



април 2019 г.

Листовка за QuantiFERON[®]-TB Gold Plus (QFT[®]-Plus) ELISA

 2 × 96 (622120)
 20 × 96 (622822)

Версия 1

IVD

За ин витро диагностика

IFN- γ тест с цяла кръв, измерващ отговорите към пептидни
антигени ESAT-6 и CFP-10



REF

622120, 622822



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Германия

R6 **MAT**

1083163BG

Съдържание

Предназначение	5
Кратко изложение и обяснение на теста	5
Принципи на анализа	8
Време, необходимо за извършване на анализа	10
Компоненти и съхранение	11
Необходими, но непредоставени материали	13
Съхранение и работа с пробите	14
Епруветки за вземане на кръв	14
Реактиви на набора	14
Разтворени и неизползвани реактиви	14
Предупреждения и предпазни мерки	15
Предупреждения	15
Предпазни мерки	16
Вземане и работа с проби	19
Указания за употреба	26
Етап 1 – инкубиране на кръвта и събиране на плазмата	26
Етап 2 – IFN- γ ELISA	27
Изчисления и интерпретация на теста	33
Генериране на стандартна крива	33
Качествен контрол на теста	34

Интерпретиране на резултатите	35
Ограничения	37
Работни характеристики	38
Клинични проучвания.....	38
Работни характеристики на анализа.....	44
Техническа информация.....	49
Неопределени резултати.....	49
Плазмени алиquotни части със съсиреци	49
Ръководство за отстраняване на проблеми	50
Библиография.....	52
Символи	61
Информация за контакт	62
Съкратена процедура на теста.....	63
Етап 1 – инкубиране на кръвта.....	63
Етап 2 – IFN- γ ELISA.....	63
Значими промени.....	65
Хронология на редакциите на ръководството	65

Предназначение

Анализът QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) представлява тест за ин витро диагностика, който използва пептиден коктейл, симулиращ протеините ESAT-6 и CFP-10, за стимулиране на клетките в хепаринизирана цяла кръв. Откриването на интерферон- γ (IFN- γ) чрез ензимно свързан имunosорбентен анализ (ELISA) се използва за идентифициране на ин витро отговорите към онези пептидни антигени, които се свързват с инфекцията с *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus е индиректен тест за инфекция с *M. tuberculosis* (включително заболяване) и е предназначен за съвместна употреба с оценка на риска, рентгенография и други медицински и диагностични оценки.

Кратко изложение и обяснение на теста

Туберкулозата е заразна болест, причинявана от инфекция с микроорганизми от комплекса *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), които обикновено се разпространяват в нови гостоприемници по въздушно-капков път от пациенти с туберкулозно заболяване на дихателната система. Инфектираният индивид може да се разболеет от туберкулоза в рамките на седмици или месеци, но повечето такива индивиди остават в добро здравословно състояние. Латентната туберкулозна инфекция (ЛТБИ), която представлява незаразно асимптомно състояние, персистира при някои от тях, като тези индивиди могат да развият туберкулоза месеци или години по-късно. Основната цел на диагностицирането на ЛТБИ е да се обсъди медикаментозно лечение за предотвратяване на туберкулозно заболяване. Доскоро туберкулиновият кожен тест (ТКТ) беше единственият наличен метод за диагностициране на ЛТБИ. Кожната чувствителност към туберкулин се развива от 2 до 10 седмици след инфектирането. Въпреки това някои инфектирани индивиди, включително и такива с най-различни състояния, възпрепятстващи

имунните функции, както и други индивиди без тези състояния, не реагират на туберкулин. и обратно, някои индивиди с малка вероятност за инфекция с *M. tuberculosis* показват чувствителност към туберкулин и имат положителни ТКТ резултати след ваксинация с бацила на Calmette-Guérin (BCG), инфекция с микобактерии, различни от комплекса *M. tuberculosis*, или неустановени други причинители.

ЛТБИ трябва да се разграничава от туберкулозно заболяване – състояние, което подлежи на докладване и обикновено засяга белите дробове и долните дихателни пътища, въпреки че и други органни системи могат да бъдат засегнати. Туберкулозното заболяване се диагностицира на базата на анамнестични, физикални, рентгенологични, хистологични и микобактериологични находки.

QFT-Plus е тест за клетъчно-медиирани имунни (Cell-Mediated Immune, CMI) отговори спрямо пептидни антигени, които симулират микобактериални протеини. Тези протеини – ESAT-6 и CFP-10 – липсват във всички BCG щамове и в повечето нетуберкулозни микобактерии с изключение на *M. kansasii*, *M. szulgai* и *M. marinum* (1). Индивидите, инфектирани с микроорганизми от комплекса МТВ, обикновено имат в кръвта си лимфоцити, които разпознават тези и други микобактериални антигени. Този процес на разпознаване включва образуване и секретирание на цитокина IFN- γ . Откриването и последващото количествено определяне на IFN- γ е в основата на този тест.

Използваните в QFT-Plus антигени представляват пептиден коктейл, симулиращ протеините ESAT-6 и CFP-10. Многобройни проучвания са показали, че тези пептидни антигени стимулират отговори спрямо IFN- γ в Т-клетки от индивиди, инфектирани с *M. tuberculosis*, но по принцип не и от неинфектирани или ваксинирани с BCG лица без заболяване или риск за ЛТБИ (1–32). Медикаментозни лечения или състояния, които нарушават имунните функции, обаче потенциално могат да отслабят отговорите към IFN- γ . Пациенти с някои други микобактериални инфекции също могат да бъдат чувствителни към ESAT-6 и CFP-10, тъй като гените, кодиращи тези протеини, са налице в *M. kansasii*, *M. szulgai* и *M. marinum* (1, 23). QFT-Plus е както тест за ЛТБИ,

така и полезно помощно средство за диагностициране на инфекцията с комплекса *M. tuberculosis* при болели пациенти. Положителният резултат подкрепя диагнозата за туберкулозно заболяване, но инфекциране от други микобактерии (напр. *M. kansasii*) също може да доведе до положителни резултати. Необходими са и други медицински и диагностични оценки за потвърждаване или изключване на туберкулозно заболяване.

QFT-Plus разполага с две отделни епруветки с туберкулозен антиген: TB Antigen Tube 1 (TB1) и TB Antigen Tube 2 (TB2). И двете епруветки съдържат пептидни антигени от свързани с комплекса MTB антигени, ESAT-6 и CFP-10. Докато епруветката TB1 съдържа пептиди от ESAT-6 и CFP-10, които са предназначени да предизвикат клетъчно-медирирани имунни (CMI) отговори от помощните CD4⁺ Т-лимфоцити, епруветката TB2 съдържа допълнителен набор от пептиди, насочени към индуциране на CMI отговори от цитотоксичните CD8⁺ Т-лимфоцити. в естествената история на MTB инфекцията CD4⁺ Т-клетките играят роля с критично значение в имунологичния контрол чрез секретирани на цитокина IFN- γ . Понастоящем има данни в подкрепа на ролята на CD8⁺ Т-клетките, участващи в защитата на гостоприемника срещу MTB чрез произвеждане на IFN- γ и други разтворими фактори, които активират макрофагите за потискане на растежа на MTB, убиване на инфектираните клетки или директно лизиране на интрацелуларния MTB (33–35). Специфичните за MTB CD8⁺ клетки се откриват при участници с ЛТБИ и с активно туберкулозно заболяване, при които често може да се открият произвеждащите IFN- γ CD8⁺ клетки (36–38). Освен това специфичните за ESAT-6 и CFP-10 CD8⁺ Т-лимфоцити се описват като по-често откривани при пациенти с активно туберкулозно заболяване, в сравнение с ЛТБИ, и може да бъдат свързани със скорошна експозиция на MTB (39–41). в допълнение, специфичните за MTB CD8⁺ Т-клетки, произвеждащи IFN- γ , също се откриват при пациенти с активна туберкулоза и коинфекция с HIV (42, 43), както и при малки деца с туберкулозно заболяване (44).

Принципи на анализа

Анализът QFT-Plus използва специални епруветки за вземане на кръв, които се използват за вземане на цяла кръв. Инкубирането на кръвта става в епруветките в продължение на 16 до 24 часа, след което плазмата се събира и се тества за наличието на IFN- γ , продуциран в отговор на пептидните антигени.

Тестът QFT-Plus се извършва в два етапа. Първо се взема цяла кръв във всяка от QFT-Plus Blood Collection Tubes, които включват епруветка Nil, епруветка TB1, епруветка TB2 и епруветка с Mitogen. Алтернативно кръвта може да се вземе в генерична епруветка за еднократно вземане на кръв с литиев хепарин или натриев хепарин като антикоагулант и след това да се прехвърли в епруветките за QFT-Plus.

Епруветката с Mitogen се използва в теста QFT-Plus като положителна контрола. Това може да е важно в случай на съмнение относно имунния статус на пациента. Епруветката с Mitogen също така служи като контрола за правилната работа с кръвта и инкубирането ѝ.

Епруветките за QFT-Plus се разклащат, за да миксират антигените с кръвта и трябва да се инкубират при температура 37°C възможно най-скоро и в рамките на 16 часа след вземането. След инкубационен период от 16 до 24 часа епруветките се центрофугират, плазмата се отстранява и количеството на IFN- γ (IU/ml) се измерва чрез ELISA. QFT-Plus ELISA използва рекомбинантен човешки IFN- γ стандарт, който е анализиран спрямо референтен IFN- γ продукт (NIH реф.: Gxg01-902-535). Резултатите от тестовата аликвотна част се докладват в международни единици на ml (IU/ml) в сравнение със стандартната крива, генерирана чрез тестване на разреждания на стандарта, предоставен в набора.

Известно е, че хетерофилните (напр. човешки антимиши) антитела в серума или плазмата на определени лица предизвикват интерференция с имунни анализи. Ефектът на хетерофилните антитела в QFT-Plus ELISA е намален до минимум чрез

добавяне на нормален миши серум към зеления разредител и използването на F(ab')₂ фрагменти на моноклонално антитяло като IFN- γ захващащото антитяло, с което са покрити микроплаките.

Анализът QFT-Plus се счита за положителен за IFN- γ отговор към която и да епруветка с туберкулозния антиген, който е значително над стойността Nil за IFN- γ в IU/ml. Плазмената аликвотна част от епруветката с Mitogen служи като IFN- γ положителна контрола за всяка тествана проба. Слабият отговор към Mitogen (< 0,5 IU/ml) посочва неопределен резултат, когато кръвната аликвотна част също е с отрицателен отговор към туберкулозните антигени. Това може да се получи при недостатъчно лимфоцити, намалена лимфоцитна активност поради неправилно обработване на пробата, неправилно напълване/смесване на епруветката с Mitogen или невъзможност на лимфоцитите на пациента да произведат IFN- γ . Завишени нива на IFN- γ в аликвотната част Nil може да възникнат при наличие на хетерофилни антитела или при характерно секретирание на IFN- γ . Епруветката Nil регулира фона (напр. завишени нива на циркулиращ IFN- γ или наличие на хетерофилни антитела). Нивото на IFN- γ за епруветката Nil се изважда от нивото на IFN- γ за епруветките с туберкулозен антиген и епруветката с Mitogen.

Време, необходимо за извършване на анализа

Приблизителното време, необходимо за извършване на анализа QFT-Plus ELISA, е представено по-долу; посочено е и времето за тестване на множество аликвотни части, когато са групирани в партии:

Инкубиране на епруветките

с кръв при 37°C: 16 до 24 часа

ELISA:

Около 3 часа за една плака за ELISA

(22 лица)

< 1 час работа

Добавете 10 до 15 минути за всяка допълнителна плака

Компоненти и съхранение

Епруветки за вземане на кръв*		200 епруветки и	Пакет за употреба при един пациент	Пакет за дозатор	200 епруветки HA	Пакет за употреба при един пациент HA	Пакет за дозатор HA
Каталожен №		622526	622222	622423	623526	623222	623423
Брой тестове/пакет		50	10	25	50	10	25
QuantiFERON Nil Tube (сива капачка, бял пръстен)	Nil	50 епруветки	10 епруветки	25 епруветки			
QuantiFERON TB1 Tube (зелена капачка, бял пръстен)	TB1	50 епруветки	10 епруветки	25 епруветки			
QuantiFERON TB2 Tube (жълта капачка, бял пръстен)	TB2	50 епруветки	10 епруветки	25 епруветки			
QuantiFERON Mitogen Tube (лилава капачка, бял пръстен)	Mitogen	50 епруветки	10 епруветки	25 епруветки			
QuantiFERON Nil HA Tube (сива капачка, жълт пръстен)	Nil HA				50 епруветки	10 епруветки	25 епруветки
QuantiFERON TB1 HA Tube (зелена капачка, жълт пръстен)	TB1 HA				50 епруветки	10 епруветки	25 епруветки
QuantiFERON TB2 HA Tube (жълта капачка, жълт пръстен)	TB2 HA				50 епруветки	10 епруветки	25 епруветки
QuantiFERON Mitogen HA Tube (лилава капачка, жълт пръстен)	Mitogen HA				50 епруветки	10 епруветки	25 епруветки
Листовка на QFT-Plus Blood Collection Tubes (епруветките за вземане на кръв за QFT-Plus)		1	1	1	1	1	1

* Не всички конфигурации на продукти се предлагат във всяка страна. Моля, консултирайте се с отдела за обслужване на клиенти на QIAGEN (подробности на www.qiagen.com) за повече информация относно конфигурациите, които се предлагат за поръчване.

Компоненти на ELISA†	Набор за ELISA с 2 плаки	Пакет за референтна лаборатория
Каталожен №	622120	622822
Microplate Strips (Ленти микроплаки) (12 × 8 ямки), покрити с мише античовешко IFN-γ моноклонално антитяло	2 x 96-ямкови ленти микроплаки	20 x 96-ямкови ленти микроплаки
IFN-γ Standard (IFN-γ стандарт), лиофилизиран (съдържа рекомбинантен човешки IFN-γ, говежди казеин, 0,01% w/v тимерозал)	1 x флакон (8 IU/ml в разтворено състояние)	10 x флакон (8 IU/ml в разтворено състояние)
Green Diluent (Зелен разредител) (съдържа говежди казеин, нормален миши серум, 0,01% w/v тимерозал)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Конюгат 100x концентрат), лиофилизиран (миши античовешки IFN-γ HRP, съдържа 0,01% w/v тимерозал)	1 x 0,3 ml (в разтворено състояние)	10 x 0,3 ml (в разтворено състояние)
Wash Buffer 20x Concentrate (Промивен буфер 20x концентрат) (pH 7,2, съдържа 0,05% v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Разтвор на ензимен субстрат) (съдържа H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' тетраметилбензидин)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Ензимен стопиращ разтвор) (съдържа 0,5M H ₂ SO ₄)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Листовка за QFT-Plus ELISA	1	1

† Вижте страница 16 относно предпазните мерки и предупрежденията за опасност.

Необходими, но непредоставени материали

- Инкубатор при $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}^*$. Не се изисква CO_2
- Калибрирани пипети с променлив обем* за пипетиране от 10 μl до 1000 μl с връхчета за еднократна употреба
- Калибрирани мултиканални пипети* с възможност за пипетиране на 50 μl и 100 μl с връхчета за еднократна употреба
- Капак за плаки
- Шейкър за микроплаки*
- Дейонизирана или дестилирана вода, 2 литра
- Промивно устройство за микроплаки (препоръчва се автоматично промивно устройство)
- Четец за микроплаки*, снабден с филтър 450 nm и референтен филтър от 620 nm до 650 nm

* Уверете се, че апаратите са проверени и калибрирани съгласно препоръките на производителя.

Съхранение и работа с пробите

Епруветки за вземане на кръв

- Съхранявайте епруветките за вземане на кръв при температура от 4°C до 25°C.

Реактиви на набора

- Съхранявайте реактивите на набора при температура от 2°C до 8°C.
- Винаги предпазвайте разтвора на ензимния субстрат от пряка слънчева светлина.

Разтворени и неизползвани реактиви

За указания как да разтворите реактивите вижте страница 28.

- Разтвореният стандарт на набора може да се използва в срок до 3 месеца, ако се съхранява при температура от 2°C до 8°C.

Запишете датата на разтваряне на стандарта на набора.

- След като бъде разтворен, неизползваният конюгат 100x концентрат трябва да се върне на мястото за съхранение при температура от 2°C до 8°C и да се използва в рамките на 3 месеца.

Запишете датата на разтваряне на конюгата.

- Конюгатът с работна концентрация трябва да използва в рамките на 6 часа от приготвянето.
- Промивният буфер с работна концентрация трябва да се съхранява при стайна температура за период до 2 седмици.

Предупреждения и предпазни мерки

Само за ин витро диагностика.

Предупреждения

- Отрицателният QFT-Plus 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 получена преди развитието на клетъчен имунен отговор), коморбидни състояния, които засягат имунните функции, неправилна работа с епруветките за вземане на кръв след венепункция, неправилно извършване на анализа или други имунологични променливи.
- Положителният QFT-Plus резултат не трябва да бъде единствената или окончателната база за установяване на инфекция с *M. tuberculosis*. Неправилното извършване на анализа може да доведе до фалшиво положителни отговори.
- Положителният QFT-Plus резултат трябва да бъде последван от медицински преглед и диагностична оценка за активно туберкулозно заболяване (напр. намазка и посявка на киселиннорезистентни бацили, рентгенография на бял дроб).
- Тъй като ESAT-6 и CFP-10 липсват във всички BCG щамове и в повечето известни нетуберкулозни микробактерии, възможно е положителният QFT-Plus резултат да се дължи на инфекция от *M. kansasii*, *M. szulgai* или *M. marinum*. Ако се подозират такива инфекции, трябва да се извършат алтернативни тестове.

Предпазни мерки

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни средства за очите. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheets, SDS). Тези листове можете да намерите онлайн в удобен и компактен PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и разпечатате SDS за всеки набор на QIAGEN и компонент на набора.



ВНИМАНИЕ: Работете с човешка кръв и плазма като с потенциално заразни. Спазвайте приложимите указания за работа с кръв и кръвни продукти. Изхвърляйте аликвотните части и материалите, които са в контакт с кръв или кръвни продукти, в съответствие с местните, държавните и федералните нормативни разпоредби.

Следните предупреждения за опасност и безопасността се отнасят за компонентите на QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA.

Предупреждения за опасност



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Съдържа: сярна киселина. Предупреждение! Може да бъде корозивно за металите. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Предупреждение! Предизвиква леко дразнене на кожата. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.



QuantiFERON Green Diluent

Съдържа: тринатриев 5-хидрокси-1-(4-сулфофенил)-4-(4-сулфофенилазо) пиразол-3-карбоксилат. Съдържа: тартразин. Предупреждение! Може да предизвика алергична кожна реакция. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Съдържа: Смес от 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он (3:1). Вреден за водните организми, с дълготраен ефект. Да се избягва изпускане в околната среда.

Предупреждения за безопасност

Преди употреба се снабдете със специални инструкции. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. **ПРИ КОНТАКТ с КОЖАТА** (или косата): Незабавно свалете цялото замърсено облекло. Измийте кожата с вода/душ. **ПРИ КОНТАКТ с ОЧИТЕ:** Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването. При явна или предполагаема експозиция: Потърсете медицински съвет/помощ. Незабавно се обадете в **ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ** или на лекар. При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ. Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба. Да се съхранява под ключ. Депонирайте съдържанието/съда в одобрено съоръжение за депониране на отпадъци.

Допълнителна информация

Информационни листове за безопасност (ИЛБ): www.qiagen.com/safety

- Отклоненията от *листовката на QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA* могат да доведат до погрешни резултати. Прочетете внимателно инструкциите преди употреба.
- Не използвайте набора, ако преди употреба някоя от бутилките с реактиви е с признаци на повреда или утечка.
- **Важно:** Преди употреба огледайте флаконите. Не използвайте флаконите с конюгат или IFN- γ стандарт, ако забележите признаци на повреда или ако гумената запушалка е повредена. Не работете със счупени флакони. Прилагайте подходящите предпазни мерки за безопасност с оглед на безопасното изхвърляне на флаконите. Препоръка: Използвайте инструмент за отстраняване на метална обкатка за отваряне на флаконите с конюгат или IFN- γ стандарт с цел свеждане до минимум на риска от нараняване от металната обкатка.
- Не смесвайте и не използвайте ленти микроплаки, IFN- γ стандарт, зелен разреждател или конюгат 100x концентрат от различни партиди на набора на QFT-Plus. Другите реактиви (Промивен буфер 20x концентрат, разтвор на ензимен субстрат и ензимен стопиращ разтвор) могат да бъдат разменяни между наборите, при условие че реактивите не са с изтекъл срок на годност и данните на партидата отговарят на регистрираните.
- Изхвърлете неизползваните реактиви и биологични аликвотни части в съответствие с местните, държавните и федералните нормативни разпоредби.
- Не използвайте QFT-Plus Blood Collection Tubes или набора на ELISA след изтичане на срока на годност.
- Необходимо е винаги да се спазват правилните лабораторни процедури.
- Уверете се, че лабораторното оборудване е калибрирано/валидирано за употреба.

Вземане и работа с проби

QFT-Plus използва следните епруветки за вземане на кръв:

1. Епруветки QuantiFERON Nil Tube (сива капачка с бял пръстен)
2. Епруветки QuantiFERON TB1 Tube (зелена капачка с бял пръстен)
3. Епруветки QuantiFERON TB2 Tube (жълта капачка с бял пръстен)
4. Епруветки QuantiFERON Mitogen Tube (лилава капачка с бял пръстен)
5. Епруветки QuantiFERON HA Nil Tube (сива капачка с жълт пръстен)
6. Епруветки QuantiFERON HA TB1 Tube (зелена капачка с жълт пръстен)
7. Епруветки QuantiFERON HA TB2 Tubes (жълта капачка с жълт пръстен)
8. Епруветки QuantiFERON HA Mitogen Tube (лилава капачка с жълт пръстен)

Антигените са изсушени по вътрешната стена на епруветките за вземане на кръв, затова е от съществено значение съдържанието на епруветката да се смеси щателно с кръв. За кръв, която е взета директно в епруветки за QFT-Plus, епруветките за QFT-Plus трябва да бъдат съхранявани и транспортирани при стайна температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) и да бъдат прехвърлени в инкубатор при температура 37°C възможно най-скоро и в рамките на 16 часа след вземането. Алтернативно кръвта може да се вземе в епруветка за еднократно вземане на кръв с литиев хепарин или натриев хепарин, където да бъде съхранявана преди прехвърлянето за QFT-Plus и инкубиране. Кръвните проби, които са взети в литиев хепарин или натриев хепарин, може да бъдат съхранявани до 16 часа при стайна температура ($17\text{--}25^{\circ}\text{C}$), след което да бъдат прехвърлени в епруветки за QFT-Plus. Кръвните проби в епруветките с литиев хепарин или натриев хепарин може да бъдат съхранявани и при температура $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ в продължение на до 48 часа преди прехвърлянето им в епруветки за QFT-Plus. Вижте раздел „Вземане на кръв в епруветка за еднократно вземане на кръв с литиев или натриев хепарин и последващо прехвърляне в QFT-Plus Blood Collection Tubes“.

Вземане на кръв направо в QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Обозначете епруветките по подходящ начин.

Уверете се, че всяка епруетка (Nil, TB1, TB2 и с Mitogen) може да бъде идентифицирана по етикета си или чрез други способности след отстраняването на капачката.

Препоръчва се да се запишат часът и датата на вземането на кръв.

2. За всеки пациент вземете 1 ml кръв чрез венепункция директно във всяка от QFT-Plus Blood Collection Tubes. Тази процедура трябва да се извършва от обучен флеботомист.

Важна забележка: Епруетките трябва да са с температура от 17°C до 25°C по времето на напълване с кръв.

Стандартните QFT-Plus Blood Collection Tubes могат да се използват при височина до 810 метра над морското равнище. Епруетките за голяма надморска височина QFT-Plus Blood Collection Tubes могат да се използват при височина от 1020 метра над морското ниво до височина 1875 метра над морското равнище.

Тъй като в епруетките от 1 ml кръвта се събира относително бавно, задръжте епруетката на иглата за 2 – 3 секунди, след като епруетката изглежда изцяло напълнена. По този начин ще се гарантира изтеглянето на правилния обем.

- Черният маркер отстрани на епруетките посочва валидирания диапазон 0,8 до 1,2 ml. Ако нивото на кръвта в някоя епруетка е извън диапазона на индикаторния маркер, трябва да се вземе нова кръвна аликвотна част. Недостатъчното или прекомерното напълване на епруетките извън диапазона от 0,8 до 1,2 ml може да доведе до погрешни резултати.
- Ако за вземане на кръв се използва игла тип бъртерфлай, трябва да се използва епруетка за „прочистване“, за да се гарантира, че тръбичките са запълнени с кръв, преди да се използват епруетките за вземане на кръв за QFT-Plus.
- Ако се използват QFT-Plus Blood Collection Tubes при надморска височина над 810 метра или ако обемът на изтеглената кръв е малък,

потребителите могат да вземат кръв със спринцовка и веднага да прехвърлят по 1 ml кръв във всяка от 4-те епруветки. с оглед на безопасността това се извършва най-добре чрез отстраняване на иглата на спринцовката, като се гарантират правилни процедури за безопасност, отстраняване на капачките от 4-те епруветки за QFT-Plus и добавяне на 1 ml кръв към всяка от тях (до центъра на черния маркер отстрани на етикета на епруветката). Поставете обратно капачките плътно и смесете, както е описано по-долу. Уверете се, че всяка епруветка (Nil, TB1, TB2 и с Mitogen) може да бъде идентифицирана по етикета си или чрез други способности след отстраняването на капачката.

3. Веднага след напълване разклатете епруветките десет (10) пъти, само толкова силно, колкото да се гарантира, че цялата вътрешна повърхност на епруветката е покрита с кръв. По този начин могат да се разтворят антигените по стените на епруветката.

Важна забележка: Епруветките трябва да са с температура между 17°C–25°C по време на разклащането. Прекомерно енергичното разклащане може да причини нарушаване на гела и да доведе до абнормни резултати.

4. След етикетирането, напълването и разклащането епруветките трябва да се прехвърлят в инкубатор при температура $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ възможно най-скоро и в рамките на 16 часа след вземането. Преди инкубирането съхранявайте епруветките при стайна температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Ако епруветките за QFT-Plus не са инкубирани при температура 37°C непосредствено след вземането на кръв и разклащането, обърнете епруветките 10 пъти, за да смесите съдържанието им преди инкубирането при температура 37°C .
5. Инкубирайте епруветките за QFT-Plus ИЗПРАВЕНИ при температура $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ за 16 до 24 часа. Инкубаторът не изисква CO_2 или овлажняване.

Вземане на кръв в епруветка за еднократно вземане на кръв с литиев или натриев хепарин и последващо прехвърляне в QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Кръвта може да се вземе в епруветка за еднократно вземане на кръв с литиев или натриев хепарин като антикоагулант и след това да се прехвърли в QFT-Plus Blood Collection Tubes. Използвайте само литиев или натриев хепарин като кръвен антикоагулант, тъй като другите антикоагуланти смущават анализа. Обозначете епруветките по подходящ начин.

Препоръчва се епруветката да се обозначи с часа и датата на вземането на кръв.

Важно: Епруветките за вземане на кръв за трябва да са със стайна температура (17–25°C) по времето на вземането на кръв.

2. Напълнете епруветка за вземане на кръв с литиев или натриев хепарин (минимален обем 5 ml) и смесете внимателно чрез няколкократно обръщане на епруветката за разтваряне на хепарина. Тази процедура трябва да се извършва от обучен флеботомист.
3. Опции за продължителност и температура на съхранение на епруветките с литиев или натриев хепарин преди прехвърлянето и инкубирането им в QFT-Plus Blood Collection Tubes (вижте фигури 1 – 3 „Опции за вземане на кръв“).

Опция 1 – Съхранение и работа със съхранявана при стайна температура епруветка с литиев или натриев хепарин Кръвта, взета в епруветка с литиев или натриев хепарин, трябва да бъде съхранявана при стайна температура (22°C ± 5°C) в продължение на не повече от 16 часа от момента на вземането преди прехвърлянето в QFT-Plus Blood Collection Tubes и последващото инкубиране.

Опция 2 – Съхранение и работа със съхранявана в хладилник епруветка с литиев или натриев хепарин

Важно: Стъпки а–г от процедурата трябва да бъдат следвани последователно.

- а. Кръвта, взета в епруветка с литиев или натриев хепарин, може да бъде съхранявана при стайна температура (17–25°C) до 3 часа след вземането.

- b. Кръвта, взета в епруветка с литиев или натриев хепарин, може да бъде съхранявана в хладилник (2–8°C) в продължение на до 48 часа.
- c. След съхранението в хладилник епруветката с литиев или натриев хепарин трябва да достигне стайна температура (17–25°C) преди прехвърлянето в QFT-Plus Blood Collection Tubes.
- d. Разпределените аликвотни части в QFT-Plus Blood Collection Tubes трябва да бъдат поставени в инкубатор при температура 37°C в рамките на 2 часа след прехвърлянето на кръвта.

Ако QFT-Plus Blood Collection Tubes не бъдат инкубирани при температура 37°C веднага след прехвърлянето в QFT-Plus Blood Collection Tubes и разклащането, обърнете епруветките 10 пъти, за да смесите съдържанието им преди инкубирането при температура 37°C. Общото време от вземането на кръв до инкубирането в QFT-Plus Blood Collection Tubes не трябва да надвишава 53 часа.

- 4. Прехвърляне на кръвна проба от епруветка с литиев или натриев хепарин в QFT-Plus Blood Collection Tubes:
 - a. Поставете подходящ етикет на всяка епруветка QFT-Plus Blood Collection Tube
Уверете се, че всяка епруветка (Nil, TB1, TB2 и с Mitogen) може да бъде идентифицирана по етикета си или чрез други способности след отстраняването на капачката. Препоръчва се записаните час и дата на вземане на кръвта да бъдат прехвърлени от епруветките с литиев или натриев хепарин върху QFT-Plus Blood Collection Tubes.
 - b. Аликвотните части трябва да бъдат смесени равномерно чрез внимателно обръщане преди разпределянето им в QFT-Plus Blood Collection Tubes.
 - c. Разпределянето трябва да стане асептично, като се гарантират правилни процедури за безопасност, чрез отстраняване на капачките от 4 епруветки QFT-Plus Blood Collection Tubes и добавяне на 1 ml кръв към всяка от тях. Поставете обратно капачките на епруветките плътно и смесете, както е описано по-долу. Уверете се, че всяка епруветка (Nil, TB1, TB2 и с Mitogen)

може да бъде идентифицирана по етикета си или чрез други способности след отстраняването на капачката.

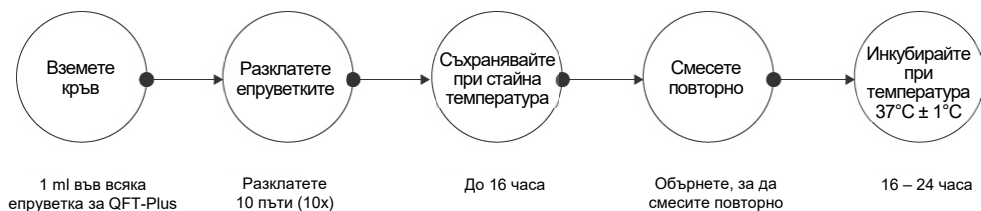
5. Смесете съдържанието на епруветките. Веднага след напълване разклатете QFT-Plus Blood Collection Tubes 10 (десет) пъти, само толкова силно, колкото да се гарантира, че цялата вътрешна повърхност на епруветката е покрита с кръв. По този начин могат да се разтворят антигените по стените на епруветката.

Прекомерно енергичното разклащане може да причини нарушаване на гела и да доведе до абнормни резултати.

6. След етикетирането, напълването и разклащането епруветките трябва да се прехвърлят в инкубатор при температура $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ в рамките на 2 часа. Ако QFT-Plus Blood Collection Tubes не са инкубирани при температура 37°C непосредствено след вземането на кръв и разклащането, обърнете епруветките 10 пъти (10x), за да смесите съдържанието им преди инкубирането при температура 37°C . (Вижте фигури 1–3 на следващата страница за опциите за вземане на кръв).

7. Инкубирайте епруветките QFT-Plus Blood Collection Tubes ИЗПРАВЕНИ при $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ за 16 до 24 часа. Инкубаторът не изисква CO_2 или овлажняване.

Вземете кръв в QFT-Plus Blood Collection Tubes и ги съхранявайте при стайна температура.



Фигура 1. Начин на вземане на кръв: Вземете кръвта направо в QFT-Plus Blood Collection Tubes и ги съхранявайте при стайна температура.

Общата продължителност на времето от вземането на кръвта в QFT-Plus Blood Collection Tubes до инкубирането при температура 37°C не трябва да надвишава 16 часа.

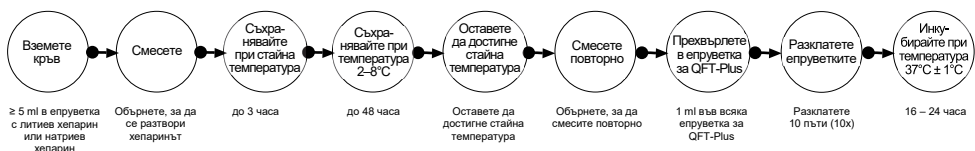
Вземете кръв в епруветка с литиев или натриев хепарин и съхранявайте при стайна температура.



Фигура 2. Начин на вземане на кръв: Вземете кръв в епруветка с литиев или натриев хепарин и съхранявайте при стайна температура.

Общата продължителност на времето от вземането на кръвта в епруветка с литиев или натриев хепарин до инкубирането при температура 37°C не трябва да надвишава 16 часа.

Вземете кръв в епруветка с литиев или натриев хепарин и я съхранявайте при температура 2–8°C.



Фигура 3. Начин на вземане на кръв: Вземете кръв в епруветка с литиев или натриев хепарин и съхранявайте при температура 2–8°C.

Общата продължителност на времето от вземането на кръвта в епруветка с литиев или натриев хепарин до инкубирането при температура 37°C не трябва да надвишава 53 часа.

Указания за употреба

Етап 1 – инкубиране на кръвта и събиране на плазмата

Предоставени материали

- QFT-Plus Blood Collection Tubes (вижте раздел 3)

Необходими (но непредоставени) материали

- Вижте раздел 3

Процедура

1. **Ако кръвта не се инкубира веднага след вземането, непосредствено преди инкубирането трябва да се извърши повторно смесване на епруветките чрез обръщане 10 пъти.**
2. **Инкубирайте епруветките ИЗПРАВЕНИ при 37°C ± 1°C за 16 до 24 часа. Инкубаторът не изисква CO₂ или овлажняване.**
3. **След инкубирането при 37°C епруветките за вземане на кръв могат да се съхраняват при температура между 4°C и 27°C за период до 3 дни преди центрофугирането.**
4. **След като инкубирате епруветките при 37°C, събирането на плазма се улеснява от центрофугиране на епруветките за 15 минути при 2000 до 3000 x RCF (g). Запушалката от гел ще отдели клетките от плазмата. Ако това не се случи, епруветките трябва да се центрофугират отново.**

Събирането на плазма може да се извърши и без центрофугиране, но е необходимо допълнително внимание за отстраняване на плазмата без нарушаване на клетките.

5. Плазмените алиquotни части трябва да се събират само чрез използване на пипета.

Важна забележка: След центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.

Плазмените алиquotни части могат да се зарядят директно от центрофугирани епруветки за вземане на кръв в плака за QFT-Plus ELISA, включително когато се използват автоматизирани работни станции за ELISA.

Плазмените алиquotни части могат да се съхраняват за период до 28 дни при температура от 2 до 8°C или, ако плазмата е събрана, под -20°C за продължителни периоди.

За да имате достатъчно алиquotни части за теста, съберете най-малко 150 µl плазма.

Етап 2 – IFN- γ ELISA

Предоставени материали

- Набор за QFT-Plus ELISA (вижте раздел 3)

Необходими, но непредоставени материали

- Вижте раздел 3.

Процедура

- 1. Преди употреба всички плазмени алиquotни части и реактиви, с изключение на конюгат 100x концентрат, трябва да се темперират до стайна температура (22 ± 5°C). Отделете 60 минути за достигане на стайна температура.**

2. **Отстранете от рамката лентите, които не са необходими, затворете отново фолиевата опаковка и ги върнете обратно в хладилника за съхранение, докато ви потрябват.**

Отделете най-малко 1 лента за QFT-Plus стандартите и достатъчно ленти за броя на тестваните индивиди (вижте Фигура 5). След употреба запазете рамката за употреба с останалите ленти.

3. **Разтворете IFN- γ стандарта с обема дейонизирана или дестилирана вода, посочен на етикета на флакона. Смесвайте внимателно за избягване на образуването на пяна и гарантиране на пълно разтваряне. При разтварянето на стандарта до посочения обем ще се получи разтвор с концентрация 8,0 IU/ml.**

Важна забележка: Обемът за разтваряне на стандарта на набора се различава при различните партиди.

Използвайте разтворения стандарт на набора за изготвяне на разреждане 1 в 2, последвано от серия на разреждане 1 в 4 на IFN- γ в зелен разреждател (Green Diluent, GD) (вижте Фигура 4). S1 (Стандарт 1) съдържа 4,0 IU/ml, S2 (Стандарт 2) съдържа 1,0 IU/ml, S3 (Стандарт 3) съдържа 0,25 IU/ml, а S4 (Стандарт 4) съдържа 0 IU/ml (GD самостоятелно). Стандартите трябва да се анализират поне двукратно. Подгответе пресни разреждания на стандарта на набора за всяка сесия на ELISA.

Препоръчана процедура за двойни стандарти

Поставете етикети на 4 епруветки „S1“, „S2“, „S3“, „S4“.

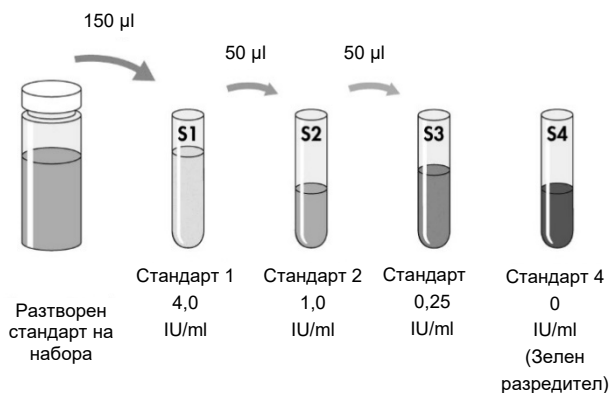
Добавете **150** μ l от GD в S1, S2, S3, S4.

Добавете **150** μ l от стандарта на набора в S1 и смесете щателно.

Прехвърлете **50** μ l от S1 в S2 и смесете щателно.

Прехвърлете **50** μ l от S2 в S3 и смесете щателно.

GD самостоятелно служи като нулев стандарт (S4).



Фигура 4. Подготвяне на стандартна крива.

4. Разтворете лиофилизирания конюгат 100x концентрат с 0,3 ml дейонизирана или дестилирана вода. Смесвайте внимателно за намаляване до минимум на образуването на пяна и пълно разтваряне на конюгата.

Конюгатът с работна концентрация се приготвя чрез разреждане на необходимото количество разтворен конюгат 100x концентрат в зелен разредител (Таблица 1. Приготвяне на конюгата). Върнете неизползвания конюгат 100x концентрат на съхранение при температура от 2°C до 8°C веднага след употреба. Използвайте само зелен разредител.

Таблица 1. Приготвяне на конюгата

Брой на лентите	Обем на конюгат 100x концентрата	Обем на зеления разредител
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Плазмените алиquotни части, събрани от епруветки за вземане на кръв и впоследствие съхранени (в хладилник или замразени), трябва да се смесят преди добавяне в ямката за ELISA.

Важна забележка: Ако плазмените алиquotни части се добавят директно от центрофугираните епруветки за QFT-Plus, всякакво смесване на плазма трябва да се избягва. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.

6. Добавете 50 µl прясно приготвен конюгат с работна концентрация в необходимите ямки за ELISA, като използвате многоканална пипета.

7. Добавете 50 µl от тестовите плазмени алиquotни части в съответните ямки, като използвате многоканална пипета (вижте препоръчаното разполагане на плаката на Фигура 5). Накрая добавете 50 µl от всеки от стандартите от 1 до 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
Б	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
В	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
Г	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
Д	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
Е	2 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
Ж	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
З	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Фигура 5. Препоръчано разполагане на алиquotната част (22 теста за плака)

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

1 N (Алиquotна част 1. плазма Nil), 1 TB1 (Алиquotна част 1. TB1 плазма), 1 TB2 (Алиquotна част 1. TB2 плазма), 1 M (Алиquotна част 1. Плазма с Mitogen)

8. Покрийте всяка плака и смесете конюгата и плазмените алиquotни части/стандартите щателно, като използвате шейкър за микроплаки за 1 минута. Да се избягват пръски.

9. Покрийте всяка плака и инкубирайте при стайна температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) за 120 ± 5 минути.

Плаките не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането.

10. По време на инкубирането разрежете една част Промивен буфер 20x концентрат с 19 части дейонизирана или дестилирана вода и смесете щателно. Предоставен е достатъчно Промивен буфер 20x концентрат за приготвянето на 2 литра промивен буфер с работна концентрация.

Промийте ямките с **400 μl** от промивния буфер с работна концентрация за поне 6 цикъла. Препоръчва се автоматизирано промивно устройство за плаки.

Щателното промиване е много важно за функционирането на анализа. Уверете се, че всяка ямка е изцяло напълнена с промивен буфер до горната част на ямката за всеки цикъл на промиване. Препоръчва се период на накисване от поне 5 секунди между всеки цикъл.

Трябва да се добави стандартен лабораторен дезинфектант в резервоара за отпадните течности, както и да се спазват установените процедури за деконтаминация на потенциално заразни материали.

- 11. Почукайте плаките с лицевата част надолу върху абсорбираща салфетка без власинки, за да отстраните остатъчния промивен буфер. Добавете 100 μ л разтвор на ензимен субстрат във всяка ямка, покрийте всяка плака и смесете щателно, като използвате шейкър за микроплаки.**
- 12. Покрийте всяка плака и инкубирайте при стайна температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) за 30 минути.**

Плаките не трябва да се излагат на пряка слънчева светлина по време на инкубирането.

- 13. След 30-минутното инкубиране добавете 50 μ л ензимен стопиращ разтвор във всяка ямка и смесете.**

Ензимният стопиращ разтвор трябва да се добавя към ямките в същия ред и с приблизително същата скорост като субстрата в стъпка 11.

- 14. Измерете оптичната плътност (Optical Density, OD) за всяка ямка в рамките на 5 минути от спирането на реакцията, като използвате четеца за микроплаки, снабден с филтър за 450 nm и с референтен филтър за 620 nm до 650 nm. Стойностите на OD се използват за изчисляване на резултатите.**

Изчисления и интерпретация на теста

Софтуерът за анализ на QFT-Plus може да се използва за анализиране на необработените данни и изчисляване на резултатите. Предлага се от www.QuantiFERON.com. Уверете се, че използвате най-новата версия на софтуера за анализ на QFT-Plus.

Софтуерът извършва оценка за контрол на качеството на анализа, генерира стандартна крива и предоставя резултат от теста за всеки индивид, както е описано подробно в раздела „Интерпретация на резултатите“.

Като алтернатива на използването на софтуера за анализ на QFT-Plus резултатите могат да бъдат определени и по следния метод.

Генериране на стандартна крива

(Ако не се използва софтуер за анализ на QFT-Plus)

Определете средните стойности на OD на репликите на стандарта на набора за всяка плака.

Създайте $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ стандартна крива чрез нанасяне на $\log_{(e)}$ на средната OD (оста y) спрямо $\log_{(e)}$ на концентрацията на IFN- γ на стандартите в IU/ml (оста x), като пропуснете нулевия стандарт от тези изчисления. Изчислете линията на най-добро съвпадение за стандартната крива чрез регресионен анализ.

Използвайте стандартната крива за определяне на концентрацията на IFN- γ (IU/ml) за всяка от тестовите плазмени аликвотни части, като използвате OD стойността за всяка аликвотна част.

Тези изчисления могат да се извършват с помощта на софтуерните пакети, налични с четците за микроплаки, и стандартна електронна таблица или статистически софтуер

(като Microsoft® Excel®). Препоръчва се тези пакети да се използват за изчисляване на регресионния анализ, коефициента на вариация (coefficient of variation, % CV) за стандартите и коефициента на корелация (r) на стандартната крива.

Качествен контрол на теста

Точността на резултатите от теста зависи от генерирането на точна стандартна крива. Поради това резултатите, базирани на стандартите, трябва да се проверят, преди резултатите от теста на алиquotната част да могат да бъдат интерпретирани.

За да е валиден ELISA:

- Средната стойност на OD за Стандарт 1 трябва да е $\geq 0,600$.
- Коефициентът на вариация % CV за стойностите на OD на репликите на Стандарт 1 и Стандарт 2 трябва да е $\leq 15\%$.
- Стойностите на OD на копията на Стандарт 3 и Стандарт 4 не трябва да се различават с повече от 0,040 единици оптична плътност от тяхната средна стойност.
- Коефициентът на корелация (r), изчислен от средните стойности на абсорбция на стандартите, трябва да е $\geq 0,98$.

Софтуерът за анализ на QFT-Plus изчислява и докладва тези параметри за качествен контрол.

Ако горепосочените критерии не са удовлетворени, работният цикъл е невалиден и трябва да се повтори.

Средната стойност на OD за нулевия стандарт (зелен разределител) трябва да е $\leq 0,150$. Ако средната стойност на OD е $> 0,150$, трябва да се провери процедурата за промиване на плаката.

Интерпретиране на резултатите

Резултатите от QFT-Plus се интерпретират чрез използване на следните критерии (Таблица 2):

Важна забележка: Диагностицирането или изключването на туберкулозно заболяване и оценката на вероятността за ЛТБИ изисква комбинация от епидемиологични, анамнестични, медицински и диагностични находки, които трябва да се имат предвид при интерпретацията на резултатите от QFT-Plus.

Таблица 2. Интерпретация на резултатите от QFT-Plus

Nil (IU/ml)	TB1 минус Nil (IU/ml)	TB2 минус Nil (IU/ml)	Mitogen минус Nil (IU/ml)*	Резултат от QFT-Plus	Съобщаване/интерпретация
	≥ 0,35 и ≥ 25% от стойността Nil	Всяка	Всяка	Положителен†	Инфекция с <i>M. tuberculosis</i> е вероятна
	Всяка	≥ 0,35 и ≥ 25% от стойността Nil			
≤ 8,0	< 0,35 или ≥ 0,35 и < 25% от стойността Nil	< 0,35 или ≥ 0,35 и < 25% от стойността Nil	≥ 0,5	Отрицателен	Инфекция с <i>M. tuberculosis</i> НЕ е вероятна
	< 0,35 или ≥ 0,35 и < 25% от стойността Nil	< 0,35 или ≥ 0,35 и < 25% от стойността Nil	< 0,5	Неопределен‡	Вероятността от инфекция с <i>M. tuberculosis</i> не може да бъде определена
> 8,0§		Всяка		Неопределен‡	Вероятността от инфекция с <i>M. tuberculosis</i> не може да бъде определена

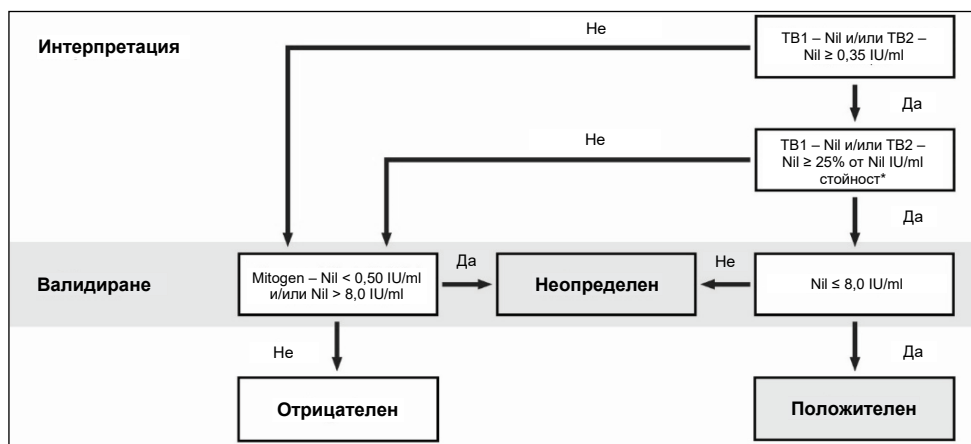
* Отговорите към Mitogen-положителната контрола (и понякога към туберкулозните антигени) могат да са извън диапазона на четеща за микроплака. Това не оказва влияние върху резултатите от теста. Стойности, които са > 10 ml, се съобщават от софтуера на QFT-Plus като > 10 IU/ml.

† Когато не се подозира инфекция с *M. tuberculosis*, първоначалните положителни резултати може да се потвърдят чрез повторно тестване на оригиналните плазмени аликвотни части, дублирани в QFT-Plus ELISA. Ако повторното тестване на едното или и двете копия е положително, трябва да се счита, че индивидът е с положителен тест.

‡ Вижте раздела „Отстраняване на проблеми“ за възможните причини.

§ В клинични проучвания по-малко от 0,25% от участниците имат нива на IFN-γ > 8,0 IU/ml за стойност Nil.

Величината 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. Положителният отговор за туберкулоза при отрицателни за Mitogen лица е рядък, но е наблюдаван при пациенти с туберкулозно заболяване. Той посочва, че IFN- γ отговорът към туберкулозния антиген е по-висок от този към Mitogen, което е възможно, тъй като нивото на Mitogen не стимулира максимално произвеждането на IFN- γ от лимфоцитите.



* За да бъде валидна TB1 минус Nil или TB2 минус Nil, количество $\geq 25\%$ от Nil IU/ml стойност трябва да е от същата епруветка като първоначалния резултат $\geq 0,35$ IU/ml.

Фигура 6. Диаграма за интерпретация за QFT-Plus

Ограничения

Резултатите от теста QFT-Plus трябва да се използват заедно с епидемиологията на отделните индивиди, текущия медицински статус и други диагностични изследвания.

Индивидите със стойности Nil над 8,0 IU/ml се определят като „неопределени“, защото един по-висок с 25% отговор към туберкулозните антигени може да бъде извън диапазона за измерване на анализа.

Ненадеждни или неопределени резултати могат да се получат поради:

- отклонения от процедурите, описани в настоящата листовка;
- свръхвисоки нива на IFN- γ в циркулацията или наличие на хетерофилни антитела;
- период над 16 часа от вземането на кръвната проба до инкубирането при 37°C. Това не е приложимо при използване на работен процес с епруветки с литиев хепарин или натриев хепарин при температура 2–8°C.

Работни характеристики

Клинични проучвания

Тъй като няма установен стандартен тест за потвърждаване или изключване на диагнозата за ЛТБИ, предвиждането за чувствителността и специфичността за QFT-Plus не може да се оцени практически. Специфичността на QFT-Plus е определена приблизително чрез оценяване на фалшиво положителните резултати при лица с нисък риск (без известни рискови фактори) за туберкуозна инфекция. Чувствителността е определена приблизително чрез оценяване на групи от пациенти с потвърдено чрез посявка активно туберкулозно заболяване.

Специфичност

Завършено е проучване за оценка на специфичността на QFT-Plus при 409 участници. Демографските данни и рисковите фактори за експозиция на туберкулоза са определени чрез стандартизирано проучване по време на тестването.

В резюме на находките от 2-те групи пациенти с нисък риск (без известни рискови фактори) за туберкуозна инфекция общата специфичност на QFT-Plus е 97,6% (399/409) (Таблица 3 и Таблица 4).

Таблица 3. Резултати от проучването за специфичност на QFT-Plus по център на проучването

Проучване	Положителен	Отрицателен	Неопределен	Специфичност (95% CI)
Япония	4	203	0	98% (95–100%)
Австралия	6	196	0	97% (94–99%)

Таблица 4. Резултати от проучването за специфичност на QFT-Plus по епруетка с туберкулозен антиген

Проучване	TB1	TB2	QFT-Plus
Положителен	5	10	10
Отрицателен	404	399	399
Неопределен	0	0	0
Специфичност (95% CI)	98,8% (97,2–99,6)	97,6% (95,6–98,8)	97,6% (95,6–98,8)

Чувствителност за активна туберкулоза

Тъй като няма установен стандартен тест за ЛТБИ, най-подходящият заместител е микробиологичната посявка за *M. tuberculosis*, тъй като пациентите със заболяване са инфектирани по дефиниция. Лица със съмнение за туберкулоза от 4 центъра на проучването в Австралия и Япония, при които впоследствие е потвърдено наличие на инфекция с *M. tuberculosis* чрез посявка, са тествани за оценка на чувствителността на QFT-Plus (Таблица 5 и Таблица 6). Пациентите са получили по-малко от 14-дневна терапия преди вземане на кръвта за тестване с QFT-Plus.

В резюме на находките от 4-те групи пациенти с положителна за *M. tuberculosis* култура общата чувствителност на QFT-Plus за активно туберкулозно заболяване е 95,3% (164/172). в 4-те групи 159 пациенти са с положителни резултати за двете епруетки TB1 и TB2, 1 пациент е положителен само по TB1, а 4 са положителни само по TB2. Общо 1,1% (2/174) от резултатите са неопределени. Резултатът от TB2 правилно идентифицира 1 потвърден с култура пациент, чийто резултат би бил неопределен (нисък Mitogen) само по резултата от TB1 (вижте Таблица 5 и Таблица 6).

Таблица 5. Резултати от проучването за чувствителност на QFT-Plus по център на проучването

Центрове на проучването	Положителен	Отрицателен	Неопределен	QFT-Plus чувствителност* (95% CI)
Център в Япония 1	36	7	0	84% (69–93)
Център в Япония 2	53	1	2	98% (90–100)
Център в Япония 3	54	0	0	100% (93–100)
Център в Австралия	21	0	0	100% (84–100)

* Чувствителността е базирана на общия брой на валидните тестове, с изключение на неопределените резултати.

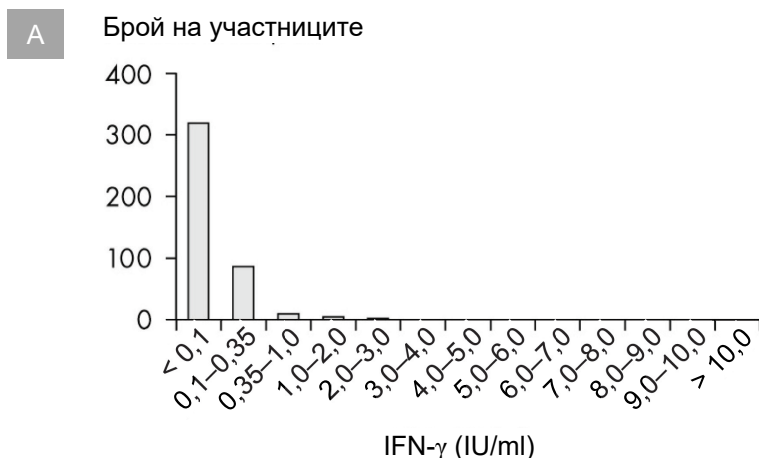
Таблица 6. Резултати от проучването за чувствителност на QFT-Plus по епруветка с туберкулозен антиген

	TB1	TB2	QFT-Plus
Положителен	160	163	164
Отрицателен	11	9	8
Неопределен	3	2	2
Чувствителност [†] (95% CI)	93,6% (88,8–96,7)	94,8% (90,3–97,6)	95,3% (90,9–97,9)

* Чувствителността е базирана на общия брой на валидните тестове, с изключение на неопределените резултати.

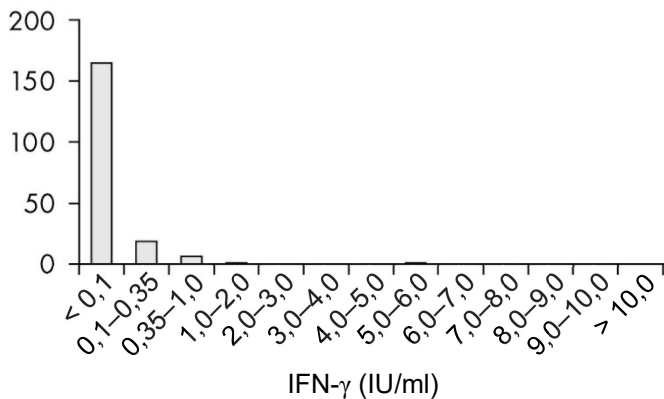
Наблюдавани разпределения на отговорите – стратифицирани по риск

Наблюдавани са различни IFN- γ отговори към епруветките TB1, TB2 и тази с контролата в клиничните проучвания, като отговорите са стратифицирани по риск от инфекция с *M. tuberculosis* (фигури 7–9). Групата със смесен риск се състои от участници, представителни за общата тествана популация, включително участници със и без рискови фактори за експозиция на туберкулоза, както и случаи, при които няма вероятност за туберкулозата (т.е. ЛТБИ).



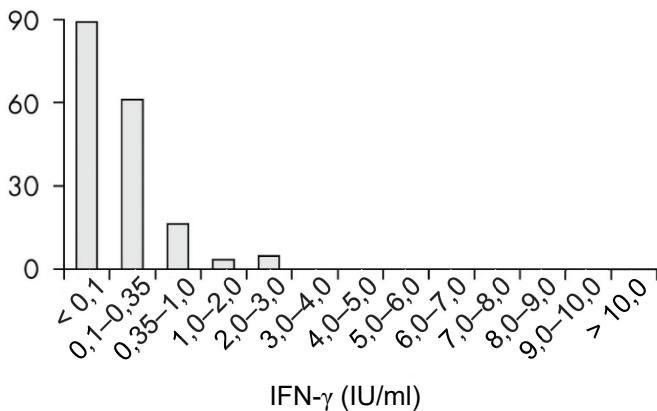
Б

Брой на участниците

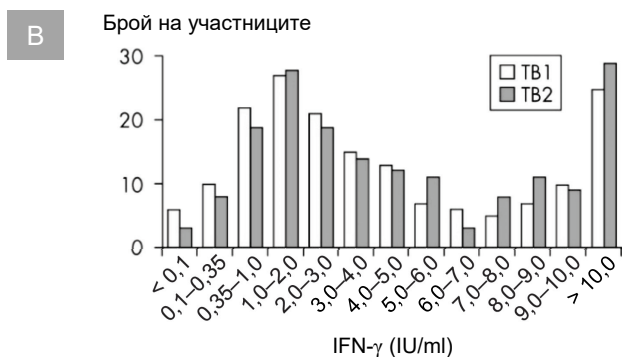
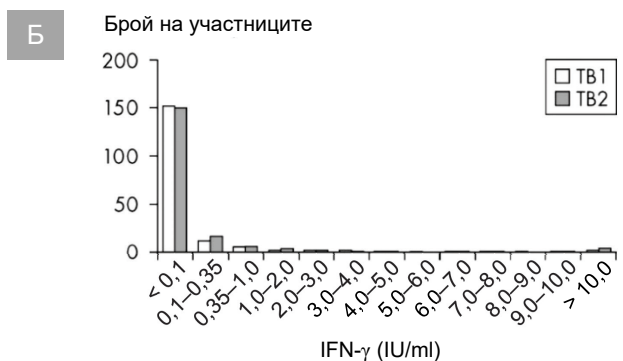
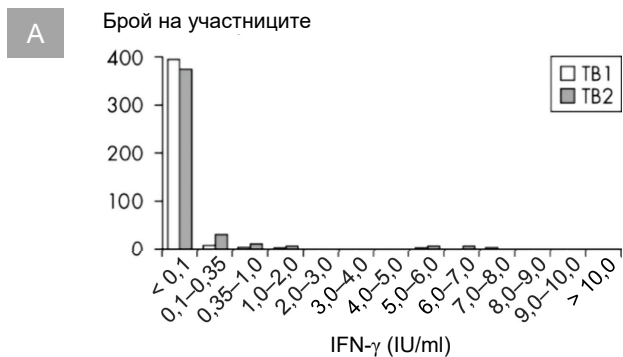


В

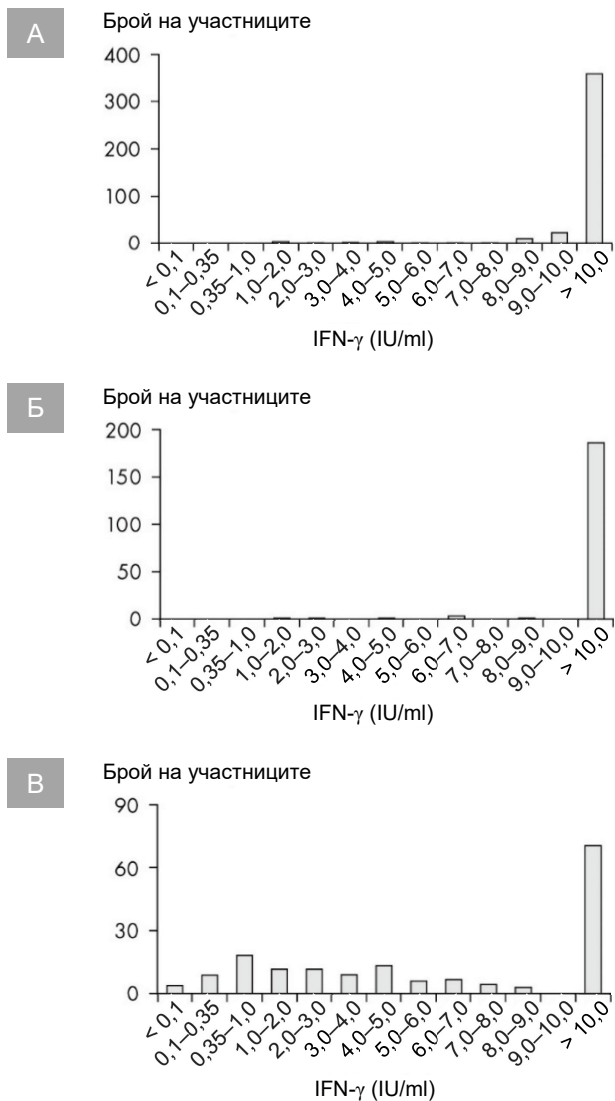
Брой на участниците



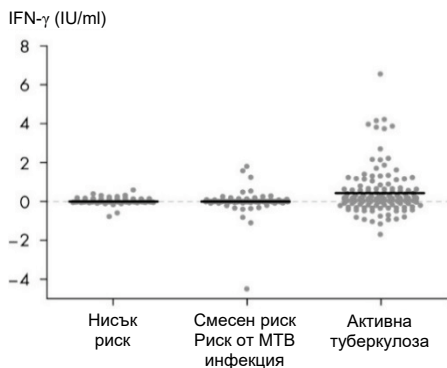
Фигура 7. Разпределение на Nil. А. Разпределение на стойности Nil в нискорискова популация (n=409). Б. Разпределение на стойности Nil в популация със смесен риск (n=194). В. Разпределение на стойности Nil в популация с потвърдена с култура инфекция с *M. tuberculosis* (n=174)



Фигура 8. Разпределение на TB1 и TB2 (нулевата извадена). А. Разпределение на стойности за TB1 и TB2 (нулевата извадена) в нискорискова популация (n=409). Б. Разпределение на стойности за TB1 и TB2 (нулевата извадена) в популация със смесен риск (n=194). В. Разпределение на стойности за TB1 и TB2 (нулевата извадена) в популация с потвърдена с култура инфекция с *M. tuberculosis* (n=174).



Фигура 9. Разпределение на Mitogen (нулевата извадена). **А.** Разпределение на стойностите за Mitogen (нулевата извадена) в нискорискова популация (n=409). **Б.** Разпределение на стойностите за Mitogen (нулевата извадена) в популация със смесен риск (n=194). **В.** Разпределение на стойностите за Mitogen (нулевата извадена) в популация с потвърдена чрез култура инфекция с *M. tuberculosis* (n=169).

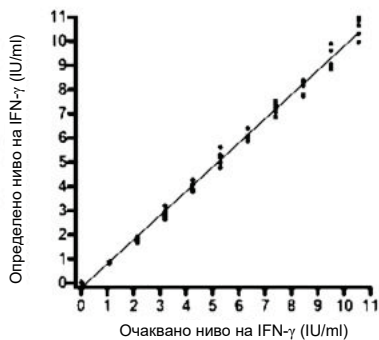


Фигура 10. Наблюдавани разлики между стойностите на TB1 и TB2 (Nil извадена), стратифицирани по риск. Нискорискова популация (n=409), популация със смесен риск (n=189) и популация с потвърдена чрез култура инфекция с *M. tuberculosis* (n=141). TB1 стойностите са извадени от TB2 стойностите. Участниците със стойности за TB1 или TB2 > 10,0 IU/ml са изключени, тъй като са извън линейния диапазон на анализа.

Работни характеристики на анализа

Доказано е, че QFT-Plus ELISA е линеен чрез поставяне на 5 репликата на 11 сборни плазмени проби с известни концентрации на IFN- γ на случаен принцип в плака за ELISA. Линейната регресионна линия е с наклон от $1,002 \pm 0,011$ и корелационен коефициент от 0,99 (Фигура 11).

Границата на откриване на QFT-Plus ELISA е 0,065 IU/ml и няма доказателства за прозонов (Hook) ефект на висока концентрация при концентрации на IFN- γ до 10 000 IU/ml.



Фигура 11. Линейен профил на QFT-Plus ELISA

Вътреаналитичната неточност и неточността между анализите (% CV) на QFT-Plus ELISA са установени чрез тестване на 20 плазмени аликутни части с различни концентрации на IFN- γ в 3 репликата, в 3 различни лаборатории, в 3 непоследователни дни и от 3-ма оператори. По този начин всяка аликутна част е тествана 27 пъти в 9 независими работни цикъла на анализа. Една аликутна част е нулевата контрола и е с изчислена концентрация на IFN- γ от 0,08 IU/ml (95% CI: 0,07–0,09). При останалите 19 плазмени аликутни части диапазонът на концентрациите е 0,33 (95% CI: 0,31–0,34) до 7,7 IU/ml (95% CI: 7,48–7,92).

Неточността в рамките на работния цикъл или вътреаналитичната неточност е определена приблизително чрез усредняване на % CV за всяка тестова плазма, съдържаща IFN- γ от всеки работен цикъл на плаката ($n = 9$), като неточността е в диапазона от 4,1 до 9,1 % CV. Средната ковариация в рамките на работния цикъл ($\pm 95\%$ CI) е $6,6\% \pm 0,6\%$. Средната стойност на нулевата IFN- γ плазма е 14,1% CV.

Общата неточност или неточността между анализите е определена чрез сравняване на 27 изчислени концентрации на IFN- γ за всяка тестова плазма. Неточността между анализите е в диапазона от 6,6 до 12,3% CV. Общият среден % CV ($\pm 95\%$ CI) е $8,7\% \pm 0,7\%$. Нулевата IFN- γ плазма показва 26,1% CV. Това ниво на вариация е очаквано, тъй като изчислената концентрация на IFN- γ е ниска и вариацията около ниска приблизителна оценка ще е по-голяма от тази при по-високи концентрации.

Възпроизводимостта на теста QFT-Plus е определена чрез използване на кръвни аликутни части от 102 участници със смесени рискови фактори за инфекция с *M. tuberculosis*. Оценени са трима различни оператори и лабораторни условия.

Направени са общо 3 диагностични определения за всеки участник и 306 общо за всички участници. Общата възпроизводимост е 99% (95% CI: 97,2–99,7), като диагностичният резултат е съответстващ за 303 от 306 определения. Резултатите за 3-ма участници са близо до граничната стойност, вземаща предвид всички вариации.

Диагноза на ЛТБИ

Публикувани са голям брой проучвания, които доказват ефективността на QFT, предшественика на QFT-Plus, при различни популации с риск за инфекция с МТВ. Основните находки на някои подбрани проучвания са показани в Таблица 7.

Таблица 7. Подбрани публикувани проучвания за QFT

Популация/ състояние	Резултати и находки	Общ брой на публикуваните проучвания
Педиатрия	Доказана ефективност при деца, включително деца под 5-годишна възраст (45–46), с по-висока точност от ELISpot-базирания IGRA (8). Най-голямото до момента проучване, сравняващо QFT и ТКТ при деца от Виетнам, Филипините и Мексико, поддържа преференциалната употреба на QFT спрямо ТКТ за изследване на родени извън страната деца за ЛТБИ (46). Проучване с ограничен контакт показва по-добра предиктивна стойност от ТКТ при деца (47) и 8-кратно по-висок риск от прогресиране до туберкулозно заболяване в рамките на две години при децата с QFT конверсия в сравнение с тези без конверсия (48). Несъответствието между QFT-отрицателните/ТКТ-положителните резултати е по-високо при ваксинираните с BCG деца (46, 49), но това не оказва влияние върху отговора към Mitogen при деца под 5-годишна възраст (49) и нисък процент на неопределени резултати при рутинен скрининг на деца имигранти (46).	152
Бременност	В условия с нисък товар ефективността на QFT е еднакво добра във всеки триместър на бременността, като резултатите са сравними с тези от небременни жени. Тестът е с по-голяма специфичност, поне същата чувствителност и може да е по-добър предиктор на прогресирането до заболяване, отколкото ТКТ (50). в условия на висок товар QFT е по-стабилен по време на цялата бременност и оценява по-точно фоновата болестност от ЛТБИ в сравнение с ТКТ, независимо че авторите заключават, че бременността повлиява както QFT, така и ТКТ (51).	6

Таблицата продължава на следващата страница

Таблица 8. Подбрани публикувани проучвания за QFT(продължение)

Популация/ състояние	Резултати и находки	Общ брой на публикуваните проучвания
HIV/СПИН	Както IGRA, така и ТКТ се повлияват от HIV инфекция и наличните доказателства предполагат, че трябва да се обръща особено внимание при интерпретиране на резултатите при лицата с брой на CD4+ < 200 (52). Доказано е, че QFT се повлиява по-малко от ELISpot-базирания IGRA и ТКТ (53–55). Необходимостта от едно посещение за IGRA разрешава проблема при ТКТ от ниския процент на идващите отново лица в тази популация (53).	101
Имуносупресивни терапии	QFT се повлиява в по-малка степен от имуносупресивните терапии в сравнение с ТКТ и корелира по-добре с рисковите фактори за туберкулоза (23, 27). QFT е с по-висока чувствителност при пациентите с ревматично заболяване (23; 56, 57) и по-висока специфичност от ТКТ, като намалява до минимум фалшиво положителните резултати и намалява ненужните лечения, които биха били проведени при изследване с ТКТ (23, 57, 58).	112
Медицински работници	Доказано е, че е с по-голяма специфичност с по-малко фалшиво положителни резултати от ТКТ и е по-рентабилен от ТКТ (59–62). Променливостта около прага е очаквана находка при серийно тестване поради дихотомната гранична точка и присъщата променливост на биологичните тестове (63). Проучванията показват по-високи коефициенти на конверсия/реверсия в сравнение с ТКТ при серийно тестване на нискорискови медицински работници (64, 65). Центровете за контрол и превенция на заболяванията (CDC) в САЩ вземат предвид, че не толкова строгият критерий за дефиниране на IGRA конверсията може да генерира по-висока конверсия от наблюдаваната при по-стриктния количествен критерий на ТКТ, като е доказано, че стратегиите за повторно тестване са по-ефективни за контролиране на феномена на конверсия/реверсия (65–68).	111
Контактни с туберкулоза	По-високи положителни предиктивни стойности (PPV) и отрицателни предиктивни стойности (NPV) от ТКТ (47); удобство с едно посещение за лицата, при които има малка вероятност да се върнат за повторно посещение (63), по-добра корелация с експозицията (69), което се забелязва особено при ваксинираните с BCG лица и популациите от страните с ваксинация с BCG (70, 71).	89

Таблицата продължава на следващата страница

Таблица 9. Подбрани публикувани проучвания за QFT(продължение)

Популация/ състояние	Резултати и находки	Общ брой на публикуваните проучвания
Трансплантация	Доказано е, че е поне толкова ефективен, колкото ТКТ, но се повлиява в по-малка степен от терминална органна недостатъчност в сравнение с ТКТ (22).	23
Диабет	Противоречиви данни от малък брой публикации с ограничен брой участници. Проучване от област с нисък товар установи, че чувствителността на QFT не е се компрометираща от диабет при пациентите с туберкулоза (72). Проучване от Танзания, среда с висок товар, предполагащо отрицателен ефект на диабета върху производството на IFN- γ , не взема предвид смущаващи фактори като HIV и хелминтни инфекции (73). в проучвания във Виетнам 838 диабетичи, съобщили сами за заболяването си, със съмнение за туберкулоза поради абнормни CXR или потвърждение с култура за активна туберкулоза (n=128), положителните резултати на QFT са равни или по-големи от граничните точки на ТКТ от 10 и 15 mm (74).	9
Терминална бъбречна недостатъчност	Положителните резултати от QFT корелират с рисковите фактори за туберкулоза по-добре от ТКТ и се свързват в по-малка степен с BCG (75).	45
Мигранти	Проучванията показват, че QFT не се повлиява от BCG и възрастта за разлика от ТКТ (74). Доказано е, че QFT е най-рентабилният метод (76). в условия с нисък товар по-голямата част от туберкулозните заболявания е от родени извън страната лица и от реактивиране на латентна туберкулоза след пристигане (77). Най-голямото до момента проучване, сравняващо QFT и ТКТ при деца имигранти, подкрепя преференциалната употреба на QFT спрямо ТКТ за тестване на родени извън страната деца за ЛТБИ (46).	29

Техническа информация

Неопределени резултати

Неопределените резултати са нечести и може да са свързани с имунния статус на тестваното лице, но може и да са свързани с няколко технически фактора, ако не се спазват горепосочените инструкции.

При съмнение за технически проблеми при съхранението на реактивите, вземането на кръв или работата с кръвните алиquotни части повторете целия тест QFT-Plus с нова кръвна проба. Повторното ELISA тестване на стимулирани плазми може да се извърши при съмнение за недостатъчно промиване или други отклонения от процедурата на теста ELISA. Не се очаква неопределените тестове в резултат на ниски стойности на Mitogen или високи стойности на Nil да се променят при повторно тестване, освен при грешка в ELISA тестването. Неопределените резултати трябва да се докладват такива, каквито са. Лекарите могат да изберат да изтеглят повторно проба или да извършат други процедури по целесъобразност.

Плазмени алиquotни части със съсиреци

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

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. За повече информация вижте също техническата информация, предоставена на www.QuantiFERON.com. За информация за контакти вижте задната корица.

Отстраняване на проблеми при ELISA

Неспецифично оцветяване

Възможна причина	Решение
а) Непълно промиване на плаката	Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 μ л/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на наkisване от най-малко 5 секунди между циклите.
б) Кръстосано замърсяване на ямките за ELISA	Внимавайте при пипетирането и смесването на аликвотната част за свеждане на риска до минимум.
в) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност	Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100x концентрата се използват в рамките на три месеца сред датата на разтварянето.
г) разтворът на ензимен субстрат е замърсен	Изхвърлете субстрата при наличие на синьо оцветяване. Уверете се, че се използват чисти резервоари за реактиви.
д) Смесване на плазмата в епруветки за QFT-Plus преди събирането ѝ	След центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.

Ниски отчитания на оптичната плътност за стандартите

Възможна причина	Решение
а) Грешка при разреждането на стандарта	Уверете се, че разрежданията на стандарта на набора са извършени правилно съгласно настоящата листовка.
б) Грешка при пипетирането	Уверете се, че пипетите са калибрирани и се използват съгласно инструкциите на производителя.
в) Температурата на инкубиране е прекалено ниска	Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
г) Времето на инкубиране е твърде кратко	Инкубирането на плаките с конюгат, стандарти и аликвотни части трябва да е за 120 ± 5 минути. Разтворът на ензимен субстрат се инкубира в плаката за 30 минути.

Отстраняване на проблеми при ELISA

- | | |
|--|--|
| д) Използван е неправилен филтър на четеца за плаки | Плаките трябва да се отчитат при 450 nm с референтен филтър между 620 и 650 nm. |
| е) Реактивите са твърде студени | Всички реактиви, с изключение на конюгат 100x концентрата, трябва да се темперират до стайна температура преди започване на анализа. Това отнема около един час. |
| ж) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100x концентрата се използват в рамките на 3 месеца сред датата на разтварянето. |

Висок фон

- | Възможна причина | Решение |
|--|---|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на наkisване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Температурата на инкубиране е твърде висока | Инкубирането на ELISA трябва да се извърши при стайна температура (22°C ± 5°C). |
| в) Наборът/компонентите са с изтекъл срок на годност | Уверете се, че наборът се използва преди изтичане на срока на годност. Уверете се, че разтворените стандарт и конюгат 100x концентрата се използват в рамките на 3 месеца сред датата на разтварянето. |
| д) Разтворът на ензимен субстрат е замърсен | Изхвърлете субстрата при наличие на синьо оцветяване. Уверете се, че се използват чисти резервоари за реактиви. |

Нелинейна стандартна крива и променливост на двойните проби

- | Възможна причина | Решение |
|---|---|
| а) Непълно промиване на плаката | Промийте плаката най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер. Може да са необходими повече от 6 цикъла на промиване в зависимост от използваното промивно устройство. Трябва да се използва период на наkisване от най-малко 5 секунди между циклите. |
| б) Грешка при разреждането на стандарта | Уверете се, че разрежданията на стандарта са извършени правилно съгласно настоящата листовка. |
| в) Лошо смесване | Смесвайте добре реактивите чрез обръщане или леко разбъркване преди прибавянето им към плаката. |
| д) Непостоянна техника на пипетиране или прекъсване по време на извършване на анализа | Прибавянето на аликвотната част и стандарта трябва да се извършва без прекъсване. Всички реактиви трябва да бъдат приготвени преди началото на анализа. |

Информация за продукта и технически справочници се предлагат безплатно от QIAGEN или чрез Вашия дистрибутор, или като посетите www.QuantiFERON.com.

Библиография

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 645.
3. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur. Respir. J.* 33, 586.
4. Bocchino, M. et al. (2008) Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27,907.
5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir. Res.* 7, 56.
6. Chun, J.K. et al. (2008) The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 389.
7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 3, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.
8. Detjen, A.K. et al. (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 45, 322.

-
9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot. TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* 135, 1010.
 10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 1164.
 11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir. Res.* 7, 77.
 12. Dogra, S. et al. (2007) Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J. Infect.* 54, 267.
 13. Drobniowski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 4, e55.
 14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology* 13, 270.
 15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J. Infect.* 56, 348.
 16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 33.
 17. Kang, Y.A. et al. (2005) Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* 293, 2756.

-
18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 1146.
 19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss. Med. Wkly.* 138, 267.
 20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 737.
 21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* 146, 761.
 22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 7, 2797.
 23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 84.
 24. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 513.
 25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. *Emerging Infect. Dis.* 12, 1383.
 26. Pai, M. et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. *JAMA* 293, 2746.

-
27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol.* 35, 776.
 28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur. Respir. J.* 32, 524.
 29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 3, 981.
 30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2799.
 31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin. Biochem.* 40, 913.
 32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, 681.
 33. Turner, J. et al. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. *Immunology* 87, 339.
 34. Brookes, R.H. et al. (2003) CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. *Eur. J. Immunol.* 33, 3293.
 35. Stenger, S. et al. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282, 121.

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

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














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

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

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

СИМВОЛИ

Върху опаковката и етикетите може да са изобразени следните символи:

Символ	Определение на символа
 2 × 96	Достатъчно за 2 × 96 подготовки на аликвотни части
	Законен производител
	Символ за CE-IVD маркировка
	За ин витро диагностика
	Код на партида
	Каталожен номер
	Глобален номер на търговска единица
	Годно до
	Ограничение за температурата
	Направете справка с инструкциите за употреба
	Да не се използва повторно
	Да се пази от слънчева светлина
	Номер на материала
Rn	„R“ означава редакция на Инструкциите за употреба, а „n“ е номерът на редакцията

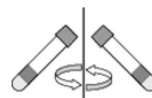
Информация за контакт

За техническа помощ и повече информация позвънете на безплатния телефон 00800-22-44-6000, вижте нашия център за техническа поддръжка на **www.qiagen.com/contact** или се свържете с един от отделите за техническа поддръжка на QIAGEN (вижте задната корица или посетете **www.qiagen.com**).

Съкратена процедура на теста

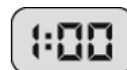
Етап 1 – инкубиране на кръвта

1. Вземете кръв от пациента в епруветките за вземане на кръв и ги смесете, като разклатите епруветките десет (10) пъти, само толкова силно, колкото да се гарантира, че цялата вътрешна повърхност на епруветката е покрита с кръв. По този начин могат да се разтворят антигените по стените на епруветката.
2. Инкубирайте епруветките изправени при $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ за 16 до 24 часа.
3. След инкубирането центрофугирайте епруветките за 15 минути при 2000 до 3000 $\times g$ RCF (g) с цел разделяне на плазмата и еритроцитите.
4. След центрофугирането избягвайте изтегляне и накапване или смесване на плазмата по какъвто и да е начин преди събирането на плазмата. Винаги внимавайте да не нарушавате материала по повърхността на гела.



Етап 2 – IFN- γ ELISA

1. Темперирайте ELISA компонентите, с изключение на конюгата 100x концентрат, до стайна температура ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) за най-малко 60 минути.

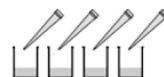


2. Разтворете стандарта на набора до 8,0 IU/ml с дестилирана или дейонизирана вода. Подгответе четири (4) разреждания на стандарта.



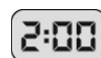
3. Разтворете лиофилизирания конюгат 100X концентрат с дестилирана или дейонизирана вода.

4. Пригответе конюгат с работна концентрация в зелен разредител и добавете 50 µl във всяка ямка.



5. Добавете 50 µl от тестовите плазмени аликвотни части и 50 µl стандарти в съответните ямки. Смесете с шейкър.

6. Инкубирайте за 120 ± 5 минути при стайна температура.



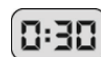
7. Промийте ямките най-малко 6 пъти с 400 µl/ямка от промивния буфер.



8. Добавете 100 µl разтвор на ензимен субстрат в ямките. Смесете с шейкър.



9. Инкубирайте за 30 минути при стайна температура.



10. Добавете 50 µl ензимен стопиращ разтвор във всички ямки..



11. Отчетете резултатите при 450 nm с референтен филтър 620 до 650 nm.



12. Анализирайте резултатите.



Значими промени

Раздел	Страница	Промяна (Промени)
Различни	Различни	Добавени инструкции, свързани с използването на епруветките с литиев хепарин или натриев хепарин
Различни	Различни	Добавени инструкции, свързани с работния процес за вземане на кръв при температура 2–8°C
Различни	Различни	Капакът за плаки сега е необходим, но непредоставен материал

Хронология на редакциите на ръководството

Документ	Промени
R6 04/2019	Промени по отношение литиевия хепарин/натриевия хепарин Нови инструкции за работа, свързани с работния процес за вземане на кръв при температура 2–8°C Капаците за плаки са отстранени от плаките за QF

Търговски марки: QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (Група QIAGEN); Microsoft®, Excel® (Microsoft); ProCin® (Rohm and Haas Co.).

Ограничено лицензионно споразумение за QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA

Използването на продукта означава, че закупилите или използващите продукта лица приемат следните условия:

1. Този продукт може да се използва единствено в съответствие с протоколите, предоставени с продукта и настоящата листовка, както и само с компонентите, включени в набора. QIAGEN не предоставя лиценз във връзка с никоя от интелектуалните си собствениности за използване или включване на приложените компоненти в този панел с каквито и да е компоненти, които не са включени в него, с изключенията, описани в протоколите, предоставени с продукта и настоящата листовка.
2. Освен изрично посочените лицензи QIAGEN не дава никаква гаранция, че този панел и/или неговата употреба(и) не нарушават права на други производители.
3. Този набор и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават, освен ако не е посочено друго от QIAGEN.
4. QIAGEN изрично се освобождава от всички други лицензи, изрични или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора дават съгласие да не предприемат или позволяват на други лица да предприемат действия, които могат да доведат до или да улеснят някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да приложи забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всичките си разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатски honorari, при всяко действие за прилагане на Ограниченото лицензно споразумение или някое от правата върху интелектуална собственост, свързани с набора и/или неговите компоненти.

За актуалните условия на лиценза вижте www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, всички права запазени.

www.QuantiFERON.com

Азиатско-тихоокеанския регион | techservice-ap@qiagen.com

Европа | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Средния изток/Африка | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Латинска Америка (без Бразилия или Мексико) | techservice-latam@qiagen.com

Забележки

Забележки

