

НАБОР

ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА К ПЕПТИДНЫМ АНТИГЕНАМ ESAT-6, CFP-10 И TB7.7(P.4) ПО УРОВНЮ ПРОДУКЦИИ ИНТЕРФЕРОНА ГАММА (IFN-Г) В ПРОБИРКАХ С ОБРАЗЦАМИ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

0594-0201, QuantiFERON-TB Gold

Каталог. № : 0594-0201

Методика от 07-2012

Количество : 96

Производитель: Cellestis, (Германия)



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT) предназначен для диагностики *in vitro*. Метод основан на использовании стимулирующей смеси белков ESAT-6, CFP-10 и TB7.7 (p4) для стимуляции клеток гепаринизированной цельной крови. Количественное определение интерферона гамма (IFN-γ) методом иммуноферментного анализа (ELISA, ИФА) используется для выявления *in vitro* клеточного ответа на стимуляцию этими пептидными антигенами, ассоциированными с инфекцией *Mycobacterium tuberculosis*.

QuantiFERON®-TB Gold QFT является непрямым методом выявления инфекции *M. tuberculosis* (включая заболевание) и предназначен для использования в сочетании с оценкой риска наличия инфекции, радиографией и другими клиническими и лабораторными исследованиями.

2. РЕЗЮМЕ И ОПИСАНИЕ ТЕСТА

Туберкулез является инфекционным заболеванием, вызываемым комплексом *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), обычно передается воздушно-капельным путем при контакте с больными легочной формой туберкулеза. Вновь инфицированный человек может заболеть туберкулезом через несколько недель или месяцев, но большая часть инфицированных людей остается здоровыми. Латентная туберкулезная инфекция (LTBI), неконтагиозное асимптоматическое состояние, персистирует, и туберкулез может развиваться спустя месяцы или годы. Основной целью диагностики LTBI является необходимость назначения профилактической терапии для предотвращения развития туберкулеза. До недавнего времени кожный тест с туберкулином (TST) был единственным методом диагностики LTBI. Кожная чувствительность к туберкулину развивается через 2 – 10 недель после инфекции. Однако у некоторых инфицированных людей, включая больных с различными нарушениями иммунной системы, и здоровых людей, нет ответа на туберкулиновый тест. И, наоборот, у некоторых людей, у которых с очень высокой вероятностью нет инфекции *M. tuberculosis*, обнаруживается чувствительность к туберкулину, и наблюдаются положительные результаты TST после вакцинации BCG, инфицировании другой микобактериальной инфекцией (отличной от комплекса *M. tuberculosis*) или из-за других неизвестных факторов.

LTBI необходимо дифференцировать с заболеванием туберкулезом (состоянием, подлежащим регистрации, при котором обычно поражаются легкие и нижний отдел дыхательных путей, хотя могут быть затронуты и другие органы). Диагностика туберкулеза основывается на данных истории болезни пациента, результатах клинических, радиологических, гистологических и бактериологических исследований.

Метод QFT предназначен для оценки клеточного иммунного ответа (СМ) на стимуляцию пептидными антигенами – микобактериальными белками. Эти белки, ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4), отсутствуют во всех BCG-штаммах и в большинстве нетуберкулезных микобактерий, за исключением *M. kansasii*, *M. szulgai* и *M. marinum*¹. В крови людей, инфицированных комплексом *M. tuberculosis*, обычно присутствуют 10⁸ лимфоциты, распознающие эти и другие микобактериальные

антигены. Этот процесс распознавания включает образование и секрецию цитокина IFN-γ. Тест основан на количественном определении IFN-γ.

В качестве стимулирующей смеси антигенов в данном методе QFT использованы белки ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4). Многочисленные исследования показали, что эти пептидные антигена стимулируют IFN-γ Т-клеточный ответ у людей, инфицированных *M. tuberculosis*, но в общем случае не стимулируют такого ответа у неинфицированных людей или людей, прошедших BCG-вакцинацию, здоровых лиц или лиц с низким риском LTBI¹⁻³⁴. Однако лечение или условия, которые ослабляют иммунную систему, потенциально могут снизить ответ IFN-γ. У пациентов, постоянно страдающих другими микобактериальными инфекциями, может наблюдаться ответ на стимуляцию антигенами ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4), так как гены, кодирующие эти белки, присутствуют у нетуберкулезных микобактерий *M. kansasii*, *M. szulgai* и *M. marinum*^{1,22}. Данный метод QFT может быть использован как для выявления LTBI, так и в целях диагностики инфекции комплексом *M. tuberculosis* у больных пациентов. Положительный результат свидетельствует в пользу диагноза туберкулеза; однако, инфекции другими микобактериями (например, *M. kansasii*) могут быть причиной положительных результатов. Для подтверждения или исключения диагноза туберкулеза необходимы другие клинические и лабораторные исследования.

Принципы работы анализа

Система QFT основана на использовании специальных пробирок для сбора крови. Кровь инкубируют в этих пробирках в течение 16-24 часов, затем собирают плазму и определяют уровень IFN-γ, секретированного в ответ на стимуляцию пептидными антигенами.

Тест QFT выполняется в два этапа. На первом этапе кровь собирают в пробирку QFT, поставляемые в наборе, которые включают в себя пробирку для отрицательного контроля (Nil Control tube, Nil-пробирка), пробирку с ТВ-антигеном и пробирку с митогеном для положительного контроля.

При постановке теста QFT пробирку с митогеном можно использовать в качестве положительного контроля. Это особенно полезно, если есть сомнения относительно иммунного статуса пациента. Пробирка с митогеном также служит для контроля правильности сбора и инкубации образца крови.

Пробирки необходимо поставить на инкубацию, при 37°C как можно быстрее, не позднее, чем через 16 часов после сбора образца. После инкубации в течение 16- 24 часов пробирки центрифугируют, отбирают плазму и измеряют концентрацию IFN-γ (МЕд/мл) иммуноферментным методом (ИФА, ELISA).

Результат считается положительным ответом IFN-γ на стимуляцию, если концентрация IFN-γ в МЕд/мл в пробирке с ТВ-антигеном значительно выше концентрации в Nil-пробирке. Если была использована плазма, стимулированная митогеном, служащая положительным контролем IFN-γ для соответствующего протестированного образца:

Низкий ответ на митоген (<0.5 МЕд/мл) указывает на неопределенный результат, если для образца крови получен отрицательный результат стимуляции ТВ-антигеном. Такая картина может наблюдаться при:

- недостаточном количестве лимфоцитов,
- сниженной активности лимфоцитов из-за неправильного сбора, обработки образцов, наполнения/перемешивания пробирки с митогеном,
- или неспособности лимфоцитов пациента продуцировать IFN-γ.

Nil-пробирку используют для определения фонового уровня, влияния гетерофильных антител или неспецифического IFN-γ в образцах крови. Концентрацию IFN-γ в Nil-пробирке вычитают из концентрации IFN-γ в пробирке с ТВ-антигеном и в пробирке с митогеном.

Время, необходимое для проведения анализа

Время, необходимое для проведения анализа, приблизительно указано ниже; время для тестирования большего количества образцов, также указано:

37 °C Инкубация пробирок с кровью

16-24 часа

ИФА:

Приблизительно 3 часа для одного ИФА планшета (от 28 до 44 пациентов)

- <1 часа работы
- Добавить 10-15 минут на каждый дополнительный планшет

3. РЕАГЕНТЫ И ИХ ХРАНЕНИЕ

Пробирки с туберкулезным антигеном и контрольные пробирки для сбора образцов

Кат №: T0590 0301

1. Контрольные пробирки (Nil-пробирки, серая крышка): 100 пробирок
2. Пробирки с ТВ-антигеном (красная крышка): 100 пробирок
3. Пробирки с митогеном (лиловая крышка): 100 пробирок

ЗАМЕЧАНИЕ: можно заказать другие варианты пробирок:

Кат. № 0590 0201: 100 Nil-пробирок, 100 ТВ-антиген-пробирок

Кат. № 0593 0201: 100 пробирок с митогеном

Высотные пробирки (см. раздел 5)

Кат. № 0590 0501: (высотные) 100 Nil-пробирок, 100 ТВ-антиген пробирок

Кат. № 0590 0505: (высотные) 100 Nil-пробирок, 100 ТВ-антиген пробирок и 100 пробирок с митогеном

Кат. № T0593 0501: (высотные) 100 пробирок с митогеном

Компоненты для ИФА (ELISA)

Компоненты для ИФА	Кат. №: 0594-0201	Кат. №: 0594-0201
	Набор из 2-х планшетов	Контрольная Лабораторная упаковка
1. Микропланшетные стрипы, покрытые мышинным анти-человеческим IFN-γ моноклональным антителом	2 x 96-луночных планшета	20 x 96-луночных планшетов
2. Стандарт человеческого IFN-γ, лиофилизированный (содержит рекомбинантный человеческий IFN-γ, бычий казеин, 0.01% w/v Тимеросал)	1 флакон (8 МЕД/мл после разведения)	10 флаконов (8 МЕД/мл после разведения)
3. Зеленый буфер для разведения (содержит бычий казеин, нормальную сыворотку мыши, 0.01% w/v Тимеросал)	1 x 30 мл	10 x 30 мл
4. Конъюгат 100X Концентрат, лиофилизированный (содержит мышинный анти-человеческий IFN-γ HRP, бычий казеин, 0.01% w/v Тимеросал)	1 x 0.3 мл (после разведения)	10 x 0.3 мл (после разведения)
5. Промывочный буфер 20X Концентрат (pH 7.2, содержит 0.05% w/v Проклин 300)	1 x 100 мл	10 x 100 мл
6. Раствор ферментного субстрата (содержит H ₂ O ₂ , ТМБ)	1 x 30 мл	10 x 30 мл
7. Ферментный Стоп-раствор (содержит 0.5M H ₂ SO ₄)	1 x 15 мл	1 x 15 мл

Необходимые, но не поставляемые материалы и оборудование

- Инкубатор на 37°C. CO₂ не требуется.
- Калиброванные пипетки различных объемов для внесения объемов от 10 мкл до 1000 мкл со сменными одноразовыми наконечниками.
- Калиброванные многоканальные пипетки для внесения объемов 50 мкл и 100 мкл со сменными одноразовыми наконечниками.
- Микропланшетный шейкер.
- Деионизированная или дистиллированная вода – 2 л.
- Микропланшетный вошер (рекомендуется автоматическая промывка).
- Микропланшетный ридер с фильтрами на 450 нм и 620 нм – 650 нм (в качестве референсного).

Инструкции по Хранению Пробирки для сбора образцов крови

- Хранить пробирки для сбора крови при температуре 4 – 25 °C

Реагенты набора

- Хранить реагенты набора при температуре 2 - 8°C.
- Всегда защищать раствор ферментного субстрата от прямых солнечных лучей.

Растворенные и неиспользованные реагенты

Инструкции по приготовлению рабочего разведения реагентов приведены в разделе 6.

- Растворенные стандарты набора могут храниться до 3 месяцев при 2°C - 8°C.
 - *Запишите дату растворения стандартов набора.*
- После растворения неиспользованный концентрат 100X конъюгата необходимо хранить при 2°C - 8°C, и он должен быть использован в течение 3 месяцев.
 - *Запишите дату растворения конъюгата.*
- Рабочий раствор конъюгата должен быть использован в течение 6 часов после приготовления.
- Разведенный буфер для промывок может храниться при комнатной температуре в течение 2 недель.

4. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

- Отрицательный результат теста QFT не исключает возможности инфекции *M. Tuberculosis* или заболевания туберкулезом. Ложноотрицательные результаты могут быть получены в зависимости от стадии инфекции: например, образцы получены перед развитием клеточного иммунного ответа, сопутствующего заболевания (влияющего на функцию иммунной системы), неправильной работы с образцами и пробирками для сбора образцов после взятия крови, неправильной постановки анализа или других причин.
- Положительный результат анализа QFT не должен быть единственным основанием для определения диагноза инфекции *M. tuberculosis*. Неправильное выполнение анализа может быть причиной ложноположительных результатов.
- Положительный результат анализа QFT должен служить основанием для проведения дополнительных клинических исследований и диагностических процедур для выявления активной формы туберкулеза (например, окраска по Цилю-Нильсену и культуральные исследования, рентгеновское исследование грудной клетки).
- Ограничение: хотя ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4) отсутствуют во всех штаммах BCG и практически во всех известных нетуберкулезных микобактериях, положительный результат QFT может быть получен при инфекции *M. kansasii*, *M. szulgai* или *M. marinum*. Если предполагается наличие этих инфекций, то для исследований необходимо выбрать другой метод.

Меры предосторожности

- **Только для диагностики *in vitro*.**
- **Опасные вещества: Раствор ферментного субстрата** содержит 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, который опасен при проглатывании, вдыхании и контакте с кожей. Раздражает кожу и глаза. Мутаген. Используйте соответствующую защиту для глаз, перчатки, и обращайтесь с реагентом, как с потенциальным канцерогеном.
- **Опасные вещества: Стоп-раствор** содержит H₂SO₄, это кислота, которая опасна при проглатывании, контакте с глазами и кожей. Используйте соответствующую защиту для глаз, перчатки и лабораторную защитную одежду. При контакте стоп-раствора с кожей или глазами немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью.
- **Опасные вещества: Стандарты IFN-γ концентрат 100X конъюгата** могут вызвать недомогание при проглатывании и раздражение кожи. Используйте лабораторные перчатки и соответствующую защитную одежду.
- **Обращайтесь с человеческой кровью как с потенциально инфекционно опасным материалом.** Соблюдайте необходимые рекомендации по работе с образцами крови.
- **Тимерозал** использован в качестве консерванта в некоторых реагентах набора. Он может быть токсичен при проглатывании, вдыхании или контакте с кожей.
- **Зеленый буфер для разведения** содержит нормальную мышиную сыворотку и казеин, которые могут вызывать аллергическую реакцию; избегайте контакта с кожей.
- Отклонения от инструкций, данных в данном руководстве, могут привести к получению недостоверных результатов. Пожалуйста, тщательно ознакомьтесь с инструкцией перед началом анализа.
- Не используйте набор, если на каком-либо из флаконов набора имеются видимые повреждения или признаки протекания.
- Не смешивайте и/или не используйте реагенты для ИФА (ELISA) из наборов QuantiFERON®-TB Gold других лотов.
- Утилизируйте неиспользованные реагенты и биологические образцы в соответствии с локальными, региональными и федеральными требованиями.

- Не используйте пробирки для сбора образцов или реагенты для ИФА после истечения срока годности.

5. СБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ

В методе QFT используются следующие пробирки для сбора образцов:

1. Пробирки нулевого контроля (Nil-пробирки) (серая крышка с белым кольцом) (используйте в диапазоне высоты от уровня моря до 810 м)
2. Пробирки с ТВ-антигеном (красная крышка с белым кольцом) (используйте в диапазоне высоты от уровня моря до 810 м)
3. Контрольные пробирки с митогеном (лиловая крышка с белым кольцом) (используйте в диапазоне высоты от уровня моря до 810 м)
4. Пробирки нулевого контроля (Nil-пробирки) (серая крышка с желтым кольцом) (используйте в диапазоне высоты от 1020 м до 1875 м)
5. Пробирки с ТВ-антигеном (красная крышка с желтым кольцом) (используйте в диапазоне высоты от 1020 м до 1875 м)
6. Контрольные пробирки с митогеном (лиловая крышка с желтым кольцом) (используйте в диапазоне высоты от 1020 м до 1875 м).

Антигены были сорбированы на внутренних стенках пробирок для сбора образцов крови, и очень важно, чтобы содержимое пробирок было тщательно перемешано с образцами крови. Пробирки необходимо поместить в инкубатор на 37 °С как можно быстрее после взятия образца и не позднее чем через 16 часов.

Для получения оптимальных результатов необходимо выполнять следующие рекомендации:

1. У каждого пациента методом стандартной венопункции соберите по 1 мл крови непосредственно в каждую пробирку для сбора образцов QFT. Процедура должна проводиться опытным флеботомистом.
 - Обычные пробирки для сбора образцов QuantiFERON® могут быть использованы при работе на высоте не более 810 метров. Высотные (НА) пробирки для взятия образцов крови QuantiFERON® могут быть использованы при работе на высоте от 1020 до 1875 метров.
 - При использовании пробирок для сбора образцов QuantiFERON® вне указанных диапазонов высоты или при слабом токе крови, образцы крови можно собрать с помощью шприца и немедленно перенести по 1 мл в каждую из трех пробирок. Из соображений безопасности эту процедуру лучше выполнять, сняв иглу со шприца, с соблюдением необходимых мер предосторожности, затем открыть крышки трех QFT-Gold IT пробирок и внести по 1 мл крови в каждую пробирку (до черной отметки на этикетке на стенке пробирки). Аккуратно закройте крышки пробирок и перемешайте как описано ниже.
 - Так как пробирки объемом 1 мл наполняются кровью достаточно медленно, оставьте пробирку на игле еще на 2-3 секунды после того, как пробирка кажется уже полной, чтобы убедиться, что собран необходимый объем. Черная отметка на стенке пробирки указывает объем 1 мл. Пробирки для сбора крови QuantiFERON®-TB Gold предназначены для сбора образцов объемом 0.8 - 1.2 мл. Если уровень крови в какой-либо пробирке не совпадает с отметкой, рекомендуется получить другой образец крови.
 - Если для сбора образца используется игла-бабочка, то необходимо использовать промежуточную пробирку, чтобы убедиться в заполнении иглы перед использованием пробирок QuantiFERON®-TB Gold.
 - Альтернативно, образец крови может быть собран в обыкновенную пробирку для забора крови, содержащую литиевый гепарин в качестве антикоагулянта, и затем перемещен в пробирки QFT. **Использовать только Литиевый Гепарин** в качестве антикоагулянта крови, так как другие антикоагулянты вмешиваются в работу анализа. Заполнить пробирку для забора крови (**минимальный объем 5 мл**) и осторожно перемешать переворачиванием пробирки несколько раз для растворения гепарина. Кровь должна храниться при температуре окружающей среды (22 °С ± 5 °С) перед перемещением ее в пробирки QFT для инкубации, которая **должна быть** проведена не позднее 16 часов после забора крови.

2. Немедленно после заполнения пробирок, интенсивно перемешав 10 раз, чтобы быть уверенным, что внутренняя поверхность пробирки полностью покрыта кровью, чтобы растворить антигены на стенках пробирки.
 - Пробирки должны быть с температурой 17-25 °С во время заполнения кровью.
 - Слишком энергичное перемешивание может привести к разрушению геля и получению искаженных результатов.
 - Если образцы крови собирали в гепариновую пробирку, их необходимо тщательно перемешать перед перемещением в QFT пробирку. осторожно перевернуть пробирки 20 раз **непосредственно перед перемещением образцов**. Переместить 1.0 мл аликвот (одну в каждую пробирку QFT) в соответствующие Nil-пробирку, пробирку с ТВ-Антигеном и пробирку с Митогеном. Это лучше проводить асептически, с **соблюдением соответствующих безопасных процедур**, сняв крышки с трех пробирок QFT и добавив 1 мл крови в каждую (до черной метки на стенке пробирки). Плотно закрыть крышками и перемешать, как описано выше.

3. Обязательно маркируйте пробирки.
 - Убедиться, что каждая пробирка (Nil-пробирка, пробирка с ТВ-антигеном, Митогеном) помечена соответствующим образом до снятия крышки.
4. После заполнения, шейкирования и маркировки пробирки необходимо поместить в инкубатор на 37°С как можно быстрее и не позднее чем через 16 часов после взятия крови. Перед инкубацией хранить пробирки при комнатной температуре (22±5 °С). Не охлаждайте и не замораживайте образцы крови.

6. РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ I Стадия – инкубация крови и отделение плазмы Поставляемые материалы

Пробирки для сбора образцов крови QFT (см. раздел 3).

Необходимые материалы (не поставляемые)

См. раздел 3.

Процедура инкубации

1. Если инкубацию не начинают сразу после взятия образца крови, то **перемешивание пробирок переворачиванием 10 раз необходимо повторить непосредственно перед началом инкубации**.
2. Инкубируйте пробирки **В ВЕРТИКАЛЬНОМ ПОЛОЖЕНИИ** при 37°С в течение 16 - 24 часов. Не требуется CO₂ или увлажнение.
3. После окончания инкубации при 37°С пробирки с образцами можно хранить при температуре 4-27°С в течение 3 дней перед центрифугированием.
4. После окончания инкубации при 37°С для отделения плазмы центрифугируйте пробирки 15 минут при 2000-3000 g. Разделительный гель отделяет клетки от плазмы. Если этого не произойдет, то пробирки необходимо центрифугировать еще раз при более высокой скорости.
 - Возможно отобрать плазму без центрифугирования, но при этом необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности, так, чтобы не затронуть клетки.
5. **После центрифугирования ни в коем случае не допускать перемешивания плазмы до ее сбора. В любом случае, не тревожить материал на поверхности геля.**
 - Сбор образцов плазмы проводить только с использованием пипетки.
 - Образцы плазмы могут перемещаться прямо из центрифужных пробирок для забора крови в QFT пробирки на планшете, даже при использовании автоматизированных ИФА рабочих мест.
 - Образцы плазмы можно хранить до 28 дней при 2 - 8°С или более длительный период при температуре ниже -20°С.

II стадия – Определение IFN-γ методом ИФА Поставляемые реагенты

Набор QuantiFERON®-TB Gold ELISA (см. раздел 3).

Необходимые материалы (не поставляемые)

См. раздел 3.

Процедура анализа

1. Все образцы плазмы и все реагенты, кроме концентрата 100X конъюгата, должны достичь комнатной температуры (22 ± 5°С) перед использованием. Оставить минимум на 60 минут.

- Достаньте лишние стрипы из рамки-держателя, положите их в пакет из фольги, тщательно закройте его и храните пакет в холодильнике до использования.
Приготовьте не менее одного стрипа для анализа стандартов QFT и необходимое количество стрипов для тестирования всех образцов (см. рис. 2A & 2B для анализа в двух или в 3 пробирках, соответственно). После использования сохраняйте рамку-держатель и крышку для микропланшета для последующего использования с оставшимися стрипами.
- Растворите лиофилизированный стандарт дистиллированной или деионизированной водой, необходимый объем указан на этикетке флакона со стандартом. Аккуратно перемешайте, избегая образования пены, до полного растворения. При растворении стандарта в указанном объеме получается раствор с концентрацией 8.0 МЕд/мл.

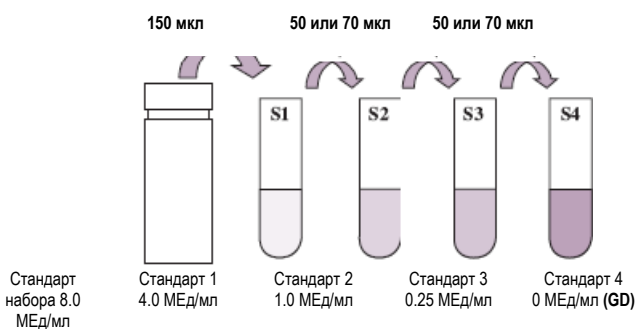
Примечание: Объем восстановленного Стандарта будет отличаться от партии к партии.

Используйте растворенный стандарт для приготовления серии разведений 1:4 стандарта IFN- γ в зеленом буфере для разведения (GD) – см. рис. 1.
S1 (стандарт 1) содержит 4 МЕд/мл, S2 (стандарт 2) содержит 1 МЕд/мл, S3 (стандарт 3) содержит 0.25 МЕд/мл, и S4 (стандарт 4) содержит 0 МЕд/мл (только GD). Стандарты необходимо анализировать как минимум в дублях.

Рекомендуемая процедура для анализа стандартов в дублях	
a.	Надписать 4 пробирки "S1", "S2", "S3", "S4".
b.	Внести по 150 мкл GD в пробирки S1 – S4.
c.	Внести 150 мкл Стандарта в пробирку S1 и тщательно перемешать.
d.	Переместить 50 мкл из пробирки S1 в S2 и тщательно перемешать.
e.	Переместить 50 мкл из пробирки S2 в S3 и тщательно перемешать.
f.	GD служит нулевым Стандартом (S4).

Рекомендуемая процедура для анализа стандартов в трех экземплярах	
a.	Надписать 4 пробирки "S1", "S2", "S3", "S4".
b.	Внести 150 мкл GD в пробирку S1.
c.	Внести 210 мкл GD в пробирки S2, S3, S4.
d.	Внести 150 мкл Стандарта в пробирку S1 и тщательно перемешать.
e.	Переместить 70 мкл из пробирки S1 в S2 и тщательно перемешать.
f.	Переместить 70 мкл из пробирки S2 в S3 и тщательно перемешать.
g.	GD служит нулевым Стандартом (S4).

Рисунок 1. Приготовление Стандартной Кривой



- Подготовьте свежие разведения Стандарта набора для каждой постановки ELISA.
- Развести лиофилизированный конъюгат 100X концентрат с 0.3 мл деионизированной или дистиллированной воды. Осторожно перемешать, чтобы минимизировать пенообразование и обеспечить полное растворение конъюгата.
Рабочий Конъюгат готовили разбавлением необходимого количества Концентрата восстановленного Конъюгата 100X в Зеленом Разбавителе, как показано в таблице 1 – Подготовка Конъюгата.

Таблица 1. Приготовление Конъюгата

Кол-во стрипов	Объем Концентрата 100X Конъюгата	Объем Зеленого Разбавителя
2	10 мкл	1.0 мл
3	15 мкл	1.5 мл
4	20 мкл	2.0 мл
5	25 мкл	2.5 мл
6	30 мкл	3.0 мл
7	35 мкл	3.5 мл
8	40 мкл	4.0 мл
9	45 мкл	4.5 мл
10	50 мкл	5.0 мл
11	55 мкл	5.5 мл
12	60 мкл	6.0 мл

- Тщательно перемешать, но без пенообразования.
 - Вернуть неиспользованный Концентрат Конъюгата 100X к температуре 2 - 8 °C сразу после использования.
 - Использовать только Зеленый Разбавитель.
- Для образцов плазмы, собранных из пробирок для забора крови, и замороженных или хранившихся более 24 часов до начала анализа, тщательно перемешать плазму перед внесением в лунки микропланшета.
 - Если образцы плазмы добавляются непосредственно из QFT пробирок, избегать любого перемешивания плазмы.
 - Внести по 50 мкл свежеприготовленного Рабочего раствора Конъюгата в соответствующие лунки микропланшета, используя многоканальную пипетку.
 - Внести по 50 мкл образцов плазмы в соответствующие лунки микропланшета, используя многоканальную пипетку (см. ниже рекомендованную схему микропланшета, 2A и 2B). В заключение, внести по 50 мкл каждого Стандарта с 1-го по 4-й в соответствующие лунки.

Рисунок 2A. Рекомендуемая схема микропланшета для Nil-пробирок и пробирок с ТВ-антигеном (44 теста на одном планшете)

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

- S1 (Стандарт 1), S2 (Стандарт 2), S3 (Стандарт 3), S4 (Стандарт 4).
- 1N (Образец 1. Nil Контрольная плазма); 1A (Образец 1. ТВ Антиген плазма).

Рисунок 2B. Рекомендуемая схема микропланшета для Nil-пробирок, пробирок с ТВ-антигеном и пробирок с Митогеном (28 тестов на одном планшете)

Ряд	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	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 (Образец 1. Nil Контрольная плазма); 1A (Образец 1. ТВ Антиген плазма); 1M (Образец 1. Контрольная плазма Митогена).
- Смешайте конъюгат и образцы плазмы/стандарты на микропланшетном шейкере в течение 1 минуты.
 - Закройте микропланшет крышкой и инкубируйте при комнатной температуре (22 ± 5°C) в течение 120 ± 5 минут.
 - Не допускайте попадания прямых солнечных лучей на микропланшет во время инкубации.
 - Во время инкубации разведите одну часть концентрата 20X Буфера для промывок в 19 частях деионизированной или дистиллированной воды и тщательно перемешайте. В наборе поставляется концентрат 20X Буфера для промывок в количестве,

достаточном для приготовления 2 л Рабочего разведения Буфера для промывок.

После окончания инкубации промойте лунки, используя по **400 мкл** Рабочего разведения Буфера для промывок на цикл промывки. Циклов промывки должно быть не менее 6. Рекомендуется использовать автоматическое устройство для промывки микропланшетов (вошер).

- Тщательная промывка очень важна для получения достоверных результатов тестирования. Убедитесь, что каждая лунка **полностью** заполняется Буфером для промывок до верха лунки при каждом цикле промывки. Время замачивания составляет не менее 5 секунд для каждого цикла промывки.
- В резервуар для отходов необходимо добавлять стандартные обеззараживающие средства, используемые в лаборатории. Необходимо соблюдать установленные процедуры для деконтаминации потенциально инфекционно опасных материалов.

11. Переверните микропланшет и аккуратно постучите по чистой фильтровальной бумаге для удаления остатков Буфера для промывок. Внесите по 100 мкл раствора Ферментного субстрата в каждую лунку, тщательно перемешайте, используя микропланшетный шейкер.
12. Закройте микропланшет крышкой и инкубируйте при комнатной температуре ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) в течение 30 минут.
 - Не допускайте попадания прямых солнечных лучей на микропланшет во время инкубации.
13. После окончания инкубации внесите по 50 мкл Стоп-раствора в каждую лунку и перемешайте.
 - Стоп-раствор необходимо вносить в лунки в той же последовательности и с той же скоростью, что и субстрат в шаге 11.
14. Измерьте оптическую плотность (ОП) каждой лунки в течение 5 минут после остановки реакции с помощью микропланшетного спектрофотометра (ридера) при длине волны 450 нм, используя длину волны сравнения 620 нм. Значения ОП используйте для расчета результатов.

7. РАСЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

По запросу доступно специальное программное обеспечение QFT для анализа и расчета результатов.

Данное программное обеспечение позволяет выполнить контроль качества анализа, построить калибровочную кривую и представить результаты анализа для каждого образца, как описано в разделе «Интерпретация результатов».

Альтернативно, результаты могут быть определены следующим методом:

Построение калибровочной кривой (если не используется программное обеспечение для QFT анализа)

Рассчитайте средние значения ОП дублей для каждого стандарта. Постройте $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$ калибровочную кривую, откладывая $\log_{(e)}$ среднего значения ОП по оси Y против $\log_{(e)}$ концентрации IFN- γ соответствующего стандарта в МЕд/мл по оси X, исключив нулевой стандарт из расчетов. Используя регрессионный анализ, рассчитайте оптимальную кривую по полученным точкам.

С помощью построенной калибровочной кривой определите концентрации IFN- γ (МЕ/мл) для каждого протестированного образца плазмы, используя соответствующее значение ОП.

Эти расчеты могут быть выполнены с использованием программного обеспечения ридера, стандартных программ табличных расчетов или программного обеспечения статистических данных (например, Microsoft Excel). С помощью программного обеспечения рекомендуется выполнять регрессионный анализ, рассчитывать коэффициент вариации (%CV) для стандартов, коэффициент корреляции (r) калибровочной кривой.

Контроль качества анализа

Точность результатов анализа зависит от построения точной калибровочной кривой.

Следовательно, результаты, полученные для стандартов, должны быть протестированы перед получением и интерпретацией результатов для образцов.

Результаты данного анализа считаются достоверными, если:

- Среднее значение ОП Стандарта 1 ≥ 0.600 .

- % CV значений ОП повторов Стандарта 1 и Стандарта 2 $\leq 15\%$.
- Значения ОП каждого повтора Стандарта 3 и Стандарта 4 должны отличаться от соответствующих средних значений не более чем на 0.040 единиц оптической плотности.
- Коэффициент корреляции (r), рассчитанный по средним значениям ОП стандартов должен быть ≥ 0.98 .

Программное обеспечение QFT позволяет рассчитать и представить данные параметры контроля качества анализа.

Если данные критерии не выполняются, то результаты считаются недостоверными и анализ необходимо повторить.

- Среднее значение ОП Нулевого стандарта (зеленый буфер для разведения) должно быть ≤ 0.150 . В случае, если среднее значение ОП Нулевого стандарта > 0.150 , необходимо улучшить процедуру промывки лунок микропланшета.

Интерпретация результатов

Результаты анализа QFT интерпретируют, руководствуясь следующими критериями:

ЗАМЕЧАНИЕ: Для постановки диагноза или исключения заболевания туберкулезом, оценки вероятности ЛТВ1 необходимо комбинированное выполнение эпидемиологических, клинических и диагностических исследований, результаты которых должны учитываться при интерпретации результатов анализа QFT.

ВАРИАНТ АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТОЛЬКО NIL-ПРОБИРОК И ПРОБИРОК С ТВ-АНТИГЕНОМ

Nil [МЕд/мл]	ТВ-антиген минус Nil [МЕд/мл]	Результат QFT	Отчет/Интерпретация
≤ 8.0	< 0.35	Отрицательный	Инфекция М. Tuberculosis мало вероятна
	≥ 0.35 и $< 25\%$ значения Nil		
	≥ 0.35 и $\geq 25\%$ значения Nil	Положительный ¹	Инфекция М. Tuberculosis вероятна
$> 8.0^2$	Любое значение	Неопределенный ³	Результат не определяется по реакции на ТВ-антиген

¹ – При необходимости первичный положительный результат может быть подтвержден повторным тестированием оригинального образца плазмы в дублях с помощью данного метода QFT ELISA. Если при повторном тестировании один из дублей или оба дубля положительны, то результат для данного пациента должен считаться положительным.

² – В клинических исследованиях показано, что менее 0.25% людей имеют уровень IFN- γ > 8.0 МЕд/мл в Nil-контроле.

³ – Возможные причины приведены в разделе «Поиск и устранение ошибок».

Измеренный уровень IFN- γ не коррелирует со стадией или формой заболевания, уровнем иммунного ответа или вероятностью прогрессии до активного заболевания.

РИСУНОК 3. Схема интерпретации результатов анализа с использованием NIL-пробирок и пробирок с ТВ-антигеном (см. инструкцию на английском языке).

ВАРИАНТ АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ NIL-ПРОБИРОК, ПРОБИРОК С ТВ-АНТИГЕНОМ И ПРОБИРОК С МИТОГЕНОМ

Nil [МЕд/мл]	ТВ-антиген минус Nil [МЕд/мл]	Митоген минус Nil [МЕд/мл]	Результат QFT	Отчет/Интерпретация
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5	Отрицательный	Инфекция М. Tuberculosis мало вероятна
	≥ 0.35 и $< 25\%$ значения Nil	≥ 0.5		
	≥ 0.35 и $\geq 25\%$ значения Nil		Положительный ¹	Инфекция М. Tuberculosis вероятна
	< 0.35	< 0.5	Неопределенный ³	Результаты не определяются по реакции на ТВ-антиген
	≥ 0.35 и $< 25\%$ значения Nil	< 0.5		
$> 8.0^4$	Любое значение	Любое значение		

¹ – ОП ответа на Митоген положительный контроль, (и иногда на стимуляцию ТВ-антигеном) может быть за пределами диапазона измерений ридера. Это не влияет на результаты тестирования.

² – При необходимости первичный положительный результат может быть подтвержден повторным тестированием оригинального образца плазмы в дублях с помощью данного метода QFT ELISA. Если при

повторном тестировании один из дублей или оба дубля положительны, то результат для данного пациента должен считаться положительным.³

³ – Возможные причины приведены в разделе «Поиск и устранение ошибок».

⁴ – В клинических исследованиях показано, что менее 0.25% людей имеют уровень IFN- γ > 8.0 МЕд/мл в Nil-контроле.

Измеренный уровень IFN- γ не коррелирует со стадией или формой заболевания, уровнем иммунного ответа или вероятностью прогрессии до активного заболевания.

РИСУНОК 4. Схема интерпретации результатов анализа с использованием NIL-пробирок, пробирок с ТВ-антигеном и пробирок с митогеном (см. инструкцию на английском языке).

8. ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Результаты анализа методом QFT должны использоваться в сочетании с эпидемиологическими данными, информацией о текущем клиническом состоянии и результатами других диагностических процедур, полученными для каждого конкретного пациента.

Результаты для пациентов со значениями Nil-контроля выше 8 МЕд/мл классифицируются как «неопределенные», так как 25% повышение в ответ на ТВ-антигены может находиться за пределами диапазона измеряемых значений.

Причиной получения недостоверных или неопределенных результатов может быть:

- отклонения от процедуры, описанной в данной инструкции,
- повышенный уровень циркулирующего IFN- γ или присутствие гетерофильных антител,
- интервал времени между взятием образца крови и началом инкубации при 37°C более 16 часов.

9. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Клинические исследования

Так как не существует установленного стандарта для латентной туберкулезной инфекции (LTBI), реальная оценка чувствительности и специфичности данного метода QFT практически не может быть выполнена. Специфичность метода QFT была установлена оценкой доли ложноположительных результатов у людей группы низкого риска (нет известных факторов риска) туберкулезной инфекции. Чувствительность была установлена при исследовании группы пациентов с активной формой туберкулеза, подтвержденной культуральными исследованиями.

Специфичность

Исследования проводили в США, в исследование было включено 866 волонтеров, кровь была собрана для исследований методом QFT и TST. Демографическая информация и факторы риска туберкулезной инфекции определяли стандартной процедурой на момент тестирования. Из 432 волонтеров, у которых не было выявлено какого-либо фактора риска инфекции *M. tuberculosis*, результаты QFT и TST были получены для 391 человека. Ни один из них не прошел вакцинацию BCG. Второе исследование специфичности было выполнено с помощью метода QFT в группе низкого риска в Японии, среди людей, приблизительно 90% которых прошли вакцинацию BCG. Результаты обоих исследований приведены в таблице 2.

ТАБЛИЦА 2. Специфичность метода QFT: Результаты, полученные для людей, у которых не выявлено факторов риска инфекции *M. Tuberculosis*

Исследование	Статус BCG % вакцинированных	Всего протестировано	N** QFT-G не определено	N QFT-G положительных / N валидных	QFT-G специфичность (95% CI)	N TST положительных / N протестированных	TST* специфичность (95% CI)
США (не опубликовано)	0%	391	1	3/390	99.2% (98-100)	6/391	98.5% (97-99)
Япония ¹⁵	~90%	168	6	2/162	98.8% (95-100)	--	--
ВСЕГО		559	7/559 (1.3%)	5/552	99.1% (98-100)	--	--

* - Для TST использовался «cut-off» = 10 мм. Специфичность TST определена как 99.1% при использовании «cut-off» = 15 мм.

** - N – количество

Чувствительность к активной форме ТВ

Образцы крови пациентов с ТВ из Австралии и Японии, у которых инфекция *M. tuberculosis* была подтверждена культуральными исследованиями, были протестированы набором QFT для оценки чувствительности метода. Так как не существует определенного стандартного теста для латентной туберкулезной инфекции (LTBI), подходящей заменой является выявление *M. tuberculosis* микробиологическим методом, так как пациенты, больные туберкулезом, инфицированы по определению. Все пациенты получали лечение менее 8 дней перед сбором образцов для анализа методом QFT.

В таблице 3 суммированы данные, полученные в результате обследования двух групп пациентов с положительными результатами микробиологического теста на *M. tuberculosis*. Общая чувствительность метода QFT для активной формы ТВ составила 89% (157/177).

ТАБЛИЦА 3. QFT: пациенты с положительными результатами микробиологического теста на *M. Tuberculosis*

Исследование	Кол-во QFT Положительных/Кол-во действительных тестов	QFT Чувствительность (95% CI)
Пациенты с ТВ, Япония	86/92	93% (86-97%)
Австралия	24/27	89% (70-97%)
США	47/58	81% (68-90%)
ВСЕГО	157/177	89% (83-93%)

Диагностика LTBI

Множество публикаций посвящено характеристикам метода QFT при тестировании в группах риска по LTBI. Основные показатели некоторых исследований приведены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4. Некоторые опубликованные результаты исследований методом QFT в группах риска по LTBI

Исследование	Кол-во тестируемых	Полученные данные
Indian HCW (Pai et al 2005) ²⁷	726	Обнаружение высокой доли ТВ. 40% QFT-Gold IT положительных и 41% TST положительных при 10 мм. Высокая согласованность с TST, нет эффекта вакцинации BCG ни на один из тестов. Оба теста связаны с факторами риска, возрастом и сроком работы в медицинском учреждении.
Danish HIV (Brock et al 2006) ⁸	590	Общая частота встречаемости LTBI по результатам теста QFT-Gold IT составила 4.6% (27/590) среди HIV+ пациентов. Положительные результаты ассоциированы с риском ТВ. У двух пациентов с положительным результатом теста QFT-Gold IT наблюдалась прогрессия до активной формы ТВ в течение одного года. Неопределенные ответы (n=20, 3.4%) были ассоциированы с уровнем CD4+ <100 кл/мкл.
Hospitalized Children (Dogra et al 2006) ¹⁰	105	Методами QFT-Gold IT и TST были протестированы дети с подозрением на ТВ или с контактами с больными ТВ в анамнезе. 10.5% QFT-Gold IT положительных результатов и 9.5% TST положительных при 10 мм. Согласованность методов составила в общем случае 95.2% и 100% для не BCG-вакцинированных пациентов.
German Contacts (Diel et al 2006) ⁹	309	Были подробно изучены 15 различных показателей. 51% прошли BCG-вакцинацию, 27% родились в другой стране. У 70% BCG-вакцинированных и 18% не вакцинированных результаты TST были положительными (5 мм), тогда как результаты QFT-Gold IT были положительными, соответственно, у 9% и 11%. QFT-Gold IT был ассоциирован с риском ТВ. TST был ассоциирован только с BCG-вакцинацией.

Во многих публикациях описывают характеристики менее чувствительной версии теста QuantiFERON®-TB Gold с жидким антигеном (предшественник данного метода QuantiFERON®-TB Gold IT) и данного метода QuantiFERON®-TB Gold IT. Эти исследования включают использование теста/тестов при активной форме ТВ^{7,9,10,13,14,17,20,25}, у детей^{10,23,25}, у ВИЧ-положительных пациентов^{5,18}, работников медицинских учреждений^{16,27,28}, заключенных²⁹, а также у больных с подозрением на ТВ^{7,22,31} и в группе низкого риска^{17,22}.

Воспроизводимость и влияние TST на последующее тестирование методом QuantiFERON®-TB Gold IT

В рамках проведенных в США исследований в подгруппе добровольцев был выполнен тест QuantiFERON®-TB Gold IT дважды, первоначально и через 4-5 недель после тестирования TST. Для 260 волонтеров были получены результаты теста QuantiFERON®-TB Gold IT в обоих случаях, и согласованность составила 99.6% (259/260). Предшествующий TST не индуцирует положительный ответ теста QuantiFERON®-TB Gold IT.

10. ТЕХНИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИЯ Неопределенные результаты

Неопределенные результаты встречаются нечасто и могут быть связаны с иммунным статусом пациента, но, кроме того, могут быть вызваны различными техническими причинами:

- Длительным промежутком времени (более 16 часов) между взятием крови и началом инкубации при 37°C,
- Хранением образца крови при температуре вне пределов рекомендованного диапазона (22 ± 5°C),
- Недостаточным перемешиванием образцов крови в пробирках для взятия крови,
- Недостаточной промывкой лунок микропланшета.

Если возможны технические ошибки при взятии или обработке образцов крови, повторите анализ методом QuantiFERON®-TB Gold IT с самого начала, используя новый образец крови. Повторение анализа стимулированной плазмы может быть выполнено, если предполагается неполная промывка или другие отклонения от процедуры при выполнении ИФА. Не ожидается изменений неопределенных результатов при низком результате образца с митогеном или высоким результате Nil-образца при повторном тестировании, если только не было ошибки в процедуре ИФА. Неопределенные результаты должны быть представлены как неопределенные. Врач может назначить повторное тестирование со свежесобранным образцом или выполнение других подходящих диагностических процедур.

Сгустки в образцах плазмы

При образовании фибриновых сгустков в образцах в результате длительного хранения центрифугируйте образцы перед тестированием для удаления сгустков.

ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ ОШИБОК ИФА Развитие неспецифического окрашивания

Возможная причина	Решение
Неполная промывка лунок микропланшета	Промывайте лунки не менее 6 раз, используя по 400 мкл буфера для промывок на лунку на один цикл промывки. В зависимости от типа используемого вошера может потребоваться более 6 циклов промывки. Время замачивания между циклами должно составлять не менее 5 секунд.
Перекрытая контаминация Лунок микропланшета	Будьте аккуратны при пипетировании и смешивании образцов для минимизации риска.
Срок годности набора/компонентов истек	Убедитесь, что срок годности набора не истек. Убедитесь, что используемые растворенный Стандарт и разведенный концентрат Конъюгата 100X приготовлены менее чем за три месяца до использования.
Контаминация раствора Ферментного субстрата	Выбросьте раствор субстрата, если он приобрел голубой цвет. Убедитесь, что используются чистые резервуары для реагентов.
Перемешивание плазмы в центрифужных пробирках перед ее сбором	Убедитесь, что образцы плазмы аккуратно собраны с верхнего слоя геля без пипетирования вверх-вниз; не тревожить материал на поверхности геля.

Низкие значения оптической плотности стандартов

Возможная причина	Решение
Ошибка разведения стандарта	Убедитесь, что разведения стандарта выполнены правильно, в соответствии с данной инструкцией.
Ошибка пипетирования	Убедитесь, что пипетки прокалиброваны и используются в соответствии с инструкцией производителя.
Слишком низкая температура инкубации	Инкубация процедуры ИФА должна выполняться при температуре 17°C to 27°C.
Время инкубации слишком короткое	Время инкубации микропланшета с конъюгатом, стандартами и образцами должно составлять 120 ± 5 минут. Время инкубации микропланшета с раствором ферментного субстрата должно составлять 30 минут.

Используется неправильный фильтр	Считывания ОП лунок микропланшета должно выполняться при длине волны 450 нм, референс-длина волны 620-650 нм.
Реагенты слишком холодные	Все реагенты, за исключением концентрата конъюгата 100X, должны достичь комнатной температуры перед началом тестирования. Для этого требуется приблизительно 1 час.
Срок годности набора/компонентов истек	Убедитесь, что срок годности набора не истек. Убедитесь, что используемые растворенный Стандарт и разведенный концентрат Конъюгата 100X приготовлены менее чем за три месяца до использования.

Высокое фоновое окрашивание

Возможная причина	Решение
Неполная промывка лунок микропланшета	Промывайте лунки не менее 6 раз, используя по 400 мкл буфера для промывок на лунку на один цикл промывки. В зависимости от типа используемого вошера может потребоваться более 6 циклов промывки. Время замачивания между циклами должно составлять не менее 5 секунд.
Слишком высокая температура инкубации	Инкубация процедуры ИФА должна выполняться при температуре 17°C to 27°C.
Срок годности набора/компонентов истек	Убедитесь, что срок годности набора не истек. Убедитесь, что используемые растворенный Стандарт и разведенный концентрат Конъюгата 100X приготовлены менее чем за три месяца до использования.
Контаминация раствора Ферментного субстрата	Выбросьте раствор субстрата, если он приобрел голубой цвет. Убедитесь, что используются чистые резервуары для реагентов.

Нелинейная калибровочная кривая и низкая воспроизводимость дублей

Возможная причина	Решение
Неполная промывка лунок микропланшета	Промывайте лунки не менее 6 раз, используя по 400 мкл буфера для промывок на лунку на один цикл промывки. В зависимости от типа используемого вошера может потребоваться более 6 циклов промывки. Время замачивания между циклами должно составлять не менее 5 секунд.
Ошибка разведения стандарта	Убедитесь, что разведения стандарта выполнены правильно, в соответствии с данной инструкцией.
Плохое смешивание	Тщательно перемешайте реагенты и образцы перед внесением в лунки микропланшета.
Неправильная техника пипетирования или остановка во время выполнения метода	Внесение стандартов и образцов должно выполняться равномерно - с одинаковой скоростью. Все реагенты должны быть подготовлены перед началом анализа.

Информационный CD (бесплатный), содержащий видеозапись выполнения процедуры анализа и пути решения наиболее часто встречающихся проблем, можно заказать у производителя.

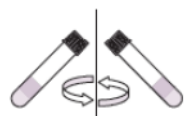
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

См. инструкцию на английском языке.

13. КРАТКАЯ ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

СТАДИЯ 1 – ИНКУБАЦИЯ ОБРАЗЦОВ КРОВИ

1. Соберите образцы крови пациентов в пробирки для сбора образцов крови и тщательно перемешайте, интенсивно встряхивая пробирки вверх-вниз 10 раз для гарантии того, что вся внутренняя поверхность пробирки будет покрыта кровью.
2. Инкубируйте пробирки в вертикальном положении при 37°C в течение 16–24 часов.
3. После окончания инкубации центрифугируйте образцы 15 минут при 2000 - 3000 g для отделения плазмы.



4. После центрифугирования отберите образцы плазмы из каждой пробирки для дальнейшего определения IFN-γ.



СТАДИЯ 2 – ОПРЕДЕЛЕНИЕ IFN-γ МЕТОДОМ ИФА

1. Все реагенты, за исключением концентрата конъюгата 100X, должны достичь комнатной температуры перед началом тестирования. Для этого требуется приблизительно 1 час.



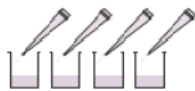
2. Растворите лиофилизированный стандарт дистиллированной или деионизированной водой, до концентрации 8.0 МЕд/мл. Приготовьте 4 разведения стандарта.



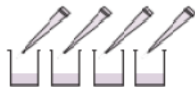
3. Растворите лиофилизированный концентрат 100X конъюгата в деионизированной или дистиллированной воде.



4. Приготовьте рабочий раствор конъюгата в Зеленом буфере для разведения и внесите по 50 мкл по все лунки.



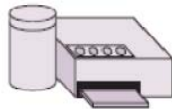
5. Внесите по 50 мкл образцов плазмы и по 50 мкл стандартов в соответствующие лунки. Перемешайте на шейкере.



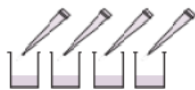
6. Инкубируйте 2 часа при комнатной температуре.



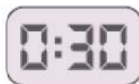
7. Промойте лунки не менее 6 раз, используя по 400 мкл буфера для промывок на лунку, на один цикл промывки.



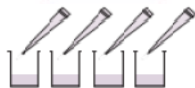
8. Внесите по 100 мкл раствора Ферментного субстрата в каждую лунку, тщательно перемешайте, используя микропланшетный шейкер.



9. Инкубируйте 30 минут при комнатной температуре.



10. Внесите по 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку, тщательно перемешайте, используя микропланшетный шейкер.



11. Измерьте оптическую плотность при длине волны 450 нм, используя длину волны сравнения 620 - 650 нм.



12. Рассчитайте результаты



ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com