r), рассчитанный из среднего значения спектральной поглощательной способности стандартов должен составлять ≥ 0.98 .

Программное обеспечение тест-системы QuantiFERON[®]-TB Gold, проводящее анализ, просчитывает и выдаёт информацию о параметрах контроля качества.

Если выше указанные критерии не соблюдены, то процесс считается недействительным и должен быть повторён.

- Среднее значение ОП для нулевой контрольной пробирки (зелёный растворитель) должен составлять ≤ 0.150 . Если этот показатель > 0.150 , то необходимо проверить проведение процедуры промыва.

Интерпретация результатов

Результаты тестирования, полученный с помощью тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT, могут быть интерпретированы на основании следующих критериев:

Внимание: Для подтверждения или исключения туберкулёзной болезни, как и для оценки вероятности ЛТБИ, необходима комбинация эпидемиологических, исторических, медицинских и диагностических данных, которые должны учитываться при интерпретировании результатов, полученных с помощью тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT.

ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ТОЛЬКО НУЛЕВОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ПРОБИРКИ И ПРОБИРКИ С АНТИГЕНОМ ТУБЕРКУЛИНА

Нулевой контроль [МЕ/мл]	Антиген туберкулина минус нулевой контроль [МЕ/мл]	QuantiFERON®-TB [МЕ/мл]	Интерпретация
≤ 8.0	< 0.35	отрицательный	Вероятность инфекции <i>M. tuberculosis</i> отсутствует
	≥ 0.35 и < 25% нулевого контрольного значения		
	≥ 0.35 и ≥ 25% нулевого контрольного значения	положительный ¹	Инфекция <i>M. tuberculosis</i> вероятна
> 8.0 ²	любой показатель	сомнительный ³	Результаты сомнительные в силу чувствительности к антигену туберкулина

¹ В данном случае подозрения на инфекцию *M. tuberculosis* нет, изначально положительный результат может быть подтверждён повторным тестированием оригинальных проб плазмы в дубликате с помощью QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Если повторный тест одного или обоих репликатов окажется позитивным, тестируемого следует считать инфицированным.

² В клинических исследованиях менее, чем 0.25% испытуемых имели уровень гамма-интерферона (IFN-γ) > 8.0 МЕ/мл при нулевом контроле.

³ См. раздел о причине возможных ошибок .

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

Схема 3. Интерпретация схемы последовательности процесса в случае использования пробирок НУЛЕВОГО КОНТРОЛЯ и АНТИГЕНА ТУБЕРКУЛИНА



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] ¹	QuantiFERON®-TB [МЕ/мл]	Интерпретация
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5	Отрицательный	Вероятность инфекции <i>M. tuberculosis</i> отсутствует
	≥ 0.35 и < 25% нулевого контрольного значения	≥ 0.5		
	≥ 0.35 и ≥ 25% нулевого контрольного значения	любое значение	Положительный²	<i>Инфекция M. tuberculosis</i> вероятна
	< 0.35	< 0.5	Сомнительный³	Результаты сомнительные в силу чувствительности к антигену туберкулина
≥ 0.35 и < 25% нулевого контрольного значения	< 0.5			
> 8.0 ⁴	любое значение	любое значение		

¹ Реакция на митоген (а иногда и на антиген туберкулина) может находиться вне пределов зоны покрываемости микропланшетным ридером. Это не влияет на результаты.

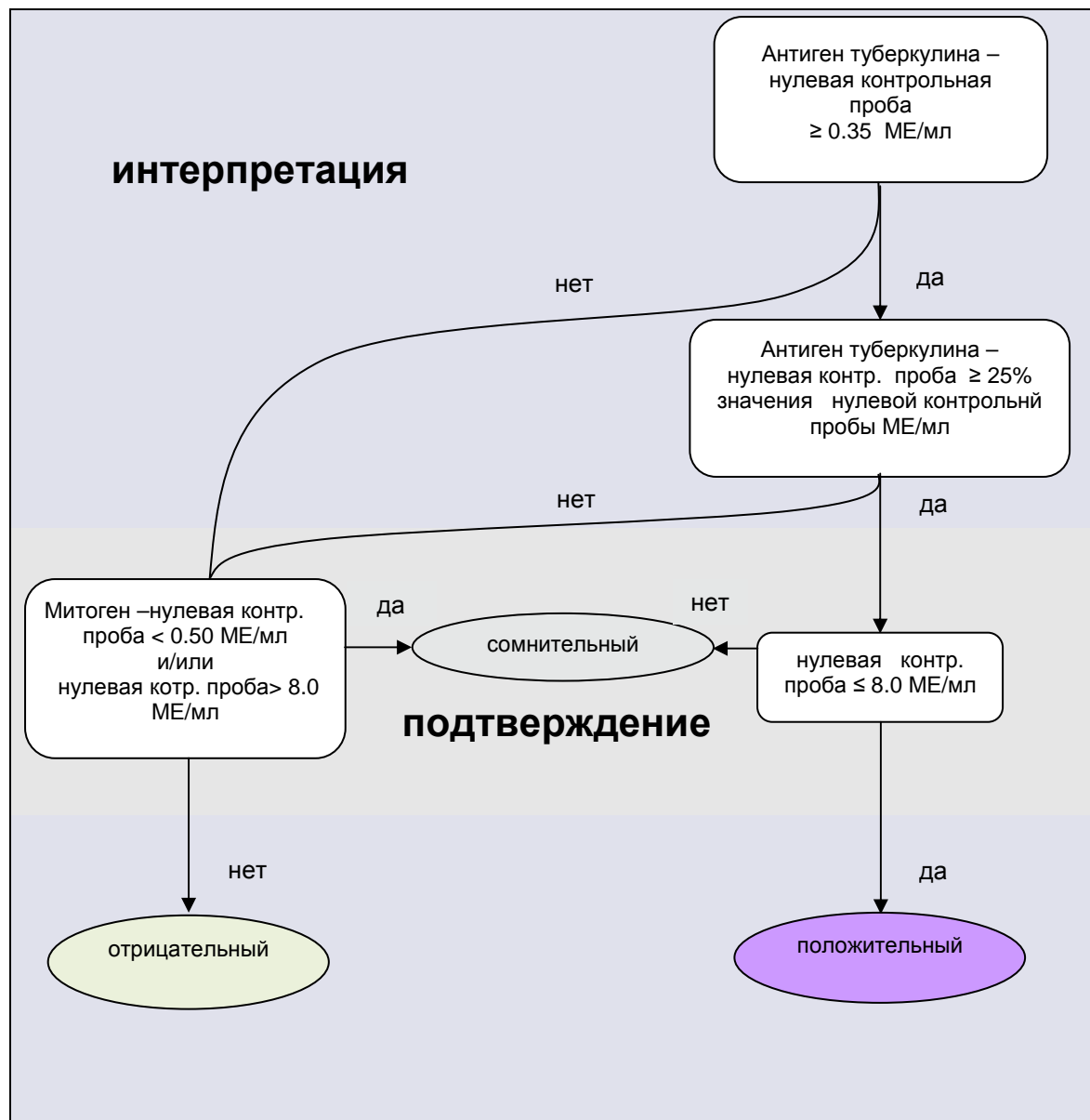
² В данном случае подозрения на инфекцию *M. tuberculosis* нет, изначально положительный результат может быть подтверждён повторным тестированием оригинальных проб плазмы в дубликате с помощью QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Если повторный тест одного или обоих репликатов окажется позитивным, тестируемого следует считать инфицированным.

³ См. раздел о причине возможных ошибок .

⁴ В клинических исследованиях менее, чем 0.25% испытуемых имели уровень гамма-интерферона (IFN-γ) > 8.0 МЕ/мл при нулевом контроле.

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

Схема 4. Интерпретация схемы последовательности процесса в случае использования пробирок НУЛЕВОГО КОНТРОЛЯ, АНТИГЕНА ТУБЕРКУЛИНА И МИТОГЕНА



8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Результаты, полученные с помощью системы QuantiFERON®-TB Gold IT, должны учитываться вместе с индивидуальной эпидемиологической историей, текущим медицинским статусом и другими диагностическими результатами.

Тестируемые 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.

Недостовверные и сомнительные результаты могут возникнуть по следующим причинам:

- Оклонения от инструкции проведения процедуры тестирования, описанной в сопроводительном листке.
- Чрезмерно высокий уровень гамма-интерферона (IFN- γ) или присутствие гетерофильных антител.
- С момента забора образца крови до его инкубации при 37°C прошло более 16 часов.

9. РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Клинические исследования

В силу отсутствия определённого стандарта для латентной туберкулёзной инфекции (ЛТБИ) чувствительность и специфичность тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT не может быть определена практически. Специфичность системы QuantiFERON®-TB Gold IT была примерно выражена посредством оценки ложноположительных показателей у индивидуумов с низким уровнем риска (с отсутствием известных факторов риска) инфицирования туберкулёзом. Чувствительность получила своё примерное выражение через оценку групп пациентов с подтверждённым диагнозом туберкулёзной болезни в активной стадии культуральным методом.

Специфичность

В американском исследовании, в котором принимали участие 866 добровольцев, забор образцов крови для QuantiFERON®-TB Gold IT производился во время проведения кожного туберкулинового теста. Демографические данные и информация по факторам риска туберкулёза были определены на основании стандартного обследования, проведённого в период тестирования. Из 432 добровольцев, не имеющих каких-либо известных факторов риска, соотносимых с инфекцией *M. tuberculosis*, у 391 человека результаты тестирования с помощью QuantiFERON®-TB Gold IT и кожного туберкулинового теста оказались пригодными. Ни у кого из них не было проведено вакцинации бациллой Calmette-Guérin (BCG). Второе исследование на специфичность было проведено с использованием тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT в Японии. Исследование проводилось с индивидуумами с низким риском заболевания, примерно 90% получили прививку от Calmette-Guérin (BCG). Результаты первого и второго исследования на специфичность показаны в таблице 2.

Таблица 2. Специфичность QuantiFERON®-TB Gold IT: Результаты тестирования индивидуумов с отсутствием риска инфицирования *M.tuberculosis*.

Исследование	BCG Статус % Привит	Общее число тестируемых	Кол-во QFT-G неопределён.	Кол-во QFT-G положит. / количество действит. тестов	QFT-G Специфичность (95% доверительный интервал)	Кол-во положит. на туберкулин / кол-во протестирован.	Туберкулин - тест* Специфичность (95% доверительный интервал)
США (не издано)	0%	391	1	3 / 390	99.2% (97.6-99.8)	6 / 391	98.5% (96.5-99.4)
Япония (не издано)	~90%	190	4	3 / 186	98.4% (95-99.6)	-	-
Общее число		581	5/584 (0.9%)	6 / 576	99.0%	-	-

*При пороговом значении (cut off) кожного туберкулинового теста 10мм . Специфичность кожного туберкулинового теста 99.1% , если cut off составляет 15мм .

Чувствительность при активном туберкулёзе

Австралийские и японские пациенты с подозрением на туберкулёз, у которых позднее подтвердилось наличие инфекции *M. tuberculosis*, были протестированы для определения чувствительности тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT. В силу отсутствия определённого стандартного теста для выявления латентной туберкулёзной 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 QuantiFERON®-TB Gold IT пациенты проходили курс терапии продолжительностью менее 8 дней.

В таблице 3 приводятся данные исследований, проведённых на двух группах пациентов, позитивных на *M. tuberculosis*, проверенных культуральной диагностикой. Общая чувствительность тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT для активного туберкулёза составляет 89% (48/54).

Таблица 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Пациенты, у которых наличие инфекции *M. tuberculosis* подтвердилось культуральным методом.

ИССЛЕДОВАНИЕ		Забоевание, подтверждённое методом культуры	Кол-во QFT-Gold положительных результатов / кол-во действительных тестов	QFT-Gold Чувствительность (95% доверительный интервал (CI))
Японские туберкулёзные больные Анализ выборки		Культурально	24 / 27	89% (72-96%)
Австралийские туберкулёзные больные Анализ выборки	Пулмональный	Культурально	7 / 10	70% (40-89%)
	Экстра-пулмональный		17 / 17	100% (82-100%)
ИТОГО:			48 / 54	89% (78-95%)

Диагноз ЛТБИ (латентной туберкулёзной инфекции)

Некоторые опубликованные исследования демонстрируют работу тест-системы QuantiFERON®-TB Gold IT в определённых группах с имеющимся риском ЛТБИ. Основные данные некоторых исследований собраны в таблице 4.

Таблица 4. Выборка из опубликованных исследований по использованию QuantiFERON®-TB Gold IT в определённых группах риска по ЛТБИ.

ИССЛЕДОВАНИЕ	Кол-во тестируемых	Данные и результаты
Медицинские работники в Индии (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Установление очень высокого показателя туберкулёза. 40% позитивных, выявленных с помощью QFT-Gold IT, из 41% позитивных на туберкулиновый тест (10 мм). Высокая согласованность с туберкулиновым кожным тестом, влияние BCG отсутствует. Возраст и продолжительность работы в сфере здравоохранения учитывались в обоих тестах как факторы риска.
Датские ВИЧ-больные (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	Общая распространённость ЛТБИ в среде ВИЧ-положительных, выявленная тест-системой QFT-Gold IT составила 4.6% (27/590). Позитивные результаты были обусловлены риском туберкулёза. Двое из позитивных тестируемых, выявленных QFT-Gold IT, перешли в группу больных с открытой формой туберкулёза в течение одного года. Количество сомнительных реакций было в большей степени связано с показателем CD4 <100 / мкл.
Госпитализированные дети (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Дети с подозрением на туберкулёз или имеющие историю контакта с больными были протестированы QFT-Gold IT и кожным туберкулиновым тестом. 10.5% позитивных, выявленных с QFT-Gold IT, из 9.5% позитивных на кожный туберкулиновый тест (10мм). Согласованность между тестами в общей сложности составляла 95.2% и 100% среди не прошедших вакцинацию BCG.
Немецкие контактные пациенты (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	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 кожный туберкулиновый тест (5мм), в то время как 9% и 11% были определены системой QFT-Gold IT как позитивные, соответственно. Система QFT-Gold IT рассматривалась параллельно с риском туберкулёзной болезни. Кожный туберкулиновый тест - только с вакцинацией BCG.

Многие публикации описывают принцип работы менее чувствительных версий системы QuantiFERON®-TB Gold, использующей жидкие антигены, предшественницы QuantiFERON®-TB Gold IT, и теста QuantiFERON®-TB Gold IT. Эти исследования включают использование результатов тестирования лиц, контактных с больными активным туберкулёзом^{9, 11, 19, 25}, с детьми^{6-10, 25, 28}, с позитивными на ВИЧ^{2, 5, 20}, с медицинскими работниками^{13, 26, 32}, с заключёнными^{3, 4, 22, 23, 27, 30, 31}, а также с людьми, имеющими подозрение на туберкулёз,^{7, 8, 10, 18} и с людьми с низким риском заболеваемости¹⁵.

Воспроизводимость и влияние кожного туберкулинового теста на последующий тест системой QuantiFERON®-TB Gold.

При проведении американского исследования на специфичность часть из добровольцев, принявших участие в этом исследовании была заново протестирована спустя 4-5 недель после проведения оригинального теста системой QuantiFERON®-TB Gold IT и кожного туберкулинового теста. Результаты 260 тестов, проведённых с применением системы QuantiFERON®-TB Gold IT, были сравнены с такими же тестами, но проведёнными раньше, уровень согласованности оказался 99.6% (259/260). Кожный туберкулиновый тест, предшествовавший тесту с применением системы QuantiFERON®-TB Gold IT, не повлёк возникновения положительных результатов.

10. ТЕХНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Сомнительные результаты

Получение сомнительных результатов должно явлением быть 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 37°C превышает 16 часов
- Хранение крови проводилось при температуре, не соответствующей рекомендуемой (22°C ± 5°C)
- Недостаточное смешивание содержимого пробирок набора тест-системы
- Нарушение техники промывания планшета при проведении ИФА.

Если причиной сомнительных результатов могли стать либо неправильный забор образцов крови, либо ненадлежащее с ними обращение, повторите тест с новыми образцами крови. В случае некачественной промывки или других отклонений при проведении ИФА (ELISA), анализ должен быть повторён 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 ИФА (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 отцентрифугировать плазму, при этом сгустки превратятся в осадок, что обеспечит свободное пипетирование плазмы.

Возможные проблемы и способы их решения при проведении ИФА (ELISA)

Неспецифическое окрашивание

ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА	СПОСОБЫ УСТРАНЕНИЯ
Неполное промывание планшета.	Промойте планшет как минимум 6 раз промывочным буфером из расчёта 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться большее количество промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно быть не менее 5 сек.
Перекрестное загрязнение лунок при проведении ИФА.	Будьте осторожны при пипетировании и перемешивании компонентов, чтобы свести к минимуму риск загрязнения.
Истечение срока годности компонентов.	Используйте тест-систему до истечения указанного срока эксплуатации. Используйте стандартный раствор и 100- кратный концентрат конъюгата в течение 3 месяцев с момента разведения.
Загрязнение раствора энзим-субстрата.	При обнаружении голубой окраски раствор энзим-субстрата должен быть утилизован, при этом должен быть использован резервуар, не содержащий каких-либо реагентов.

Низкий показатель оптической плотности рабочих стандартов (стандартных разведений)

ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА	СПОСОБЫ УСТРАНЕНИЯ
Ошибка в приготовлении рабочих стандартов.	Обеспечьте правильное приготовление стандартных разведений согласно инструкции.
Ошибка в пипетировании.	Пипетки должны быть проградуированы и использоваться согласно инструкции производителя.
Слишком низкая температура инкубации.	Инкубирование при проведении ИФА (ELISA) должно проходить при комнатной температуре, 17°C - 27°C.
Слишком короткое время инкубации.	Инкубирование планшета с конъюгатом, стандартными разведениями и пробами должно проводиться в течение 120 мин. ± 5 мин. Инкубирование планшета с раствором энзим-субстрата проводится в течение 30 мин.
Использование неподходящего фильтра спектрофотометра.	Луночный планшет должен анализироваться при 450нм с помощью референсного фильтра, установленного на длину волн между 620 и 650нм.
Слишком холодные реагенты.	Перед проведением анализа все реагенты за исключением 100 кратного конъюгата должны быть доведены до комнатной температуры, для этого достаточно одного часа.
Истечение срока годности компонентов.	Используйте тест-систему до истечения указанного срока эксплуатации. Используйте стандартный раствор и 100- кратный концентрат конъюгата в течение 3 месяцев с момента разведения.

Высокий фон

ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА	СПОСОБЫ УСТРАНЕНИЯ
Неполное промывание планшета.	Промойте планшет как минимум 6 раз промывочным буфером из расчёта 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться большее количество промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно быть не менее 5 сек.
Слишком высокая температура инкубации.	Инкубирование при проведении ИФА (ELISA) должно проходить при комнатной температуре, 17°C - 27°C.
Истечение срока годности компонентов.	Используйте тест-систему до истечения указанного срока эксплуатации. Используйте 100- кратный концентрат конъюгата в течение 3 месяцев с момента разведения.
Загрязнение раствора фермент-субстрата.	При обнаружении голубой окраски раствор фермент-субстрата должен быть утилизирован, при этом должен быть использован резервуар, не содержащий каких-либо реагентов.

Отсутствие линейности в калибровочной кривой, вариабельность дубликатов

ВОЗМОЖНАЯ ПРИЧИНА	СПОСОБЫ УСТРАНЕНИЯ
Неполное промывание планшета.	Промойте планшет как минимум 6 раз промывочным буфером из расчёта 400 мкл на каждую лунку. В зависимости от типа промывочной жидкости может понадобиться большее количество промывочных циклов. Время замачивания между промывочными циклами должно быть не менее 5 сек.
Ошибка в приготовлении рабочего стандартного разведения.	Обеспечьте правильное приготовление стандартных разведений согласно инструкции.
Плохое смешивание.	Смешайте реагенты тщательно путем переворачивания или используя вортекс перед внесением на планшет.
Непоследовательная техника пипетизации 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 на CD-ROMе «Информация о продукте и техническое руководство по эксплуатации продукта», который предоставляется компанией Cellestis бесплатно. CD-ROM можно также заказать через Вашего дистрибьютера.

11. БИБЛИОГРАФИЯ

A comprehensive list of QuantiFERON[®]-TB Gold references is located on the Cellestis website (www.cellestis.com)

1. **Andersen, P., et al.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. **Balcells, M.E., et al.** A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis.* 2008. 12; 645-52.
3. **Bartalesi, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2008. [Epub ahead of print].
4. **Bocchino, M., et al.** Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008. 27; 907-13.
5. **Brock, I., et al.** Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res.* 2006. 7; 56.
6. **Chun, J.K., et al.** The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008. [Epub ahead of print].
7. **Connell, T.G., et al.** A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. **Detjen, A.K., et al.** Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007. 45; 322-8.
9. **Diel, R., et al.** Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2008. [Epub ahead of print].
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2008. [Epub ahead of print].
17. **Kang, Y.A., et al.** Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA.* 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.
22. **Manuel, O., et al.** Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007. 7; 2797-801.

13. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ТЕСТА

1. ЭТАП: ИНКУБИРОВАНИЕ ОБРАЗЦА КРОВИ

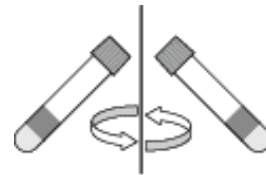
1. Взять у пациента пробу крови в вакуумную пробирку для забора крови и тщательно перемешать её, **сильно встряхивая в течение 5 секунд** (или встряхнуть её 10 раз). Вся внутренняя поверхность пробирки должна быть покрыта кровью.



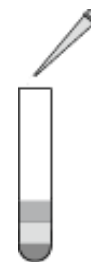
2. Инкубировать пробирки **в вертикальном положении** в течение 16–24 часов при 37 °С.



3. После инкубирования пробирки центрифугируют в течение 5-15 минут при 2000 – 3000 g (ОСЦ), для того чтобы отделить плазму от форменных элементов.

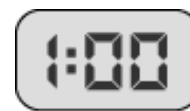


4. После центрифугирования отобрать из каждой пробирки образец плазмы для определения количества гамма-интерферона.



2. ЭТАП: ИФА для выявления гамма-интерферона

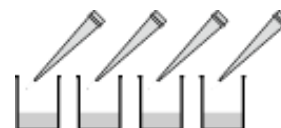
1. Все компоненты для ИФА (кроме 100-кратного концентрата конъюгата) выдержать при комнатной температуре как минимум 60 минут.



2. Сухой стандартный рекомбинантный человеческий гамма-интерферон развести деионизированной или дистиллированной водой до концентрации 8,0 МЕ/мл. Приготовить 4 рабочих стандартных разведения.

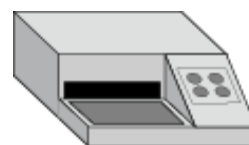


3. Развести 100-кратный лиофилизированный концентрат конъюгата деионизированной или дистиллированной водой.

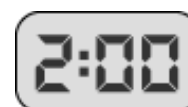


4. Развести конъюгат зелёным растворителем и внести по 50 мкл в каждую лунку.

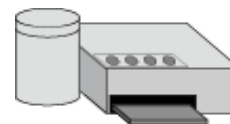
5. Внести 50 мкл каждой пробы плазмы и 50 мкл каждого стандартного раствора в соответствующие лунки. Перемешать с помощью встряхивателя.



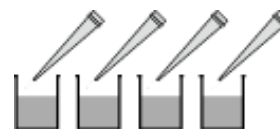
6. Инкубировать при комнатной температуре в течение 120 минут.



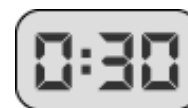
7. Не менее 6 раз промыть лунки промывочным буферным раствором (400 мкл на каждую лунку).



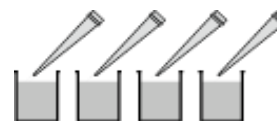
8. Внести по 100 мкл раствора энзим-субстрата в каждую лунку.



9. Инкубировать 30 минут при комнатной температуре.



10. Внести в каждую лунку по 50 мкл стоп-реагента. Перемешать с помощью встряхивателя.



11. Измерить результат реакции, используя фильтр на 450 нм и референсный фильтр 620-650 нм.



12. Проанализировать результаты.





Изготовлено для:
Cellestis Limited (Австралия) и Cellestis GmbH (Европа)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia
Тел.:+61 3 9571 3500, (Европа) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Страница в интернете: www.cellestis.com

Номер документа: 05990301C
August 2009

EC	REP
----	-----



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Germany