

QuantiFERON[®] - TB **Gold**

IFN - пълнен кръвен гама тест, измерващ реакциите към пептидните антигени ESAT-6, CFP-10 & TB7. 7 (p. 4)

РЪКОВОДСТВО

За “ин-витро” диагностична употреба



СЪДЪРЖАНИЕ

| | | |
|-----|--|----|
| 1. | Предназначение..... | 2 |
| 2. | Резюме и описание на теста..... | 2 |
| | Принцип на теста..... | 3 |
| | Необходимо време за извършване на теста..... | 3 |
| 3. | Реактиви и съхранение..... | 4 |
| | Необходими материали (непредоставени в кита)..... | 4 |
| | Указания за съхранение..... | 5 |
| | Епруветки за събиране на кръв..... | 5 |
| | Реактиви, включени в кита..... | 5 |
| | Разтворени и неизползвани реактиви..... | 5 |
| 4. | Предупреждения и предпазни мерки..... | 6 |
| | Предупреждения..... | 6 |
| | Предпазни мерки..... | 7 |
| 5. | Събиране и боравене с пробите..... | 8 |
| 6. | Указания за употреба..... | 9 |
| | Първа фаза: Инкубиране на кръвта и събиране на плазма..... | 9 |
| | Втора фаза : Отчитане на IFN- γ в ELISA..... | 10 |
| 7. | Изчисления и интерпретация на теста..... | 13 |
| | Създаване на стандартна крива..... | 13 |
| | Качествен контрол на теста..... | 14 |
| | Интерпретация на резултатите..... | 15 |
| 8. | Ограничения..... | 19 |
| 9. | Характеристика на резултатите..... | 19 |
| 10. | Техническа информация..... | 21 |
| | Неопределени резултати..... | 21 |
| | Проби със съсиреци в плазмата..... | 21 |
| | Проблеми при отчитането на ELISA..... | 22 |
| | Неспецифична промяна на цвета..... | 22 |
| | Ниска оптична плътност на стандартите..... | 22 |
| | Висок фон..... | 23 |
| | Нелинейна стандартна крива и двойна променлива..... | 23 |
| 11. | Библиография..... | 24 |
| 12. | Техническо обслужване..... | 26 |
| 13. | Съкратена процедура на теста..... | 27 |
| 14. | Важни промени | 30 |

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Квантиферон-ТБ Голд (QFT[®]) в епруветка е диагностичен «ин-витро» тест, който използва пептиден коктейл, симулиращ специфичните протеини ESAT-6, CFP-10 и TB7.7 (p4), които стимулират лимфоцитите в хепаринизирана цяла кръв. Откриването на интерферон-гама (IFN- γ) чрез ензим-свързан имуносорбентен тест (ELISA), се използва за идентифициране в *in-vitro* условия на отговорите към тези пептидни антигени, свързващи се с инфекция, причинена от *Mycobacterium tuberculosis*. QFT е тест за индиректно доказване на инфекция с *M. tuberculosis* (включително и туберкулозно заболяване), и е предназначен за употреба в комбинация с изследвания, като оценка на риска, рентгенография и други медицински и диагностични методи.

2. РЕЗЮМЕ И ОБЯСНЕНИЕ НА ТЕСТА

Туберкулозата е заразно заболяване, причинено от микобактерии, влизащи в състава на *M. tuberculosis* (MTB) комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), които се разпространяват главно по въздушно капков път, от пациенти с туберкулоза на дихателната система. Новоинфектираният индивид може да заболее от туберкулоза след седмици или месеци, но повечето инфектирани остават в добро общо състояние. Латентната туберкулозна инфекция (ЛТБИ) е незаразно безсимптомно състояние, персистиращо при някои пациенти, които могат да развият туберкулозно заболяване след месеци или години. Навременното диагностициране на ЛТБИ дава възможност да се предвиди съответното лечение, с цел предотвратяване развитието на туберкулозно заболяване. До неотдавна, туберкулиновият кожен тест (ТКТ) беше единственият съществуващ метод за диагностициране на ЛТБИ. Кожната чувствителност към туберкулин се развива в рамките на 2 до 10 седмици след инфектиране с *M. tuberculosis*. Някои инфектирани индивиди обаче, включително такива с широк спектър от състояния, затрудняващи имунната функция, както и други без подобни състояния, не отговарят на туберкулин. Противоположно на тях, някои индивиди, за които не е вероятно да са инфектирани с *M. tuberculosis*, след БЦЖ ваксинация, инфекция с микобактерии, различни от тези в MTB комплекса, или при неопределени други фактори, показват чувствителност към туберкулин и реагират с положителни ТКТ резултати.

ЛТБИ трябва да се разграничава от туберкулозното заболяване, при което обичайно се ангажира белият дроб и долните дихателни пътища, въпреки, че може да бъдат засегнати и други органи и системи. Туберкулозното заболяване се диагностицира чрез анамнестични, физикални, рентгенови, хистологични и микробиологични находки.

QFT е тест за клетъчно-медирирани имунни (КМИ) отговори към пептидните антигени, които имитират микобактериалните протеини. Тези протеини, ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4) отсъстват от всички БЦЖ щамове и от повечето негуберкулозни микобактерии с изключение на *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*¹. Индивидите, инфектирани с организми от *M. tuberculosis* комплекс имат обикновено в кръвта си лимфоцити, които разпознават тези и други микобактериални антигени. Този процес на разпознаване включва образуване и секреция на цитокина IFN- γ . Откриването и последващото количествено определяне на IFN- γ е в основата на този тест.

Антигените, използвани в QFT, представляват пептиден коктейл, симулиращ протеините ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4). Многобройни проучвания показват, че тези пептидни антигени стимулират IFN- γ -отговори в Т клетките на индивиди, инфектирани с *M. tuberculosis*, но не и в неинфектирани или ваксинирани с БЦЖ индивиди, които не са болни и нямат риск за наличие на ЛТБИ.¹⁻³⁴ Медикаментозно лечение или определени състояния, които потискат имунната система, потенциално могат да понижат IFN- γ - отговорите. Пациенти с други микобактериални инфекции също биха могли да отговорят на ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4) антигените, тъй като гените, кодиращи тези протеини, присъстват в *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*.^{1,22} QFT е тест едновременно за ЛТБИ и полезно средство за диагностика на пациенти с активна туберкулозна болест. Положителният резултат подкрепя диагнозата туберкулоза; все пак, инфекция с други микобактерии (напр. *M. kansasii*), може също да покаже положителни резултати. Необходими са и други медицински и диагностични оценки, за да се потвърди или изключи туберкулозното заболяване.

ПРИНЦИПИ НА ТЕСТА

QFT тестът използва специални епруветки за кръв, в които се събира цяла кръв. Инкубирането на кръвта се извършва в епруветките за 16 до 24 часа, след което се събира плазмата и се тества за наличие на IFN- γ , произведен в отговор на пептидните антигени.

QFT тестът се извършва в два етапа. Първо, кръвта се събира във всяка една от трите QFT епруветки, които включват една контролна епруветка, епруветка със специфични ТБ антигени и епруветка с Митоген.

Митогеновата епруветка се използва в QFT теста като положителна контрола. Това може да даде допълнителна сигурност, когато има съмнение за имунния статус на индивида. Епруветката с Митоген служи също и като контрола за правилното инкубиране и боравене с кръвта.

Епруветките трябва да се инкубират при 37°C, колкото е възможно по-скоро и до 16 часа след събирането на кръвта. След инкубиране от 16 до 24 часа, епруветките се центрофугират, плазмата се отделя и количеството IFN- γ (IU/ml) се измерва в ELISA.

Тестът се счита за положителен, когато IFN- γ - отговорът в Епруветката с ТБ антигените е значително над стойността на IFN- γ (IU/ml) в Нулевата (контролна) епруветка. Стимулираната с Митоген плазма служи като положителна IFN- γ контрола за всяка изследвана проба. Нисък отговор към Митоген (< 0.5 IU/ml) показва неопределен резултат, когато кръвната проба отговаря отрицателно и към ТБ антигените. Тази възможност може да се получи при недостатъчен брой лимфоцити, намалена лимфоцитна активност поради неправилно боравене с пробата, като неправилно пълнене/смесване на епруветката с Митоген, или неспособност на лимфоцитите на пациента да произведат IFN- γ . Нулевата проба е показател за фона, ефектите на хетерофилните антитела, или неспецифично продуцирания IFN- γ в кръвните проби. Нивото на IFN- γ в Нулевата проба трябва да се извади от нивото на IFN- γ в епруветката с ТБ-специфичните антигени, и в епруветката с Митоген.

Време, необходимо за извършване на теста

Времето, необходимо за извършване на QFT тест е определено по-долу; времето за тестване на повече проби, обособени в партида също е показано.

37°C Инкубиране на епруветките с кръв: 16 - 24 часа

ELISA:

Около 3 часа за 1 ELISA плака

(28 до 44 пациента)

< 1 час работа

- Добавете по 10 - 15 минути за всяка допълнителна плака

3. РЕАКТИВИ И СЪХРАНЕНИЕ

Събиране на кръв в туберкулозни и контролни епруветки

Каталожен номер T0590-0301

- | | |
|---|-----------------|
| 1. Нулева контрола (сива капачка) | 100 x епруветки |
| 2. ТБ антиген (червена капачка) | 100 x епруветки |
| 3. Митогенова контрола (лилава капачка) | 100 x епруветки |

ЗАБЕЛЕЖКА: Предлагат се и епруветки в други конфигурации :

Кат. № T0590-0201: 100 x Нулева контрола, 100 x ТБ- антиген епруветки

Кат. № T0593-0201: 100 x Митоген-контроли епруветки

Епруветки за висока надморска височина (вж. Раздел 5)

Кат. № T0590-0501: (Висока надморска височина) 100 x Нулева контрола, 100 x ТБ- антиген епруветки

Кат. № T0590-0505: (Висока надморска височина) 100 x Нулева контрола, 100 x ТБ- антиген епруветки & 100 x Митоген- контроли епруветки

Кат. № T0593-0501: (Висока надморска височина) 100 x Митоген-контроли епруветки

| Компоненти на ELISA | Каталожен No: 0594-0201 | Каталожен No: 0594-0501 |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | Комплект 2 плаки | Комплект за референтна лаборатория |
| Стрипове в микроплаката, покрити с миши моноклонални антитела срещу човешки IFN- γ | 2 x 96 кладенчета | 20 x 96 кладенчета |
| Човешки IFN- γ стандарт, лиофилизиран (съдържа рекомбинантен човешки IFN- γ , говежди казеин, 0,01% w/v тимерозал) | 1 флакон (8 IU/ ml след разтваряне) | 10 флакона (8 IU/ ml след разтваряне) |
| Зелен разредител (съдържа говежди казеин, нормален миши серум, 0,01% w/v тимерозал) | 1 x 30 ml | 10 x 30 ml |
| Конюгат 100X концентрат, лиофилизиран (миши HRP срещу човешки IFN- γ , съдържа 0,01% w/v тимерозал) | 1 x 0.3 ml (след разтваряне) | 10 x 0.3 ml (след разтваряне) |
| Буфер за промиване 20X концентрат (pH 7.2, съдържа 0,01% w/v тимерозал) | 1 x 100 ml | 10 x 100 ml |
| Ензим Субстратен Разтвор (съдържа H ₂ O ₂ , 3,3',5,5'- тетраметилбензидин) | 1 x 30 ml | 10 x 30 ml |
| Ензим Стопиращ Разтвор (съдържа 0,5M H ₂ SO ₄) | 1 x 15 ml | 10 x 15 ml |

Необходими материали (недоставени с кита)

- Инкубатор на 37°C. Не се изисква CO₂.
- Калибрирани пипети с променлив обем от 10 µl до 1000 µl, с накрайници, за еднократна употреба.
- Калибрирана многоканална пипета, която измерва 50 µl и 100 µl, с накрайници, за еднократна употреба.
- Машина за разклащане (Шейкър) на микроплаките.
- Дейонизирана или дестилирана вода – 2L.
- Машина за измиване на микроплаките (препоръчва се автоматична машина).
- Отчитащо устройство за микроплаките с филтър 450 nm и референтен филтър 620 nm до 650 nm.

Указания за съхранение

Епруветки за събиране на кръв

- Епруветките за събиране на кръв да се съхраняват при температура 4-25°C.

Реактиви в кита

- Съхранявайте кита при 2°C до 8°C.
- Разтвореният Ензим Субстрат винаги да се пази от директна слънчева светлина.

Разтворени и неизползвани реактиви

За указания как да разтворите реактивите вижте Раздел 6. (стр.11).

- Разтворените Стандарти на Кита могат да се използват до 3 месеца, ако се съхраняват при температура 2°C до 8°C.
 - *Запишете датата на разтваряне на Стандартите на Кита.*
- След като е разтворен, неизползваният концентрат на Конюгат 100X трябва да се съхранява при 2°C до 8°C, и също трябва да се използва до 3 месеца.
 - *Отбележете датата, когато е разтворен Конюгатът.*
- Конюгатът в работна концентрация, трябва да се използва до 6 часа след приготвянето му.
- Буферът за промиване в работна концентрация може да се съхранява при стайна температура до 2 седмици.

4. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

Предупреждения

- Отрицателният QFT резултат не изключва възможността от инфекция с *M. tuberculosis* или туберкулозно заболяване: фалшиво отрицателните резултати могат да се дължат на стадия на инфекцията (напр. пробата е взета преди развитието на клетъчен имунен отговор), едновременно протичащи заболявания, които засягат имунните функции, неправилно боравене с епруветките за събиране на кръв след пунктиране на вената, неправилно извършване на теста или други имунологични променливи.
- Положителният QFT резултат не трябва да бъде единствената определяща база за доказване на инфекция с *M. tuberculosis*. Неправилното извършване на теста може да доведе до фалшиви положителни отговори.
- Положителният QFT резултат трябва да бъде последван от медицински преглед и диагностична оценка за активно туберкулозно заболяване (микробиологично изследване: директна микроскопия на намазка, посевка на съответен материал, рентгенография на бял дроб).
- Тъй като ESAT-6, CFP-10 и TB 7.7(p4) отсъстват от всички БЦЖ щамове и от повечето известни не-туберкулозни микробактерии, е възможно положителният QFT резултат да се дължи на инфекция от *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*. Ако се подозират такива инфекции, трябва да се извършат алтернативни изследвания.

Предпазни мерки

- **Употреба само за “ин-витро” диагностика.**
- **Вредно: Ензим Субстрат разтворът** съдържа 3, 3', 5, 5' Тетраметилбензидин, който е вреден при поглъщане, вдишване или контакт с кожата. Дразни кожата и очите. Мутаген е. Използвайте защита за очите, носете ръкавици и боравете както с потенциален карциноген.
- **Вредно: Ензим Стопиращ разтвор** съдържа сярна киселина (H₂SO₄), която е вредна при поглъщане, контакт с очите и кожата, вдишване. Трябва да се използва защита на очите, да се носят ръкавици и нормално защитно лабораторно облекло. Ако този разтвор влезе в контакт с кожата или очите, трябва да се изплакне с голямо количество вода и да се потърси лекарска помощ.
- **Вредно: IFN-γ Стандарт и Конюгат 100X концентрат** е неприятен при поглъщане и може да предизвика дразнене на кожата. Трябва да се носят ръкавици и нормално защитно облекло.
- **Боравете с човешката кръв като с потенциално инфекциозен материал.** Спазвайте основните правила за боравене с кръв.
- **Тимерозал** се използва като консервант в някои реактиви. Той може да е токсичен при поглъщане, вдишване или контакт с кожата.
- **Зеленият разредител** съдържа нормален миши серум и казеин, които могат да отключат алергични реакции; избягвайте контакт с кожата.
- Отклоненията от указанията за употреба в това ръководство може да доведат до грешни резултати. Моля, прочетете внимателно указанията преди употреба.
- Не използвайте кита, ако някой от флаконите изглежда повреден или е протекъл преди употреба.
- Не смесвайте и не използвайте ELISA реактиви от различни партии QFT китове.
- Изхвърлете неизползваните реактиви и биологични проби в съответствие с местните разпоредби за безопасна работа.
- Не използвайте епруветките за събиране на кръв или ELISA китове след изтичане на срока на годност.
- Уверете се, че лабораторното оборудване като машината за измиване на плаките и устройството за отчитане са калибрирани / проверени за употреба.

5. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И БОРАВЕНЕ С ТЯХ

QFT използва следните епруветки за събиране :

1. Нулева контрола (сива капачка) (използвайте между морското равнище и 810 м.)
2. ТБ антигени (червена капачка) (използвайте между морското равнище и 810 м.)
3. Митогенова контрола (лилава капачка с бял пръстен) (използвайте между морското равнище и 810 м.)
4. Нулева контрола (сива капачка с жълт пръстен) (използвайте между 1,020 м. и 1,875 м.)
5. ТБ антигени (червена капачка с жълт пръстен) (използвайте между 1,020 м. и 1,875 м.)
6. Митогенова контрола (лилава капачка с жълт пръстен) (използвайте между 1,020 м. и 1,875 м.)

Антигените са изсушени по цялата вътрешна стена на епруветките за събиране на кръв, така че е важно съдържанието на епруветките да се смеси добре с кръвта. Епруветките трябва да се прехвърлят в инкубатор на 37°C, колкото е възможно по-скоро, до 16 часа от взимането на кръвта.

Трябва да се спазват следните процедури за оптимални резултати:

1. От всеки индивид се взима по 1 ml кръв чрез пунктиране на вена директно във всяка от епруветките за събиране на кръв на QFT. Тази процедура трябва да се извършва от обучен флеботомист.
 - Стандартни QFT епруветки трябва да се използват до надморска височина от 810 метра. QFT епруветките за висока надморска височина трябва да се използват при височина над 810 метра.

Ако се използват QFT епруветки извън тези височини или ако се появи ниско налягане при изтеглянето на кръв, кръвта може да се изтегли със спринцовка и по 1ml от нея да бъде прехвърлен след това във всяка от трите епруветки. С оглед на безопасната работа, това се прави най-добре ако се отстрани иглата от спринцовката, махне се капачката на QFT епруветката и се добави 1ml кръв към всяка от епруветките (до черната отметка отстрани на епруветката). Върнете внимателно обратно капачката и разклатете както е описано по-долу.
 - Тъй като 1 ml епруветка изтегля кръвта относително бавно, оставете епруветката на иглата 2-3 секунди след като е изцяло напълнена за да е сигурно, че е изтеглен необходимият обем.

Черната отметка отстрани на епруветката показва 1 ml обем . Епруветките за събиране на кръв на QFT са предназначени за обеми от порядъка на 0.8-1. 2 ml. Ако нивото на кръвта в някоя епруветка не е близо до индикаторната линия, се препоръчва да се вземе друга кръвна проба.
 - Ако се използва “игла бъртерфлай” за взимане на кръвта, трябва да е сигурно, че тръбичката е пълна с кръв преди да се използват епруветките на QFT.
2. Веднага след като напълните епруветките, ги разклатете десет (10) пъти дотолкова силно, че цялата вътрешна повърхност на епруветката със сигурност да се покрие с кръв и антигените по стените да се разтворят.
 - Епруветките трябва да са с температура 17-25°C в момента на пълнене.
 - Прекалено енергичното разклащане може да предизвика повреда на гелообразната утайка и да доведе до неточни резултати.
3. Надпишете епруветките съответно.
4. Епруветките трябва да се прехвърлят в инкубатор на 37°C ±1°C, колкото е възможно по-бързо и до 16 часа от взимане на кръвта. Преди инкубацията съхранявайте епруветките на стайна

температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Кръвните проби не трябва да се поставят в хладилник или да се замразяват.

6. УКАЗАНИЯ ЗА УПОТРЕБА

Първа фаза – Инкубиране на кръвта и събиране на плазма

Предоставени материали

QFT епруветки за събиране на кръв (виж Раздел 3)

Необходими материали (непредоставени)

Виж Раздел 3

Процедура

1. Ако кръвта не се инкубира веднага след вземането, **смесването на епруветките чрез обръщане 10 пъти трябва да се извърши непосредствено преди инкубирането.**
2. Инкубирайте епруветките **ИЗПРАВЕНИ** при 4°C до 37°C за 16-24 часа. Инкубаторът не се нуждае от CO_2 или от овлажняване.
3. След инкубиране при 37°C , епруветките за събиране на кръв може да се държат при температура $2-27^{\circ}\text{C}$ до 3 дни преди центрофугирането.
4. След инкубиране на епруветките при 37°C , събирането на плазмата се улеснява чрез центрофугиране на епруветките за 15 минути при 2000 до 3000 RCF (g). Гелообразната утайка отделя клетките от плазмата. Ако това не стане, епруветките трябва да се центрофугират повторно при по-висока скорост.
 - Възможно е да се получи плазма без центрофугиране, но е необходимо повече внимание за да се отдели плазмата без да се засегнат клетките.

След центрофугиране, непременно избягвайте пипетирането нагоре и надолу или смесването на плазмата, преди събирането и. През цялото време внимавайте да не повредите материала на повърхността на гелообразната утайка.

- Плазмените проби трябва да бъдат извлечени **с помощта на пипета.**
- Плазмените проби могат да се зареждат директно от центрофугираните епруветки за събиране на кръв в QFT плака ELISA, включително когато се използват автоматизирани работни станции ELISA.
- Плазмените проби могат да бъдат съхранявани за период до 28 дни при 2°C до 8°C или, след събирането им, под -20°C за по-продължителен период.

Втора фаза – Човешка IFN-γ- ELISA

Предоставени материали

QFT ELISA кит (виж Раздел 3)

Необходими материали (не предоставени)

Виж Раздел 3

Процедура

1. Всички плазмени проби и реактиви, освен Конюгат 100X Концентрат трябва да се темперират на стайна температура ($22^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$) преди употреба. Трябват поне 60 минути за темпериране.
2. В момент на работа извадете стриповете, които не са необходими от рамката, запечатайте ги отново с фолиото и ги върнете в хладилника за съхранение.

Оставете поне един стрип за QFT Стандарти и достатъчно стрипове, съобразени с броя пациенти, които ще се тестват (виж фиг.2А и 2В за формат с 2 епруветки и 3 епруветки съответно). След употреба върнете рамката и капака, за да се използват с останалите стрипове.

3. Разтворете лиофилизирания Кит Стандарт с необходимия обем, означен върху етикета на флакона, дейонизирана или дестилирана вода със Стандарта. Разбъркайте леко за да сведете до минимум образуването на пяна и да осигурите пълно разтваряне. Разтварянето на Стандарта до обявения обем дава разтвор с концентрация 8.0 IU/ml.

ЗАБЕЛЕЖКА: Обемът за разтваряне на Кит Стандарта се различава при различните партиди.

Използвайте разтворения Кит Стандарт, за да получите серии от 1 до 4 разреждания на IFN-γ със Зеления Разреждател (ЗР) - виж Фиг.1. S1 (Стандарт1) съдържа 4 IU/ml, S2 (Стандарт 2) съдържа 1 IU/ml, S3 (Стандарт 3) съдържа 0.25 IU/ml и S4 (Стандарт4) съдържа 0 IU/ml (само ЗР). Трябва да се работи поне с двойни стандарти.

Препоръчана процедура за двойни стандарти

- А/ Означете 4 епруветки като “S1”, “S2”, “S3”, “S4”
- б/ прибавете по **150 µl** ЗР в S1, S2, S3, S4
- В/ прибавете **150 µl** от Кит Стандарт в S1 и
- с есете добре
- Г/ прехвърлете **50 µl** от S1 в S2 и смесете добре
- Д/ прехвърлете **50 µl** от S2 в S3 и смесете добре

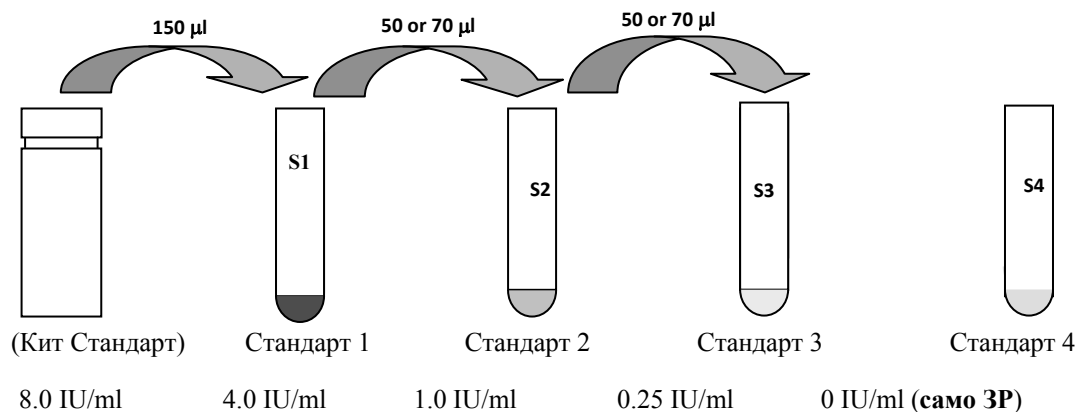
Препоръчана процедура за тройни стандарти

- а/ Означете 4 епруветки “S1”, “S2”, “S3”, “S4”
- б/ прибавете **150 µl** ЗР към S1,
- в/ прибавете **210 µl** ЗР към S2, S3, S4
- г/ прибавете **150 µl** от Кит Стандарт
- към S1 и смесете добре
- д/ прехвърлете **70 µl** от S1 в S2 и смесете добре
- е/ прехвърлете **70 µl** от S2 в S3 и смесете добре

Е/ епруветка **само ЗР** служи като нулев стандарт (S4)

ж/ **само ЗР** служи като нулев стандарт (S4)

Фиг. 1 Приготвяне на Стандартна Крива



- Пригответе пресни разреждания на Кит Стандарта за всяко извършване на ELISA
4. Разтворете лиофилизирания Конюгат 100X Концентрат с 0.3 ml дейонизирана или дестилирана вода. Смесето леко, за да сведете до минимум образуването на пяна и конюгатът да се разтвори напълно.

Конюгат с Работна Концентрация се приготвя чрез разреждане на необходимото количество разтворен Конюгат 100X Концентрат в Зеления Разтворител, както е показано в таблица 1 – Приготвяне на Конюгата.

Таблица 1. Приготвяне на Конюгата.

| Брой стрипове | Обем Конюгат 100X Концентрат | Обем Зелен Разтворител |
|---------------|------------------------------|------------------------|
| 2 | 10 µl | 1.0 ml |
| 3 | 15 µl | 1.5 ml |
| 4 | 20 µl | 2.0 ml |
| 5 | 25 µl | 2.5 ml |
| 6 | 30 µl | 3.0 ml |
| 7 | 35 µl | 3.5 ml |
| 8 | 40 µl | 4.0 ml |
| 9 | 45 µl | 4.5 ml |
| 10 | 50 µl | 5.0 ml |
| 11 | 55 µl | 5.5 ml |
| 12 | 60 µl | 6.0 ml |

- Смесете добре, но леко, за да избегнете разпенването
 - Върнете неизползвания Конюгат 100X Концентрат на 2-8°C веднага след използването му.
 - Използвайте само Зеления Разредител (ЗР)
5. Плазмени проби, събрани в епруветки за събиране на кръв и преди теста са замразени или съхранявани за повече от 24 часа, трябва да се размесят добре преди да се поставят в ELISA кладенчето.

- Ако плазмените проби се добавят директно от центрофугираните QFT епруветки, всяко смесване на плазмата трябва да бъде избегнато.
6. Прибавете 50 µl прясно приготвен Конюгат с Работна Концентрация към съответните кладенчета на ELISA като използвате многоканална пипета.
 7. Прибавете 50 µl от плазмените проби към съответните кладенчета, като използвате многоканална пипета (Виж препоръчаното разполагане на плаката по-долу- фигури 2А и 2В). Накрая, прибавете 50 µl от всеки от Стандартите от 1 до 4 в съответните кладенчета.

Фигура 2А – Препоръчително разполагане на пробите за Нулевата и ТБ антигенни епруветки (44 теста на плака)

| | 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 (проба 1. Нулева контролна плазма); 1A (проба 1. ТБ антигени плазма)

Фигура 2В – Препоръчително разполагане на пробите за Нулевата , ТБ антигенна и Митогенни епруветки(28 теста на плака)

| | 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 |

- S1 (Стандарт 1), S2 (Стандарт 2), S3 (Стандарт 3), S4 (Стандарт 4)
 - 1N (проба 1. Нулева контролна плазма); 1A (проба 1. ТБ антигени плазма); 1M (проба 1. Плазма с Митогенен контрол)
8. Смесете конюгата и плазмените проби/стандарти за 1 минута като използвате шейкър машина за микроплаки
 9. Покрийте всяка плака с капак и инкубирайте при стайна температура ($22^{\circ} \pm 5^{\circ}$) за 120 ± 5 минути.
 - Плаките не трябва да се излагат на пряка светлина по време на инкубацията.
 10. По време на инкубирането, разрежете една част Буфер за промиване 20X Концентрат с 19 части дейонизирана или дестилирана вода и разбъркайте добре. Предоставено е достатъчно количество Буфер за промиване 20X Концентрат, за да се приготвят 2 L Буфер за промиване с работна концентрация.

Промийте кладенчетата с **400 µl** Буфер с Работна Концентрация най-малко 6 цикъла. Препоръчва се автоматична измиваща машина за плаки.

 - Доброто измиване е много важно за извършване на теста. Трябва да сте сигурни, че всяко кладенче е **изцяло пълно** с промивен буфер до върха на кладенчетата за всеки

цикъл на измиване (положителен менискус). Препоръчва се между всеки цикъл да има поне 5 секунди покой.

- Ако се използва автоматична машина за измиване. Към отпадния резервоар трябва да се прибави стандартен лабораторен дезинфектант и да се извършат обичайните процедури за деконтаминиране на потенциално инфекциозен материал.

11. Изтръскайте обърнатата надолу плака върху абсорбиращ лигнин за да се отстрани остатъчния промивен буфер. Прибавете 100 μ l от Ензимния Субстрат Разтвор във всяко кладенче и смесете добре като използвате шейкърна машина за микроплаки.

12. Покрийте плаката с капак и инкубирайте при стайна температура ($22^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$) за 30 минути.

- Плаките не трябва да се излагат на пряка светлина по време на инкубацията.

13. След периода на инкубиране от 30 минути, прибавете 50 μ l от Ензим Стопиращия Разтвор към всяко кладенче и разбъркайте.

- Ензим Стопиращият Разтвор трябва да се прибавя към кладенчетата в същия ред и приблизително със същата скорост както субстрата в стъпка 11.

14. Измерете Оптичната Плътност (ОП) на всяко кладенче до 5 минути след спиране на реакцията, като използвате отчитащо устройство с филтър 450 nm и референтен филтър 620 nm до 650 nm. ОП стойностите се използват за изчисление на резултатите.

7. ИЗЧИСЛЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА ТЕСТА

QFT софтуер, който се използва за анализ на необработените данни и изчисление на резултатите, се предлага от Cellestis. (Уверете се, че ползвате най-новата версия на този софтуер!)

Софтуерът извършва Контролна Оценка на Качеството на теста, създава стандартна крива и дава резултат за всеки индивид, както е описано подробно в раздела Интерпретиране на резултатите.

Като алтернатива на използването на софтуер за анализ на QFT, резултатите може да се изчислят по следния метод:

Създаване на Стандартна крива

(Ако не се използва софтуер за анализ на QFT)

Определят се средните ОП стойности на двойките от Стандарта върху всяка плака.

Постройте $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ стандартна крива чрез нанасяне на $\log_{(e)}$ от средните ОП върху ордината (y) срещу $\log_{(e)}$ на IFN- γ концентрацията на стандартите в IU/ml абсциса (x), изпускайки нулевия стандарт от тези изчисления. Изчислете линията на най-доброто прилагане на стандартната крива чрез регресионен анализ.

Използвайте стандартната крива за да определите концентрацията на IFN- γ (IU/ml) за всяка от тестваните плазмени проби, като използвате ОП стойността на всяка проба.

Тези изчисления могат да се извършат като се използват софтуерните пакети, предлагани с отчитащите устройства на микроплаките и стандартни разширени листове или статистически софтуер (Microsoft Excel). Препоръчва се тези пакети да се използват за изчисления на регресионния анализ, коефициента на вариация (% CV) за стандартите и корелационен коефициент (r) на стандартната крива.

Качествен контрол на теста

Точността на резултатите на теста зависи от правилното построяване на стандартната крива. Затова резултатите, получени от стандартите трябва да се проучат преди да се интерпретират резултатите от тестваните проби.

За да бъде валидна ELISA:

- **средната (ОП) стойност на Стандарт 1 трябва да бъде ≥ 0.600 .**
- **% CV за двойките ОП стойности Стандарт 1 и Стандарт 2 трябва да бъде ≤ 15 %.**
- **Двойките ОП стойности за Стандарт 3 и Стандарт 4 не трябва да се различават с повече от 0.040 единици оптична плътност (ОП) от средната им стойност.**
- **Корелационният коефициент (r), изчислен от средните абсорбционни стойности на стандартите трябва да бъде ≥ 0.98 .**

Софтуерът за анализ на QFT изчислява и дава тези параметри на качествения контрол.

Ако горните критерии не са спазени, изследването е невалидно и трябва да се повтори.

- **Средната ОП стойност на Нулевия стандарт (само Зелен разредител) трябва да бъде ≤ 0.150 . Ако средната ОП стойност е > 0.150 трябва да се провери процедурата за измиване на плаката.**

Интерпретация на резултатите

QFT резултатите се интерпретират като се използват следните критерии :

ЗАБЕЛЕЖКА: Диагностицирането или изключването на туберкулозно заболяване и оценката на възможността за ЛТБИ, изисква комбинация от епидемиологични, анамнестични, медицински и диагностични находки, които трябва да се имат предвид при интерпретиране на резултатите на QFT.

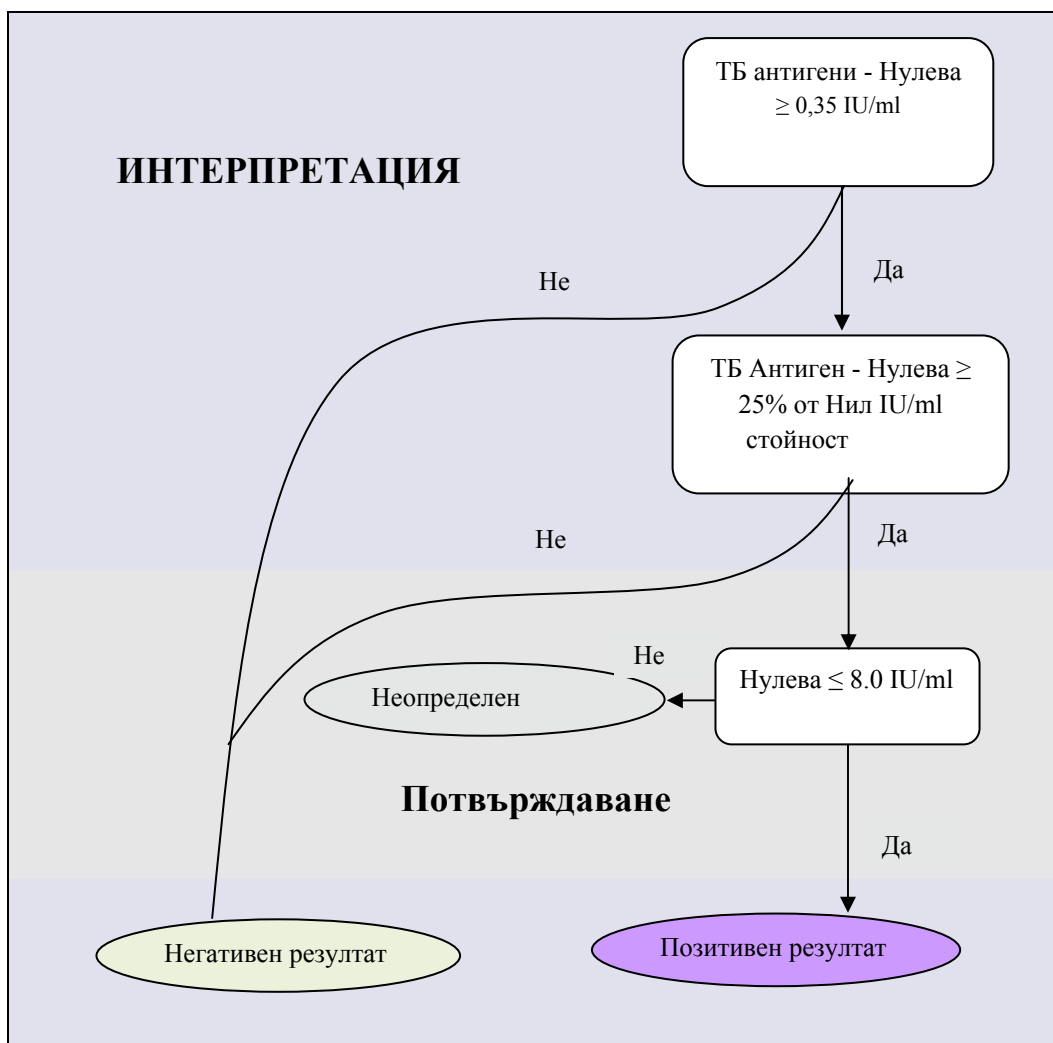
КОГАТО СЕ ИЗПОЛЗВАТ САМО НУЛЕВА И ТБ АНТИГЕН ЕПРУВЕТКА

| Нулева [IU/ml] | ТБ антиген минус Нулева [IU/ml] | QFT резултат [IU/ml] | Резултат/Интерпретация |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---|
| ≤ 8.0 | < 0.35 | Отрицателен | Инфекция с <i>M. tuberculosis</i> НЕ е вероятна |
| | ≥ 0.35 and < 25% от нулевата стойност | | |
| | ≥ 0.35 and ≥ 25% от нулевата стойност | Положителен ¹ | Инфекция с <i>M. tuberculosis</i> е вероятна |
| > 8.0 ² | Каквато и да е | Неопределен ³ | Резултатите са неопределени за отговора към ТБ антигените |

1. Когато не се подозира инфекция от *M. tuberculosis*, първоначалният положителен резултат може да се потвърди чрез повторно изпитване на оригиналната плазмена проба – дублирана за сигурност, с QFT ELISA. Ако повторното тестване на едната или двете проби е положително, трябва да се счита, че индивидът е с положителен тест.
2. При клиничните изпитвания по-малко от 0.25 % от участниците имат IFN-γ- нива от > 8.0 IU/ml за Нулевата контрола.
3. Обърнете се към Раздела за проблеми за възможните причини.

Големината на измереното IFN-γ- ниво, не е в корелация със стадия или степента на инфекцията, нивото на имунния отговор или вероятността за прогресиране към активно заболяване.

Фигура 3 - Интерпретация на диаграма, когато се използват Нулеви и ТБ антигенни епруветки

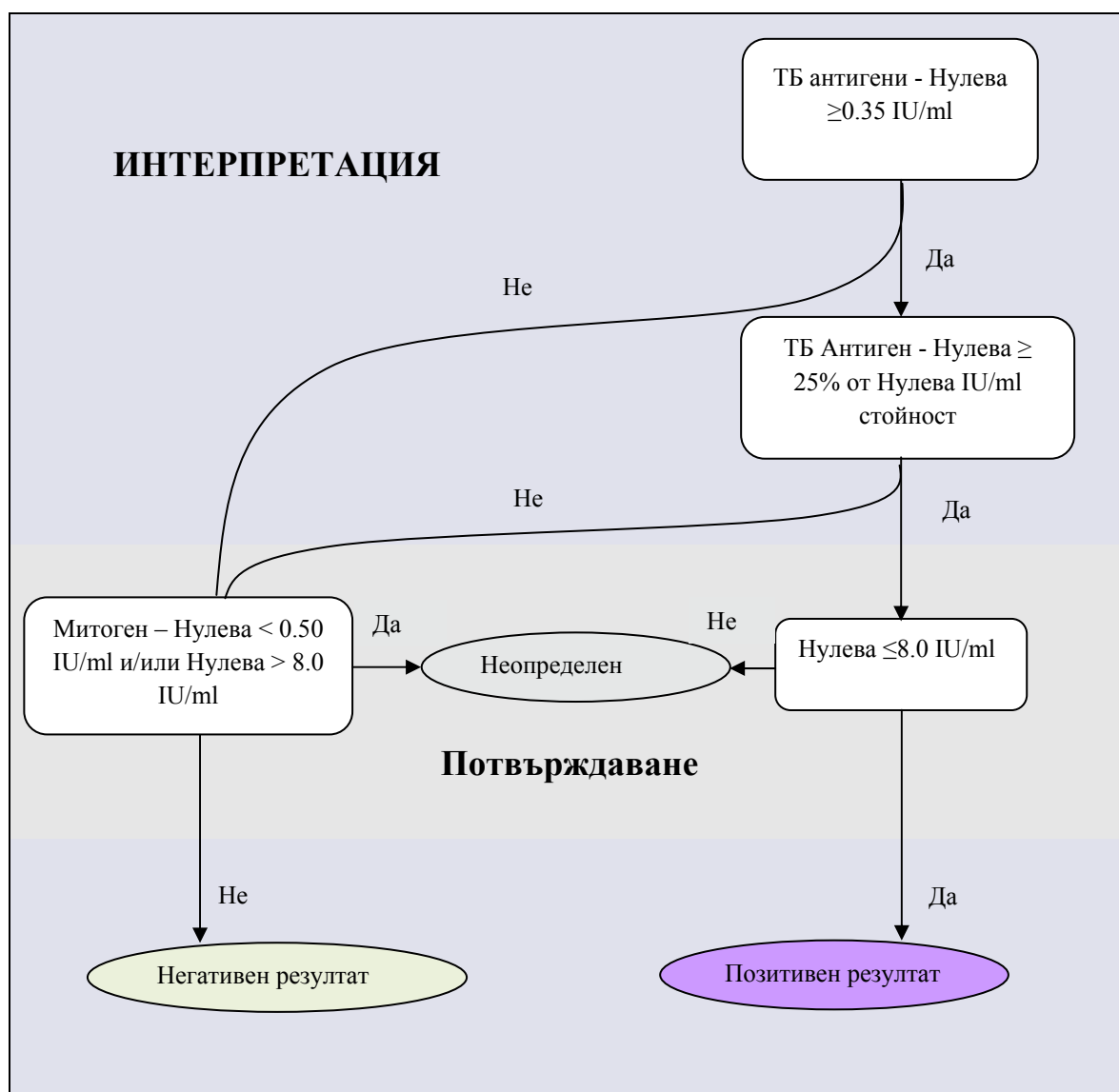


КОГАТО СЕ ИЗПОЛЗВАТ НУЛЕВА, ТБ АНТИГЕННА И МИТОГЕН ЕПРУВЕТКИ

| Нулева [IU/ml] | ТБ антиген минус Нулева [IU/ml] | Митоген минус нулева [IU/ml] ¹ | QFT резултат [IU/ml] | Резултат / Интерпретация |
|--------------------|---------------------------------|---|---------------------------------|--|
| ≤ 8.0 | < 0.35 | ≥ 0.5 | Отрицателен | Инфекция с <i>M. Tuberculosis</i> |
| | ≥ 0.35 and < 25% от нулева | ≥ 0.5 | | НЕ е вероятна |
| | ≥ 0.35 and ≥ 25% от нулева | Която и да е | Положителен ² | Инфекция с <i>M. Tuberculosis</i> е вероятна |
| | < 0.35 | < 0.5 | Неопределен ³ | Резултатите са неопределени по отношение на ТБ антиген |
| | ≥ 0.35 and < 25% от нулева | < 0.5 | | |
| > 8.0 ⁴ | Която и да е | Която и да е | | |

1. Отговори към Митоген положителна контрола (и понякога ТБ антиген) може да бъде обикновено извън порядъка на отчитащото устройство за микроплаки. Това не оказва влияние върху резултатите от теста.
2. Когато не се подозира инфекция с *M. tuberculosis*, началните положителни резултати могат да бъдат потвърдени чрез повторно изпитване на дублирани проби от оригиналната плазма чрез QFT ELISA. Ако повторният тест на една или на двете от дублираните проби е положителен се смята, че индивидът е с положителен тест.
3. Отнесете се до раздела проблеми за възможните причини.
4. При клиничните изпитвания по-малко от 0.25 % от участниците имат IFN-γ- нива от > 8.0 IU/ml за Нулевата контрола.
5. Големината на измереното ниво IFN-γ не може да бъде в корелация със стадия или степента на инфекцията, нивото на имунния отговор или вероятността за прогресиране до активно заболяване.

Фигура 4. Интерпретация на диаграма, когато са използвани Нулева, ТБ-антиген и Митоген епруветки.



8. ОГРАНИЧЕНИЯ

Резултатите от QFT теста трябва да се използват в комбинация с епидемиологичната анамнеза на всеки индивид, здравния статус в момента и други диагностични оценки.

Индивидите със стойности на Нулевата контрола по-големи от 8 IU/ml се определят като “Неопределени”, защото един отговор към ТБ антигените, по-висок с 25 %, може да бъде извън порядъка на измерването на теста.

Получаването на ненадеждни или неопределени резултати може да се дължи на :

- Отклонения от процедурата, описана в ръководството.
- Свърхвисоки нива на IFN- γ в циркуляцията или наличие на хетерофилни антитела.
- Инкубиране на кръвта при 37°C след повече от 16 часа от получаване ѝ.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Клинични проучвания

Поради липсата на дефинитивен стандарт за латентна туберкулозна инфекция (ЛТБИ) практически не може да бъде направено сравнение за специфичността и чувствителността на QFT. Специфичността на QFT е измерена приблизително, спрямо известната честота на фалшиво - положителните резултати при лица с нисък риск (без известни рискови фактори) за туберкулозна инфекция. Чувствителността на теста е установена при изследване на пациенти с микробиологично потвърдена активна форма на туберкулоза.

Специфичност

При проучване в САЩ, включващо 866 доброволци, е взета кръв за изследване с QFT, при едновременно приложение на туберкулинов кожен тест (ТКТ). По време на тестването, чрез стандартно проучване, е била събрана информация за наличие на рискови фактори за ТБ, и демографски данни. От 432 доброволци, без данни за рискови фактори за *M. tuberculosis* инфекция, резултати от QFT и ТКТ са били получени при 391 от тях. Нито едно от тези лица не е било БЦЖ ваксинирано. Второ изследване за специфичност на QFT, е направено в Япония, като 90% от изследваните са били ваксинирани с БЦЖ, и с нисък риск от ТБ. Резултатите от двете изследвания за специфичност са показани в Таблица 2.

Табл. 2. Специфичност на QFT: Резултати от изследването на лица без известен риск за *M. tuberculosis* инфекция.

| Проучване | БЦЖ статус % ваксинация | Общ брой тествани | Брой QFT неопределени | Брой QFT позитивни/ брой валидни тестове | QFT специфичност (95% Дов. интервал) | Брой ТКТ позитивни/ брой тествани | ТКТ* специфичност (95% Дов. интервал) |
|---------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------|---|---|---|--|
| САЩ (непубликувано) | 0% | 391 | 1 | 3/ 390 | 99.2% (98-100) | 6/ 391 | 98.5% (97-99) |
| Япония (непубликувано) | ~90% | 168 | 6 | 2/ 162 | 98.8% (95-100) | - | - |
| ОБЩО | | 559 | 7/ 559 (1.3%) | 5/ 552 | 99.1% (98-100) | - | - |

*Използвана е 10 мм граница за ТКТ. Специфичността на ТКТ е 99,1%, ако се използва 15 мм граница.

Чувствителност за активна ТБ

Суспектни за ТБ от Австралия и Япония, които в следствие са потвърдени микробиологично след посявка за наличие на *M. tuberculosis*, са изследвани за определяне на чувствителността на QFT. Тъй като няма установен стандартен тест за латентна туберкулозна инфекция (ЛТБИ), най-подходящият заместител е микробиологичното културелно изследване за *M. Tuberculosis*, тъй като туберкулозно

болните със сигурност са инфектирани. Пациентите са получили по-малко от 8 - дневна терапия преди взимането на кръвта за изследване с QFT.

Таблица 3 обобщава находките при двете групи културелно позитивни за инфекция с *M. Tuberculosis*. Общата чувствителност на QFT за активна туберкуозна инфекция е 89% (48/54).

Табл. 3. QFT: Пациенти с микробиологично потвърдена *M.Tuberculosis* инфекция.

| Проучване | Брой QFT позитивни/брой валидни тестове | QFT чувствителност (95% CI) |
|--------------------------------------|---|-----------------------------|
| Японски пациенти с ТБЦ ¹⁵ | 86 / 92 | 93% (86-97%) |
| Австралия | 24 / 27 | 89% (70-97%) |
| САЩ | 47 / 58 | 81% (68-90%) |
| ОБЩО | 157 / 177 | 89% (83-93%) |

Диагностициране на ЛТБИ

Голям брой от публикуваните проучвания доказват ефективността на QFT при различни популации с риск от развитие на ЛТБИ. Характерните данни за повечето от проучванията са показани на Таблица 4.

Табл. 4. Избрани публикувани проучвания с QFT, при популации с риск за ЛТБИ.

| Проучване | Общ брой тестувани | Резултати и данни |
|---|--------------------|--|
| Индийски здравни работници (Pai et al 2005) ²⁶ | 726 | Среда с високо ниво на ТБ. 40% QFT позитивни спрямо 41% ТКТ позитивни при 10 мм граница. Високо ниво на съгласуване с ТКТ, без ефект от БЦЖ върху двата теста. И двата теста показват зависимост от рисковите фактори, свързани с възрастта и продължителността на работа в здравеопазването. |
| Датски (HIV) пациенти (Brock et al 2006) ⁵ | 590 | Общото превалиране на ЛТБИ при QFT е 4.6% (27/590) при HIV+ пациенти. Позитивните резултати са свързани с риск за ТБ. Двама QFT позитивни пациенти прогресират до активна ТБ в рамките на една година. Неопределените отговори (n=20, 3.4%) са значимо свързани с CD4 брой <100 µL. |
| Хоспитализирани деца (Dogra et al 2006) ¹⁰ | 105 | Деца,suspektnи за ТБ или имали анамнеза за контакт с ТБ заболяване са тествани с QFT и ТКТ. 10.5% QFT позитивни спрямо 9.5% ТКТ позитивни при 10мм граница. Нивото на съгласуване между тестовите е общо 95.2% и 100% при БЦЖ неваксинираните. |
| Контактни в Германия (Diel et al 2006) ⁹ | 309 | Тестувани са близки контактни на 15 различни доказани случаи. 51% от тях са БЦЖ- ваксинирани, 27% родени извън страната. 70% от БЦЖ- ваксинираните и 18% от неваксинираните са ТКТ позитивни (5мм), докато 9% и 11% са съответно QFT позитивни. QFT са свързани с ТБ риска. ТКТ е свързан само с БЦЖ ваксинацията. |

Много други публикации описват ефективността на по-малко чувствителната версия на Квантиферон ТБ-Голд теста с течни антигени (предшественик на QFT) и на самия QFT тест. Тези публикации включват използването на теста при контактни на пациенти с активна форма на инфекцията^{9,11,19,25} деца^{6-10, 25, 28}, HIV- позитивни^{2, 5, 20}, здравни работници^{13,26,32}, имunosупресирани^{4, 22, 23, 27, 30, 31}, както и suspektnи за ТБ^{7, 8, 10, 18} и индивиди с нисък риск за развитие на инфекция¹⁵.

Повторяемост и ефект от предшестващ ТКТ върху последващ QFT тест

Като част от проучване за специфичност в САЩ, подгрупа от доброволци са повторно тествани между 4 и 5 седмици след първите QFT тест и ТКТ. Резултатите от QFT и тестовите за двата периода са

сравнени при 260 новобранци, като нивото на съвместимост на резултатите е било 99,6% (259/260). Предхождащ ТКТ не е индуцирал позитивни отговори в QFT теста.

10. ТЕХНИЧЕСКА ИНФОРМАЦИЯ

Неопределени резултати

Неопределените резултати трябва да са редки и могат да бъдат свързани с имунния статус на тествания индивид, но може и да са свързани с някои технически фактори:

- Повече от 16 часа от взимането на кръвта до инкубирането ѝ при 37°C.
- Съхранение на кръвта извън препоръчания температурен порядък (22° C ± 5° C).
- Недобро смесване на кръвта с антигените в епруветките.
- Непълно измиване на ELISA плаката.

Ако се подозира, че спорните въпроси са технически във връзка със събирането или боравенето с кръвните проби, трябва да се повтори целият QFT тест с нови кръвни проби. Повторение на ELISA процедурата може да се извърши, ако се подозира недостатъчно измиване на плаката или други процедурни отклонения при ELISA процедурата. Неопределените резултати вследствие на нисък отговор към Митогена или високи стойности на Нулевата контрола, не биха се променили при повторението, освен при грешка в ELISA процедурата. Неопределените резултати се съобщават като такива. Лекарят може повторно да вземе кръв, или да проведе други подходящи процедури.

Плазмени проби със съсиреци

Ако при продължително съхраняване на плазмата се появят фибринови съсиреци, пробите се центрофугират за да се утаи съсиреният материал, и да се улесни пипетирането на плазмата.

Проблеми при отчитането на ELISA

Неспецифична промяна на цвета

| ВЪЗМОЖНА ПРИЧИНА | РЕШЕНИЕ |
|---|--|
| Непълно измиване на плаката. | Плаката се измива поне 6 пъти с 400 µл/кладенче с буфер за промиване. Може да са необходими и повече от 6 промивни цикъла, в зависимост от измиващата машина, която се ползва. Между отделните цикли трябва да има поне 5 секунди. |
| Кръстосано контаминиране на кладенчетата на ELISA. | Внимавайте при пипетирането и смесването на пробата за свеждане на риска до минимум. |
| Китът/компонентите му са с изтекъл срок. | Китът да се използва в рамките на срока на годност. Разтворените Стандарт и Конюгат 100X Концентрат да се използват до 3 месеца от датата на приготвяне. |
| Разтворът на Ензим Субстрата е контаминиран. | Отстранете Субстрата ако има синьо оцветяване. Трябва да се използват чисти резервоари за реактива. |
| Смесване на плазма в епруветки за центрофугиране преди вземане на плазмата. | Уверете се, че плазмените проби се вземат внимателно над гелообразната утайка, без пипетата да се мести нагоре и надолу, като се внимава да не се поврежда материал на повърхността на утайката. |

Ниска оптична плътност на стандартите

| ВЪЗМОЖНА ПРИЧИНА | РЕШЕНИЕ |
|--|---|
| Грешка при разреждането на стандарта | Проверете дали разрежданията на Кит Стандарта в кита са приготвени правилно според ръководството. |
| Грешка при пипетирането | Проверете дали пипетите са калибрирани и използвани според указанията на производителя. |
| Температурата при инкубирането е много ниска | Инкубирането на ELISA трябва да се извършва при стайна температура 17-27 ° C. |
| Времето на инкубиране е много кратко | Инкубирането на плаката с конюгата, стандартите и пробите трябва да е за 120 ± 5 минути. Разтворът на Ензим Субстрата се инкубира в плаката за 30 минути. |
| Използва се неправилен филтър за отчитане на плаката | Плаката трябва да се отчита на 450 nm с референтен филтър между 620 и 650 nm. |
| Реактивите са много студени | Всички реактиви, с изключение на Конюгат 100X Концентрат, трябва да се темперират на стайна температура преди започване на теста. Това става обикновено за 1 час. |
| Китът/компонентите му са с изтекъл срок | Китът трябва да се използва до времето на срока на годност. Разтвореният стандарт и Конюгат 100X Концентрат трябва да се използват до 3 месеца от |

| | |
|--|----------------------------|
| | датата на приготвянето им. |
|--|----------------------------|

Висок фон

| ВЪЗМОЖНИ ПРИЧИНА | РЕШЕНИЕ |
|--|---|
| Непълно измиване на плаката | Измивайте плаката поне 6 пъти с 400 µl/ кладенче с буфер за промиване. Може да са необходими повече от 6 цикъла в зависимост от измиващата машина, която се използва. Между отделните цикли трябва да има поне 5 секунди. |
| Температурата на инкубиране е много висока | Инкубирането на ELISA трябва да се извършва на стайна температура 17 ° - 27 ° C |
| Китът/компонентите му са с изтекъл срок | Китът трябва да се използва до времето на срока на годност. Разрежданият Стандарт и Конюгат 100X Концентрат трябва да се използват до 3 месеца от датата на приготвянето им. |
| Контаминиране на разтвора на Ензим Субстрата | Отстранете Субстрата ако се появи синьо оцветяване. Осигурете използването на чисти резервоари за реактивите. |

Нелинейна стандартна крива и променливост на двойните проби

| ВЪЗМОЖНА ПРИЧИНА | РЕШЕНИЕ |
|--|---|
| Непълно измиване на плаката | Измивайте плаката поне 6 пъти с 400 µl/ кладенче с буфер за промиване. Може да са необходими повече от 6 цикъла в зависимост от измиващата машина, която се използва. Между отделните цикли трябва да има поне 5 секунди. |
| Грешки в разреждането на стандартите | Проверете дали разрежданията на стандарта са приготвени правилно според ръководството |
| Лошо смесване | Смесвайте добре реактивите чрез леко разбъркване или разклащане преди прибавянето им към плаката. |
| Непостоянна техника на пипетиране или прекъсване по време на извършване на теста | Прибавянето на пробата и стандарта трябва да се извършва без прекъсване. Всички реактиви трябва да бъдат приготвени преди започване на работа. |

Видеofilм на процедурите на теста и решение на повечето технически проблеми може да се намери в информацията за продукта и техническия наръчник на CD-ROM, който се предлага безплатно от Cellestis или чрез Вашия дистрибутор.

11. БИБЛИОГРАФИЯ

Пълен списък с литература относно QFT можете да намерите на [gnowee™ - QuantiFERON®](http://gnowee.com) библиотеката с библиографични препратки на www.gnowee.net

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.* 2009. 33; 586-93.
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. 62; 389-94.
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.* 2009. 135; 1010-8.
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.* 2009. 198; 33-7.
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.
23. **Matulis, G., et al.** Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann Rheum Dis.* 2007. 67; 84-90.
24. **Mirtskhulava, V., et al.** Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 513-519.
25. **Nakaoka, H., et al.** Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis.* 2006. 12; 1383-8.

13. СЪКРАТЕНА ПРОЦЕДУРА НА ТЕСТА

Първа фаза – Инкубиране на кръвта

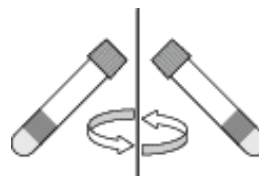
1. Вземете кръв от пациента в епруветките за събиране на кръв и ги разклатете десет (10) пъти дотолкова силно, че цялата вътрешна повърхност на епруветките със сигурност да се покрие с кръв и антигените по стените да се разтворят.



2. Инкубирайте епруветките, **изправени** при 37° C за 16 до 24 часа.



3. След инкубирането, центрофугирайте епруветките за 15 минути при 2000 до 3000 RCF (g), за да се отдели плазмата от еритроцитите.

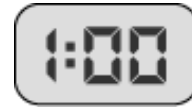


4. След центрофугирането съберете плазмата с пипета. Преди събирането внимавайте в никакъв случай да не пипетирате нагоре и надолу и да не смесите плазмата.



Втора фаза - IFN- γ - ELISA

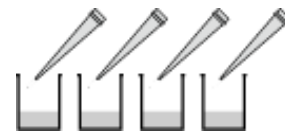
1. Темперирайте компонентите на ELISA при стайна температура с изключение на Конюгат 100X Концентрат поне за 60 минути.



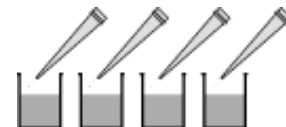
2. Разрежете Кит Стандарта до 8.0 IU/ml с дестилирана или дейониизирана вода. Пригответе четири (4) стандартни разреждания.



3. Разрежете лиофилизирания Конюгат 100X Концентрат с дестилирана или дейониизирана вода.

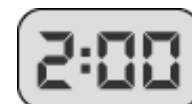


4. Пригответе конюгат с работна концентрация в Зеления разтворител и прибавете 50 μ l към всички кладенчета.

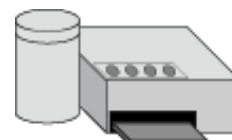


5. Прибавете 50 μ l от изследваната плазма и 50 μ l от всеки от стандартите към съответните кладенчета. Разбъркайте ги с шейкър (разклащаща машина) или на ръка.

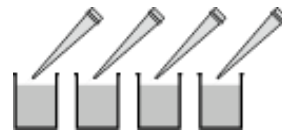
6. Инкубирайте 120 минути при стайна температура.



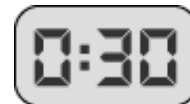
7. Промийте кладенчетата поне 6 пъти с 400 μ l / кладенче с буфер за промиване.



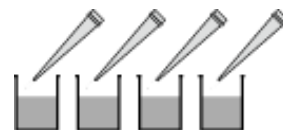
8. Прибавете 100 μ l Разтвор на Ензим Субстрат в кладенчетата. Разбъркайте ги на шейкър (разклащаща машина).



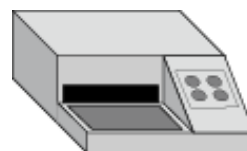
9. Инкубирайте 30 минути при стайна температура.



10. Прибавете 50 μ l Разтвор за Стопиране във всички кладенчета и разклатете с шейкър (разклащаща машина).



11. Отчетете резултатите на 450 nm с референтен филтър 620-650 nm.



12. Анализ на резултатите.



14. ВАЖНИ ПРОМЕНИ

Важните промени в това издание (05990301F – July 2011) на QFT Ръководството за употреба са обобщени в таблицата по-долу :

| Раздел | страница | Промяна |
|--------------------------------|----------|---|
| 5. Вземане на проби и боравене | 9 | Промяна в процедурата на разклащане. |
| 6. Инструкции за употреба | 10 | Промяна в инструкциите за ползване на епруветките с кръвни проби. |
| 6. Инструкции за употреба | 12 | Промяна в инструкциите за ползване на плазмените проби. |
| 10. Техническа информация | 23 | Допълнение “Смесване на плазмата в центрофугата преди вземане на плазмата“. |
| 12. Технически сервиз | 26 | Нов е-мейл адрес за Техническа поддръжка. |



Произведено за:

Cellestis Limited (Australia) and Cellestis GmbH (Europe)

Level 1, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia

Phone (Aust) +61 3 8527 3500, (Europe) +49 6151 428 59-0

E-mail: quantiferon@cellestis.com

Website: www.cellestis.com

Doc. No. 05990301G

July 2011



| | |
|----|-----|
| EC | REP |
|----|-----|

MDSS GmbH

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany