

LIOFeron[®] ТВ/ЛТВІ

Інструкція із застосування.

2 компонентний набір

Компонент 01

ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ



22 Тести



LIO-Feron 01_22



2 x 22 Тести



LIO-Feron 01_44

Компонент 02

ІФА набір для визначення IFN-γ людини



22 Tests



LIO-Feron 02_22



44 Tests



LIO-Feron 02_44

Аналіз на виділення гамма-інтерферону (IFN-γ) в крові людини для діагностики латентної туберкульозної інфекції (ЛТВІ). Як і інші тести IGRA на ринку, цей тест також може давати позитивну реакцію у пацієнтів з ТБ, але він не може відрізнити ЛТВІ від активного ТБ. Тільки для професійної діагностики in vitro! Не для особистого використання!



Виключно для діагностики in vitro



Виробник:

LIONEX GmbH

Зальцдалюмер штрассе 196, б. 1А

38126 Брауншвайг, Німеччина

Тел: +49 (0) 531 - 260 12 66

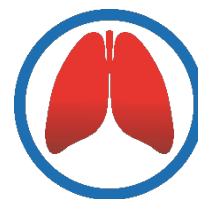
Факс: +49 (0) 531 - 618 06 54

Web: www.lionex.de

E-mail: sales@lionex.de



www.lionex.de



LIONEX Diagnostics
and Therapeutics

Зміст

Спосіб застосування	3
Вступ / Сфера застосування	3
Принципи тесту	5
Матеріали, що постачаються	6
Необхідні матеріали, що не постачаються	7
Тривалість процедури дослідження	7
Попередження та застереження	8
Застереження щодо безпеки	9
Відбір та підготовка зразків	9
Приготування реактивів	10
Стабільність та умови зберігання розведеного стандарту та інших реагентів	11
Процедура тестування	12
Розрахунок та інтерпретація тестів	16
Побудова стандартної кривої	16
Інтерпретація результатів	17
Контроль якості тесту	18
Обмеження	18
Заважаючі речовини	19
Робочі характеристики	20
Діапазон вимірювань IFN-γ	20
Порівняльні дослідження	20
Чутливість і специфічність	20
Клінічна чутливість і специфічність	20
Ефективність тесту	21
Технічна інформація	22
Невизначені результати	22
Плазма зі згустками	22
Керівництво з пошуку і усунення помилок	23
Список літератури	24
Символи	25
Контактна інформація	25
Скорочена процедура проведення тесту	26

Спосіб застосування

LIOFeron®_{TB/LTBI} - це тест на вивільнення цитокінів для кількісного визначення гамма-інтерферону (IFN- γ), що виробляється клітинами крові людини, стимульованими антигенами мікобактерій туберкульозу. Таким чином, тест корисний для діагностики латентної туберкульозної інфекції (ЛТБІ). Як і інші тести IGRA, що представлені на ринку, цей тест також може давати позитивну реакцію у хворих на туберкульоз, але він не може відрізнити ЛТБІ від активного туберкульозу. **LIOFERON®_{TB/LTBI}** - це 2-компонентний набір, що складається з **ПРОБІРОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ** та ІФА тесту для визначення IFN- γ людини. Тест призначений для професійної діагностики in vitro. Тест не призначений для особистого використання.

Вступ / Сфера застосування

Туберкульоз людини (ТБ) став глобальною хворобою, оскільки в останні десятиліття він знову з'явився в західних країнах. Туберкульоз - це переважно захворювання дихальних шляхів, але може вражати й інші органи. Люди, які страждають на активну форму туберкульозу легень, дуже заразні. Туберкульоз поширюється при кашлі та чханні. ЛТБ не є заразним і виникає, коли імунна система людини контролює первинну туберкульозну інфекцію. Латентна інфекція може залишатися протягом усього життя і може реактивуватися, коли імунна система людини ослаблена, наприклад, у похилому віці, при раку або через інфікування іншими захворюваннями.

За останніми оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), туберкульоз є однією з десяти основних причин смертності в усьому світі та провідною причиною смерті від одного інфекційного агента. У 2017 році ТБ забрав близько 1,3 мільйона життів (в діапазоні 1,2-1,4 мільйона) серед ВІЛ-негативних людей, а серед ВІЛ-позитивних людей було зафіксовано ще 300000 смертей від ТБ (в діапазоні 266000-335000). За оцінками, було зареєстровано 10,0 млн. нових випадків ТБ (діапазон 9,0-11,1 млн.)²⁴. Стійкість мікобактерії туберкульозу до протитуберкульозних препаратів та поява штамів *M. tuberculosis*, збудника туберкульозу людини, з мультирезистентністю до ліків (МЛЛ) та з широка стійкість до ліків (ШЛЛ) неухильно призводить до безнадійної ситуації щодо лікування туберкульозу. За даними ВООЗ, у 2017 році у світі було виявлено та нотифіковано 160684 випадки МР ТБ/РР ТБ²⁴.

Ситуація погіршується тим, що не існує ефективної вакцини проти ВІЛ і туберкульозу. Єдина наявна вакцина проти туберкульозу - БЦЖ від *M. bovis* - демонструє дуже різну ефективність і дуже часто виявляється неефективною²⁵.

Діагностика інфекцій, спричинених *M. tuberculosis*, може бути дуже корисною при прийнятті рішень щодо варіантів лікування. Рівень різних цитокінів у крові людини виявився дуже корисним для діагностики інфекцій, спричинених *M. tuberculosis*.

Т-лімфоцити людей, інфікованих *M. tuberculosis*, розпізнають мікобактеріальні антигени і провокують вироблення цитокінів, наприклад, IFN- γ ^{9, 12-14}. Кількісне визначення IFN- γ є основою аналізу вивільнення інтерферону-гамма (IFN- γ) (IGRA), який називається **LIOFeron®_{TB/LTBI}**, і може бути корисним для діагностики як активного, так і латентного туберкульозу, але тест не дозволяє розрізняти ЛТІ та активний туберкульоз.

IGRA широко використовуються для визначення IFN-γ-відповіді мононуклеарних клітин периферичної крові людини (PBMC) на активний та латентний туберкульоз за допомогою рекомбінантних антигенів *M. tuberculosis*. **ВООЗ схвалила IGRA як найкращий тест для виявлення латентної туберкульозної інфекції (ЛТБІ) у вакцинованих БЦЖ осіб у країнах з низьким навантаженням туберкульозу**

LIOFeron®_{TB/LTBI} має дві різні пробірки з антигенами ТБ, ТБ А та ТБ В. ТБ А містить антигени ESAT6, CFP10 та ТБ 7.7 і широко використовується для тестів IGRA^{2-4, 7, 10, 11, 17, 19, 20}, а ТБ В містить запатентований антиген компанії LIONEX з CD8+ епітопами^{4, 18}

Принципи тесту

LIOFERON®_{TB/LTBI} складається з двох основних компонентів: **ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ** та ІФА тесту для визначення IFN-γ людини. Тест є аналізом вивільнення цитокінів, який базується на тому, що клітини людської крові виділяють IFN-γ під впливом специфічних антигенів *M. tuberculosis*.

ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЮВАННЯ КРОВІ ЛЮДИНИ містять пробірку з позитивним контролем, пробірку з негативним контролем та дві пробірки з туберкульозним антигеном для кожного зразка. Зразок крові людини (у літій-гепаринові пробірки для збору крові; не входять до набору) забирають за допомогою венепункції і по 1 мл вносять у пробірки з негативним, позитивним контролем та пробірки для стимуляції антигеном ТБ, що входять до набору. Пробірки обережно перемішують, струшуючи догори дном, і розміщують в інкубаторі при 37°C на ніч. Потім прозорий супернатант (плазму) обережно видаляють і аналізують за допомогою **ІФА тесту IFN-γ**, який кількісно визначає кількість IFN-γ, що виробляється у відповідь на специфічні антигени з *M. tuberculosis*. Ці антигени відрізняються від антигенів БЦЖ та більшості інших нетуберкульозних мікобактерій (НТМ).

Тест IFN-γ заснований на принципі імуноферментного аналізу (ІФА).

Зразки плазми з пробірок для стимуляції крові людини вносять у лунки планшета паралельно зі стандартами. Потім у лунки вносять кон'юговане з біотином вторинне антитіло (розчин для детекції антитіл) і інкубують. Якщо IFN-γ присутній у зразку, він зв'язується з іммобілізованими антитілами на дні лунок планшета. Після етапу інкубації планшет промивають розведеним промивним розчином для видалення незв'язаних комплексів. Після промивання додають розчин кон'югату і знов інкубують. Після останнього етапу промивання піпеткою вносять розчин субстрату, що викликає появу синього забарвлення в лунках. Розвиток кольорового забарвлення припиняється додаванням стоп-розчину, який змінює колір з синього на жовтий. Лунки, що не містять IFN-γ, залишаються безбарвними. Отримане забарвлення вимірюється за допомогою ІФА-рідера на довжині хвилі 450 нм. Концентрація IFN-γ прямо пропорційна інтенсивності забарвлення. Вимірювання кожного набору зразків паралельно зі стандартами дозволяє кількісно визначити концентрацію IFN-γ в кожному зразку

Матеріали, що постачаються

Таблиця 1: компоненти набору **ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЮВАННЯ КРОВІ ЛЮДИНИ:**

ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ				
Колір кришечки		Σ	22 Тести	2x 22 Тести
		REF	LIO-Feron 01_22	LIO-Feron 01_44
	Позитивний контроль (готовий до використання) містить літій-гепарин та мітоген (чорний ковпачок)	PC	22 пробірки	2x22 пробірки
	Негативний контроль (готовий до використання) містить літій-гепарин (білий ковпачок)	NC	22 пробірки	2x22 пробірки
	ТБ антиген А (готовий до використання) містить Li-гепарин та антигени ESAT6, CFP10 і TB 7.7 (зелений ковпачок)	TB A	22 пробірки	2x22 пробірки
	ТБ антиген В (готовий до використання) містить літій-гепарин та антиген LIONEX з епітопом CD8+ (синій ковпачок)	TB B	22 пробірки	2x22 пробірки

Таблиця 2: Компоненти ІФА набору для визначення людського IFN-γ:

ІФА набір для визначення людського IFN-γ				
Колір кришечки		Σ	22 Тести	2x 22 Тестів
		REF	LIO-Feron 02_22	LIO-Feron 02_44
	Мікропланшет (готовий до використання) з моноклональними антитілами для захоплення IFN-γ людини, в алюмінієвому пакеті з вологопоглиначем, 12 стрипів по 8 лунок	MTP	1	2
	Рекомбінантний стандарт людського IFN-γ (12,5 МО, ліофілізований) (червона кришечка)	STA	2	4
	Розчин антитіл для детекції (готовий до використання) з моноклональними антитілами до IFN-γ людини, кон'югованим з біотином, містить казеїн (зелена кришечка)	DET	7 мл	14 мл
	Розчин кон'югату (готовий до використання) зі стрептавідином, HRP-кон'югований (жовта кришечка)	CON	14 мл	24 мл
	Розчин субстрату (готовий до використання) містить 3,3',5,5'-тетраметилбензидин* (ТМБ) (чорна кришечка)	TMB	14 мл	24 мл
	Стоп-розчин (готовий до використання) містить H ² SO ⁴ * (біла кришечка)	STO	7 мл	14 мл
	Промивний буфер (10-кратний концентрат) (чорна кришечка)	WB	100 мл	2x 100 мл
	Інкубаційний буфер (готовий до використання) містить бичачий сироватковий альбумін (синій ковпачок)	IB	40 мл	40 мл
	Інструкція з використання		1	1

* Зверніться до розділу «Попередження та застереження».

Необхідні матеріали, що не постачаються

- Одноразові рукавички; контейнери для потенційно забруднених матеріалів
- Пробірки для забору крові з літій-гепарином
- Пробірки для забору та розведення плазми (додатково, наприклад, стерильна пробірка на 1,5 мл)
- Пробірки для стандартної підготовки (наприклад, стерильні пробірки на 1,5 мл)
- Інкубатор 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$), наявність CO₂ не обов'язкова
- Центрифуга, придатна для пробірок з кров'ю (діапазон RCF від 2000 до 3000)
- Вортексер
- Деіонізована або дистильована вода
- Склянки, колби та/або градуйовані циліндри, необхідні для приготування буферу для 1-го промивання
- Калібровані змінні піпетки на об'єм від 50 мкл до 1000 мкл з одноразовими наконечниками
- Мікропланшетний промивач (рекомендується) або калібровані багатоканальні піпетки об'ємом від 50 мкл до 400 мкл з одноразовими наконечниками (необов'язково)
- Таймер
- Мікропланшетний рідер (450 нм)

Тривалість процедури дослідження

Необхідний час для проведення тесту LIOFeron®TB/LTBI наведено нижче

ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ:	Час процедури для внесення зразків крові людини займає близько 10 хвилин. Інкубація зразків крові людини займає від 16 до 24 годин ($37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$). Процедура забору зразка крові людини займає приблизно 5 хвилин.
ІФА набір для визначення людського IFN- γ	Приблизно 3 години на один планшет для ІФА (22 тести). < 1 година лабораторної роботи, та додайте ~ 15 хвилин на кожен додатковий планшет

Попередження та застереження

Виключно для діагностики in vitro! Не для особистого використання!

- Уважно дотримуйтесь інструкцій процедури тестування та інтерпретації результатів!
- Відповідно до Належної лабораторної практики (GLP), всі використовувані лабораторні прилади повинні регулярно перевірятися і калібруватися на точність і достовірність.
- Не приймати всередину та не ковтати! Не їжте, не пийте і не паліть в лабораторії! Не працюйте без захисного одягу (одноразові рукавички, захисні окуляри та лабораторний халат)! Уникайте контакту реагентів набору зі шкірою, очима або слизовими оболонками.
- Використовуйте всі реагенти протягом терміну придатності (вказаного на етикетках).
- Перед використанням доведіть всі тест-компоненти до кімнатної температури (бажано 15 - 30°C) та обережно інвертуйте рідкі тест-компоненти. Після використання негайно поверніть тест-компоненти до температури 2 - 8°C. Тест чутливий до температури вище 30°C.
- Використовуйте тільки свіжі зразки крові, що містять антикоагулянти (літій-гепарин). Біологічні рідини, що не містять літій-гепарин, не валідуються і можуть дати невірні результати! Зберігайте зразки крові при кімнатній температурі (бажано 15 - 30°C)! Не зберігайте зразки крові при температурі нижче 15°C! Кров не можна використовувати, якщо вона старша 16 годин після венепункції.
- Ми рекомендуємо використовувати подвійне визначення для стандартних та холостих вимірювань. Для вимірювання зразків плазми крові людини можливе одноразове визначення.
- Не використовуйте реагенти з різних партій або кодів серій і не змішуйте реагенти з різних партій або кодів серій.
- Уникайте забруднення реагентів. Не використовуйте один і той же контейнер для декількох зразків!
- Працюйте в стерильних умовах, щоб уникнути забруднення зразків. Уникайте використання каламутних зразків, які можуть бути забруднені бактеріями. Для вимірювання цитокінів слід використовувати тільки прозорий супернатант. Під час збору надосадової рідини уникайте забруднення еритроцитами. Якщо необхідно, відокремте еритроцити від плазми за допомогою центрифугування.
- Уникайте повторного заморожування та розморожування зразків плазми, оскільки це може призвести до денатурації цитокінів.
- Перед піпетуванням ретельно перемішайте всі реагенти шляхом легкого нахилу або розгойдування. Слід уникати сильного струшування з утворенням піни. Піпетуйте з постійними інтервалами, щоб у всіх лунках мікротитрованого планшета були однакові умови.
- Уникайте торкання пальцями вхідного отвору гвинтової кришки флакону (небезпека контамінації). Тільки для одноразового використання. Не використовуйте, якщо віали пошкоджені або відкриті (без гвинтової кришки).
- Захищайте розчин субстрату TMB від прямих сонячних променів.

Для отримання додаткової інформації, будь ласка, запросіть паспорти безпеки матеріалів (**MSDS**) електронною поштою на адресу sales@lionex.de.

**УВАГА:**

Поводьтеся з людською кров'ю та плазмою як з потенційно інфекційними матеріалами. Всі компоненти набору слід розглядати як інфекційні агенти. Знезаражуйте та утилізуйте залишки реагентів набору та зразки людської крові відповідно до відповідно до федеральних, державних та місцевих норм, наприклад, шляхом автоклавування або використання дезінфікуючого розчину.

Застереження щодо безпеки**Розчин субстрату****TMB**

3,3', 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) містить: N-метил-2-піролідон. Небезпечно! Може зашкодити репродуктивній функції або ненародженій дитині (H360D).

Утилізуйте компоненти набору на затвердженому заводі з утилізації відходів. Якщо стався контакт з речовиною: Зверніться до лікаря та отримайте спеціальні інструкції перед використанням. Носіть захисні рукавички та лабораторний халат (захист очей, обличчя).

Стоп-розчин**STO**

Містить Сірчану кислоту. Небезпечно! Викликає сильні опіки шкіри та пошкодження очей (H314). Може викликати корозію металу (H290).

Утилізуйте компоненти набору на затвердженому заводі з утилізації відходів. У разі потрапляння в очі: Обережно промити водою протягом декількох хвилин. Зніміть контактні лінзи, якщо вони є і легко знімаються. Продовжити промивання.

При контакті зі шкірою: Негайно зняти весь забруднений одяг. Промити шкіру водою. Негайно зателефонувати до токсикологічного центру або лікаря. Одягти захисні рукавички та лабораторний халат (захист очей, захист обличчя).

Відбір та підготовка зразків

LIOFeron®_{TB/LTBI} найкраще працює зі свіжими зразками людської крові.

Необхідно мінімум 4,5 мл людської крові, зібраної в стандартних лабораторних умовах (асептично, уникаючи гемолізу) в пробірки Li-гепарином для забору крові.

Якщо застосування **ПРОБІРОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ** людини неможливо виконати відразу після забору крові з вени, цільну кров можна зберігати до 16 годин при температурі 15 - 30°C.

Використання та зберігання стимульованої плазми

Ми рекомендуємо переносити плазму відразу після центрифугування з пробірок на планшет для ІФА.

Якщо тест на визначення **IFN-γ** людини неможливо провести одразу після стимуляції, пробірки можна зберігати до 4 днів при температурі 2-8°C. В такому разі, ми рекомендуємо проводити ІФА на **IFN-γ** людини протягом декількох днів після стимуляції крові.

Для більш тривалого зберігання відокремте плазму людини від еритроцитів і зберігайте при 2 - 8°C (до 28 днів). **Але** це може призвести до зниження концентрації **IFN-γ**. Також зразки плазми можна зберігати протягом більш тривалого часу, за умови зберігання при температурі нижче -20°C. Заморожені зразки необхідно розморозити перед тестуванням і добре перемішати. Уникайте повторного заморожування та розморозування зразків!

Приготування реактивів

	Промивний буфер WB (10 x концентрат): Вийміть промивний буфер WB (10 x концентрат) завчасно і почекайте поки він матиме кімнатну температури (бажано 15–30°C), обережно переверніть перед використанням. Якщо під час зберігання в холодильнику випадають кристали, концентрат слід підігріти до 37°C протягом 15 хвилин. Перед використанням розведіть концентрат WB дистильованою водою (1 + 9 об'ємів), напр. 100 мл WB промивного буфера (10 x концентрат) + 900 мл дистильованої води.
	STA Рекombінантний стандарт IFN-γ людини (ліофілізований): Додайте вказаний на етикетці об'єм інкубаційного буферу IB у флакон для відновлення ліофілізованого рекombінантного стандарту IFN-γ людини до кінцевої концентрації 12,5 МО/мл. Перемішайте вихідний розчин після додавання інкубаційного буфера протягом 10 секунд (наприклад, на вортексі) до повної солюбілізації білка. Ми рекомендуємо залишити пробірку на 10 - 30 хвилин при кімнатній температурі. Приготуйте стандартні розчини S1 - S4 для стандартної кривої, використовуючи вихідний розчин відповідно до наведеної нижче схеми піпетування (Таблиця 3 і Малюнок 1):

Таблиця 3: Приготування розведення стандарту №. S1 - S4.

Розведення стандарту №	конц. IFN-γ	Об'єм розведення стандарту	Об'єм інкубаційного буфера	Загальний об'єм
S1	4 МО/мл	80 мкл вихідного розчину	170 мкл	250 мкл
S2	1 МО/мл	50 мкл розчину S1	150 мкл	200 мкл
S3	0.25 МО/мл	50 мкл розчину S2	150 мкл	200 мкл
S4 (бланк)	0 МО/мл	-	150 мкл	150 мкл



Малюнок 1: Приготування стандартів різних концентрацій IFN-γ S1 - S3.

Стабільність та умови зберігання розведеного стандарту та інших реагентів

ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

- Зберігати при температурі 2 - 30°C.
- **НЕ ПІДДАВАТИ** компоненти тесту впливу температури вище 30°C.

ІФА набір для визначення IFN-γ людини

- Зберігати при температурі від 2 до 8°C.
- **НЕ ЗАМОРОЖУВАТИ** тест-компоненти.
- **НЕ ПІДДАВАЙТЕ** тест-компоненти впливу температури вище 30°C.
- Захищайте **ТМВ** розчин субстрату від прямих сонячних променів.

Мікропланшети **МТР** чутливі до вологи. Після першого відкриття мікропланшета стабільність зберігається до 3 місяців, за умови зберігання решти смужок мікропланшета при температурі 2 - 8°C в алюмінієвому пакеті (закритому на блискавку) з вологопоглинаючим агентом

Після розведення **WB** Промивного буферу (10 x концентрат) розведений розчин (1 x Промивний буфер) є стабільним протягом 1 місяця при температурі 2 - 8°C. Інструкції з приготування буферу для 1 x промивання див. у розділі «*Приготування реагентів*»

Розведений **STA** вихідний розчин стабільний протягом 2 місяців при температурі 2 - 8°C. Зверніть увагу на дату розведення **STA** на етикетці флакона. Інструкції з приготування стандартних розчинів №. S1 -S4, будь ласка, дивіться в розділі «*Приготування реагентів*».

Невідкриті компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності. Термін придатності вказано на етикетках кожного компонента тест-системи та на зовнішній упаковці. Не використовуйте складові набору, якщо вони пошкоджені або відкриті (наприклад, не закручена кришка, пошкоджений алюмінієвий пакет). Після першого відкриття рідких компонентів стабільність становить щонайменше 3 місяці, якщо пляшки щільно закривати після кожного використання.

ПРИМІТКА: Якщо в розчині кон'югату з'явиться осад, це не вплине на результат тесту. Якщо в невикористаних лунках видно бульбашки, це не вплине на результат тесту.

Процедура тестування

ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

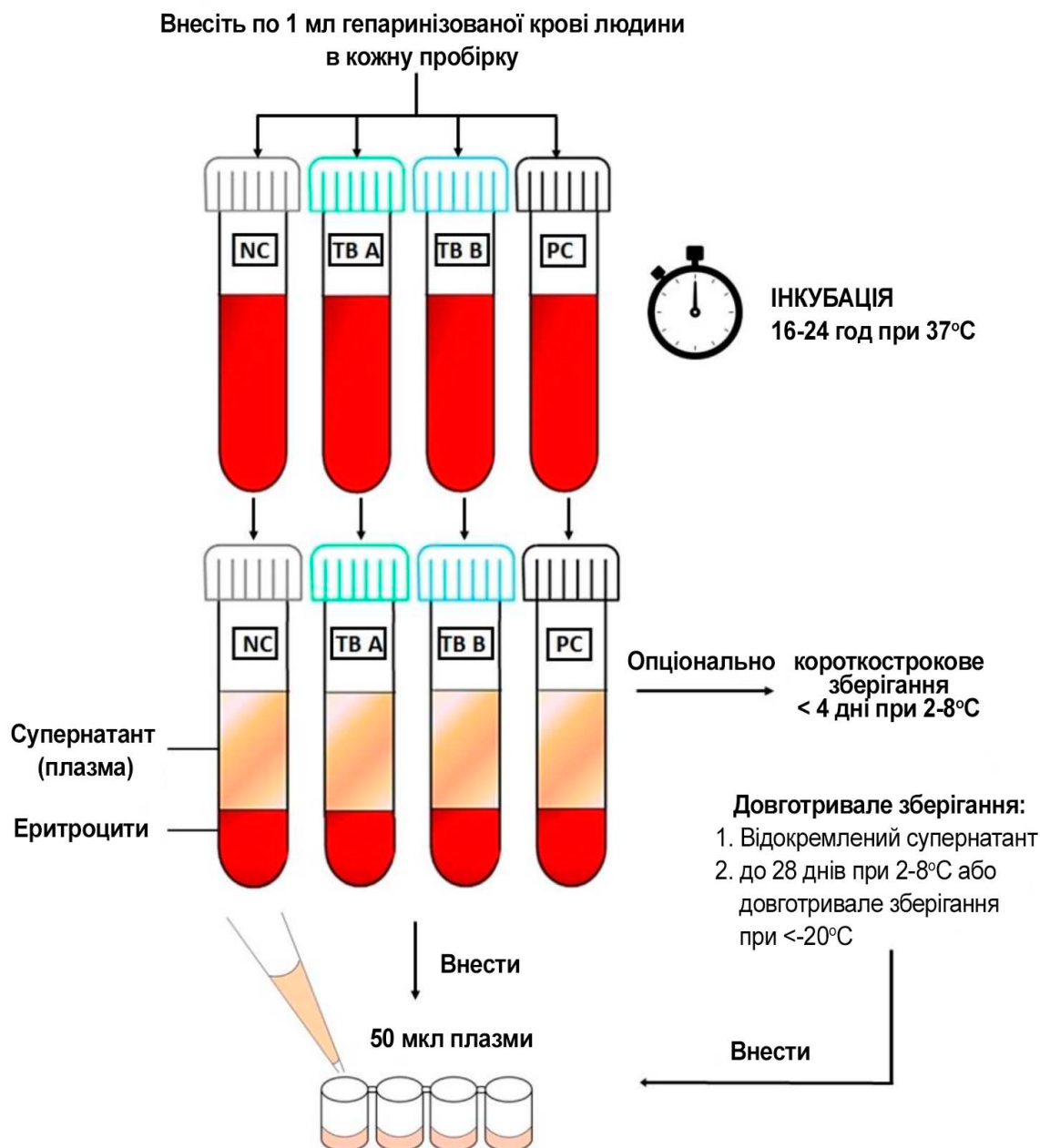
Час проведення тесту: 10 хвилин для кожного зразка. Час інкубації: 16 - 24 год.

1. Візьміть необхідну кількість пробірок для стимуляції людської крові **NC**, **ТВ А**, **ТВ В**, та **РС** з набору. Помістіть їх у штатив. Промаркуйте пробірки для стимуляції крові людини відповідним чином, наприклад, за номером зразка, ідентифікатором або Баркодом. Зніміть кришку кожної пробірки, потягнувши за ковпачок (не закручуючи), і поставте їх на рівну поверхню.
2. Переверніть пробірку для забору крові з Li-гепарином кілька разів догори дном. Переконайтеся, що зразок є однорідним. Якщо при перевертанні пробірки видно грудочку, обережно розпушіть її (наприклад, легким струшуванням). Перенесіть 1 мл зразка крові в кожну **ПРОБІРКУ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ** для кожної особи (**NC**, **ТВ А**, **ТВ В**, **РС**).
3. Обережно переверніть 10 разів догори дном кожну **ПРОБІРКУ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ**, наповнену 1 мл крові з Li-гепарином,. Уникайте сильного струшування, інакше клітини крові можуть гемолізувати!
4. негайно помістіть штатив з пробірками для стимуляції крові людини, наповненими 1 мл Li-гепарину, вертикально в інкубатор при температурі 37°C (± 0,5°C) мінімум на 16 годин. Максимальна тривалість інкубації - 24 години.
5. Нарешті, вийміть штатив з пробірками для стимуляції людської крові з інкубатора при 37°C (не струшуючи!). **Можна зібрати плазму без центрифугування, але будьте обережні, щоб уникнути забруднення еритроцитами.** Еритроцити накопичуються в гелевій пробці, яка відокремлює клітини від плазми.

Важливе зауваження: Якщо спостерігається забруднення еритроцитами, зберіть людську плазму після центрифугування пробірок протягом 15 хвилин при 2000 - 3000 RCF (g). Після центрифугування уникайте піпетування вгору-вниз або будь-якими іншим способами, що може призвести до повторного змішування з еритроцитами. Завжди слідкуйте за тим, щоб не пошкодити матеріал на поверхні гелю.

6. Зразки плазми слід збирати лише за допомогою піпетки. Переносьте безпосередньо з **ПРОБІРОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ** в лунки ІФА планшета для визначення IFN-γ. Перенесіть 50 мкл прозорої надосадової рідини (плазми людини) із **ПРОБІРОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ** в лунки планшета для мікротитрування та продовжуйте крок 5 «Процедури проведення ІФА тесту IFN-γ».

Примітка: можна використовувати автоматичний аналізатор ІФА.



Малюнок 2: Схема використання **ПРОБІРОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ**. Перенесіть зразки (надосадову рідину) за допомогою прямого піпетування в планшет ІФА. Також можливе використання автоматичного аналізатора ІФА. Можливе зберігати при температурі 2–8 °C або нижче -20 °C, як зазначено в розділі «Використання та зберігання стимульованої плазми».

ІФА набір для визначення IFN-γ людини

Процедра дослідження триває 3 годин

1. Підготуйте підготовлений промивний буфер і стандарти з розділу «Підготовка реагентів».
2. Завчасно вийміть всі компоненти набору з холодильника, щоб вони нагрілися до кімнатної температури (15 - 30°C, приблизно 30 хвилин)
3. Вийміть мікропланшет **MTP** з алюмінієвого пакета і помістіть необхідні стріпи в утримувач, що додається. Не потрібні стріпи покладіть назад в алюмінієвий пакет.
4. Внесіть по 50 мкл зразків, підготовлених стандартних розчинів № S1 - S3 та інкубаційного буферу в якості холостої проби (бланк) (S4) в кожну лунку. Стандарти і бланк повинні бути виміряні в паралелях, зразки – по одному. Зразки і стандарти можна вносити в будь-яке місце планшета для ІФА, але ми рекомендуємо розкапувати зверху вниз (див. приклад, показаний на малюнку 3 нижче). Це полегшить аналіз результатів вручну або за допомогою програмного забезпечення. Якщо ви певний час зберігали зразки плазми, перед використанням необхідно їх ретельно перемішати!

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 NC	3 NC	5 NC	7 NC	9 NC	S1		13 NC	15 NC	17 NC	19 NC	21 NC
B	1 TB A	3 TB A	5 TB A	7 TB A	9 TB A	S2		13 TB A	17 TB A	17 TB A	19 TB A	21 TB A
C	1 TB B	3 TB B	5 TB B	7 TB B	9 TB B	S3		13 TB B	15 TB B	17 TB B	19 TB B	21 TB B
D	1 PC	3 PC	5 PC	7 PC	9 PC	S4 (Blank)		13 PC	15 PC	17 PC	19 PC	21 PC
E	2 NC	4 NC	6 NC	8 NC	10 NC	11 NC	12 NC	14 NC	16 NC	18 NC	20 NC	22 NC
F	2 TB A	4 TB A	6 TB A	8 TB A	10 TB A	11 TB A	12 TB A	14 TB A	16 TB A	18 TB A	20 TB A	22 TB A
G	2 TB B	4 TB B	6 TB B	8 TB B	10 TB B	11 TB B	12 TB B	14 TB B	16 TB B	18 TB B	20 TB B	22 TB B
H	2 PC	4 PC	6 PC	8 PC	10 PC	11 PC	12 PC	14 PC	16 PC	18 PC	20 PC	22 PC

Малюнок 3: Зразки і стандарти можна вносити в будь-яке місце планшета для ІФА. Приклад схеми піпетування; стандартні розчини (S1 - S3) і холостий розчин (S4) розкапані в дублікатах; № 1 - 22 для окремих визначень зразка плазми, взятих з **ПРОБІРОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ** (NC, TB A, TB B, PC).

5. Додайте по 50 мкл **DET** розчин антитіл для детекції в кожну лунку. Накрийте планшет кришкою мікропланшета і ретельно перемішайте стандарти/зразки, використовуючи шейкер для мікропланшетів протягом 60 секунд при 500-1000 об/хв.

ІНКУБУЙТЕ: 1 годину (± 5 хв) при температурі 15 - 30°C

6. Відмивання: спорожніть лунки планшета (злийте або аспіруйте) і відмийте кожну лунку розведеним промивним буфером 6 циклів по 400 мкл..
7. Внесіть по 100 мкл розчину кон'югату **CON** в кожну лунку.

ІНКУБУЙТЕ: 1 годину (± 5 хв) при температурі 15 - 30°C

8. Відмивання: спорожніть лунки планшета (злийте або аспіруйте) і відмийте кожну лунку розведеним промивним буфером 6 циклів по 400 мкл.

9. Внесіть по 100 мкл розчину субстрату **TMB** в кожну лунку.

ІНКУБУЙТЕ: 30 хвилин (± 1 хв) при температурі 15 - 30°C, в темряві

10. Швидко додайте по 50 мкл стоп розчину **STO** в кожну лунку для завершення реакції з субстратом (більше не промивати!)

11. Виміряйте оптичну густину (ОГ) при 450 нм (можна виставити референтну довжину хвилі - 620 нм). Забарвлення залишається стабільним щонайменше 60 хвилин.



Малюнок 4: Схематична процедура ІФА тесту IFN-γ.

Розрахунок та інтерпретація тестів

Побудуйте діаграму розсіювання з графіком логарифмічної регресії. Для розрахунку еталонної кривої рекомендується використовувати автоматичні комп'ютерні програми.

Побудова стандартної кривої

Розрахуйте середнє значення оптичної густини для виміряних значень поглинання для кожного номера стандартного розчину. S1 - S3 та холостого розчину (S4).

Побудуйте стандартну криву $\log(e) - \log(e)$, відклавши $\log(e)$ середніх значень оптичної густини для стандартних розчинів № S1 - S3 на вертикальній осі (вісь y), а $\log(e)$ концентрації цитокіну (IFN- γ) на горизонтальній осі в МО/мл (вісь x). Виключіть холосту пробу (бланк) з цих розрахунків.

Розрахуйте лінію стандартної кривої за допомогою регресійного аналізу. Використовуйте стандартну криву для визначення концентрації IFN- γ (МО/мл) для кожного зразка плазми, використовуючи значення оптичної густини (ОГ) цього зразка.

Ці розрахунки можна виконати за допомогою статистичного програмного забезпечення (наприклад, Microsoft®Excel® або спеціального програмного забезпечення). Рекомендується використовувати ці пакети для розрахунку регресійного аналізу, коефіцієнта варіації CV (%) для стандартів і коефіцієнта кореляції (r) стандартної кривої.

ПРИМІТКА: Для розчинів № S1 - S3 і бланку (S4) різниця між значеннями не повинна перевищувати 10 %.

На діаграмі розсіювання з лінією регресії зв'язок між двома змінними представлено графічно, а на діаграмі побудовано лінію регресії (крива, яка найкраще відповідає нанесеним точкам). Рівняння цієї кривої наведено у вікні регресії нижче. Отримана опорна крива повинна бути прямою лінією ($r > 0,98$).

Розрахуйте концентрацію кожного виміряного зразка (МО/мл), використовуючи рівняння $\log(e)$ еталонної кривої:

$$\ln(y) = a \times \ln(x) + b$$

Змінимо формулу для y:

$$X = e^{(\ln(y) - b)/a}$$

Приклад рівняння регресії:

$$x = \text{конц. IFN-}\gamma \text{ [МО/мл]} \quad a = 1,1361$$

$$y = (\text{ОГ}) \text{ зразка.} \quad b = 1,3376$$

$$\text{конц. IFN-}\gamma \text{ [МО/мл]} = \text{EXP}((\text{LN}((\text{ОГ}) \text{ зразка}) - 1,3376) / 1,1361)$$

Для кількісного визначення кількості цитокіну (IFN- γ), що продукується стимульованими антигеном клітинами крові: Відніміть значення (конц. IFN- γ [МО/мл]), розраховане для негативного контролю **NC**, від значень, отриманих для позитивного контролю **PC**, **ТВ А**, **ТВ В** (флакони з ТВ антигеном). Після цього обчисліть 25 % від значення негативного контролю.

Інтерпретація результатів

Уважно ознайомтеся з інтерпретацією результатів (Таблиця 4)!

Таблиця 4: Інтерпретація результатів тестування.

NC	TB A - NC	TB B - NC	PC - NC	Результат
Негативний контроль [IU/mL]	TB antigen A мінус негативний контроль [IU/mL]	TB antigen B мінус негативний контроль [IU/mL]	Позитивний контр. мінус Негативний контр. [IU/mL]	
≤ 8.00	< 0.35	< 0.35	≥ 0.50	Негативний
	≥ 0.35 and < 25 % від значення негативного контроля	≥ 0.35 and < 25 % від значення негативного контролю		
	< 0.35	≥ 0.35 and < 25 % від значення негативного контролю		
	≥ 0.35 and < 25 % від значення негативного контроля	< 0.35		
	≥ 0.35 and ≥ 25 % від значення негативного контроля	не відповідний	не відповідний	Позитивний
	не відповідний	≥ 0.35 and ≥ 25 % від значення негативного контролю		
	< 0.35	< 0.35	< 0.50	Невизначений
	≥ 0.35 and < 25 % від значення негативного контроля	≥ 0.35 and < 25 % від значення негативного контролю		
	< 0.35	≥ 0.35 and < 25 % від значення негативного контролю		
	≥ 0.35 and < 25 % від значення негативного контроля	< 0.35		
> 8.00	не відповідний	не відповідний	не відповідний	

Відповіді на позитивний контрольний **PC** можуть бути за межами діапазону зчитування мікротитрованого планшета Це не впливає на результат тесту.

Особи з негативними контрольними значеннями **NC** більше 8 МО/мл класифікуються як невизначені, оскільки 25 % вища реакція антигену ТБ може бути за межами діапазону вимірювань тесту. Якщо результат є невизначеним, зверніться до розділу «Керівництво з пошуку і усунення помилок», щоб визначити можливі причини.

Контроль якості тесту

Набір ІФА для визначення IFN- γ людини містить внутрішній контроль. Стандарти розглядаються як внутрішній процедурний контроль. Він підтверджує достатній об'єм зразка і правильність процедури тестування. Результат тесту залежить від побудови стандартної кривої, яка повинна відповідати наступним критеріям, щоб вважатися правильною:

- Середня ОГ S1 (стандартний розчин 1) > 0,6
- CV (%) для повторних значень ОГ S1 і S2 < 15%
- Варіація значень ОГ реплікатів для S3 і S4 (бланк) < 0,04
- Коефіцієнт кореляції (r) від середніх значень ОГ стандартної кривої > 0,98
- Середня ОГ S4 (бланка) є внутрішнім негативним процедурним контролем і має бути < 0,19

Обмеження: Еталонна крива повинна бути прямою лінією (r > 0,98). Значення ОГ для готових до використання стандартів повинні бути в межах допустимих діапазонів, визначених вище ($\pm 10\%$). Якщо наведені вище критерії не виконуються, це вплине на аналіз результатів тесту, і тест буде недійсним. Недостатній об'єм зразка або неправильне виконання процедури тестування є найімовірнішими причинами недосагнення необхідних критеріїв якості виконання тесту.

Якщо граничне значення S4 (бланк, холоста проба, див. вище) було перевищено, слід вдосконалити процедуру промивання та/або перевірити температуру в приміщенні під час проведення тесту (температура в приміщенні повинна становити 15 - 30°C).

Звертись ще раз з інструкцією пробопідготовки та процедури тестування і повторіть тест на іншому ІФА рідері. Якщо проблема не зникає, зверніться до виробника або місцевого дистриб'ютора.

Обмеження

Уважно дотримуйтесь інструкцій процедури тестування та інтерпретації результатів! Недостатній об'єм зразка або неправильне виконання процедури тестування є найбільш вірогідними причинами недосагнення необхідних критеріїв якості виконання тесту (див. розділ «Контроль якості тесту»).

Метод IGRA слід використовувати як допоміжний засіб для діагностики інфікування *M. tuberculosis*. Позитивний результат тесту свідчить про ймовірність інфікування *M. tuberculosis*; негативний результат свідчить про те, що інфікування є малоімовірним. Невизначений результат вказує на невизначену ймовірність інфікування *M. tuberculosis*.

Рекомендується розглядати результати тесту LIOFERON®_{TB/LTBI} в поєднанні з іншими клінічними даними кожної особи, результатами інших діагностичних тестів та загальною епідеміологічною інформацією.

Незначні труднощі можуть виникати у випадках, коли інфікування *M. tuberculosis* є малоімовірним, а поширеність деяких НТМ є надзвичайно високою.

Тест був розроблений для виявлення IFN- γ людини у плазмі крові людини (забір у пробірки з Лі-гепарин). Для виявлення IFN- γ в інших рідинах організму, тест не валідований і може давати не коректні результати.

Зразок крові слід зберігати при кімнатній температурі (15 - 30°C) після забору і не використовувати, якщо він був отриманий більше ніж через 16 годин після венопункції. Не заморожуйте зразок крові. Життєздатність клітин не може бути гарантована після неправильного або тривалого зберігання крові.

Для вимірювання IFN-γ слід використовувати лише прозору надосадову рідину (плазму людини). При зборі плазми людини уникайте забруднення еритроцитами. Якщо необхідно, відокремте еритроцити від плазми за допомогою центрифугування. Уникайте бактеріального забруднення зразків!

Не слід екстраполювати стандартну криву, якщо розраховані значення є нелінійними. Зразки, що показують значення поглинання, які перевищують найвищу стандартну концентрацію, слід повторно проаналізувати при більш високому розведенні. Для подальшого аналізу зразки плазми людини можна розвести інкубаційним буфером [IB], наприклад, 1:20 (50 мкл плазми людини в 950 мкл інкубаційного буфера [IB]).

Високий рівень циркулюючого IFN-γ в крові людини може впливати на проведення аналізу і призводити до невизначених або недостовірних результатів. У тестах IGRA можуть відбуватися реверсія та конверсія. На реверсію можуть впливати різні фактори, в тому числі лікарські препарати. Можуть відбуватися динамічні зміни, які не пов'язані між собою і не пов'язані з клінічними станами пацієнтів. Ці зміни, які також спостерігаються у пацієнтів, які отримують лікування біологічними агентами, ускладнює інтерпретацію результатів. Для прийняття рішень щодо лікування пацієнтів з ослабленим імунітетом, які проходять серійні IGRA, все ще потрібне ретельне клінічне судження [28].

Заважаючі речовини

Використовуйте тільки свіжі зразки крові, що містять антикоагулянти (Li-гепарин). Не використовуйте інші біологічні рідини, окрім літій-гепаринової крові людини, оскільки інші не валідовані або можуть дати неправильні результати (наприклад, цитратна кров пригнічує ефективність аналізу).

Аналітична специфічність визначається шляхом вимірювання потенційних речовин, що заважають. До уваги беруться речовини, що використовуються для лікування пацієнта, речовини, які можуть бути проковтнуті пацієнтом, а також речовини, що зустрічаються в конкретних типах зразків. Наведені нижче речовини, протестовані в зазначених нижче концентраціях, не впливали на результати тесту:

Acetaminophen	20 mg/dL
Acetylsalicylic acid	20 mg/dL
Ascorbic acid	20 mg/dL
Bilirubin	60 mg/dL
Coffein	20 mg/dL
Glucose	2000 mg/dL
Haemoglobin	500 mg/dL
Lithium heparin	3 mg/dL
Tetracycline	20 mg/dL
Sodium heparin	3 mg/dL

Щоб уникнути посмилок, ми рекомендуємо виключити гемолізовані зразки з вимірювання, оскільки відомо, що певні компоненти еритроцитів переходять в плазму і можуть мати потенційний вплив на результати тесту.

Неоднорідність зразка, викликана надмірною кількістю ліпідів, може спричинити перешкоди через фізико-хімічні взаємодії. Крім того, висока концентрація ліпідів потенційно може змінити поведінку зв'язування цитокінів і, таким чином, фальсифікувати результати. Тому зразки з ліпемією використовувати не можна.

Нещодавнє або поточне лікування туберкульозу може призвести до неправильних результатів.

Рівень цитокінів у крові може швидко знижуватися після лікування. Іноді рівень цитокінів у зразках крові пацієнта може бути настільки низьким, що цитокіни навіть не можуть бути виявлені в плазмі крові людини - навіть за наявності інфекції або захворювання.

Зверніть увагу, що хибнопозитивні результати можуть бути спричинені втручанням гетерофільних антитіл, які зазвичай містяться в плазмі крові людей з різними захворюваннями або іншими станами, які не були визначені за допомогою цього тесту.

Азид натрію та інші нуклеофільні речовини (наприклад, консерванти для різних буферів) заважають активності пероксидази хрому. Таким чином, уникайте використання промивних буферів або інших розчинів, які можуть містити такі речовини, що заважають роботі пероксидази.

Ненадійні або невизначені результати можуть виникнути через екстраполяцію або відхилення від процедури.

Робочі характеристики

Діапазон вимірювань IFN-γ

Межа кількісного визначення (МкВ), межа виявлення (МВ) та межа блакового (холостого) визначення (МбВ) набору LIOFeron®TB/LTBI визначаються шляхом розрахунку на основі бланкових значень з додаванням 0,350 МО/мл (23 повторень, різних партій та різними операторами в різні дні). На основі вимірних даних були вираховані наступні значення:

МкВ = 0.2860 IU/mL

МВ = 0.1360 IU/mL

МбВ = 0.0936 IU/mL

Порівняльні дослідження

Було досліджено 135 зразків для розрахунку відповідності LIOFeron®TB/LTBI іншому референтному методу (QuantiFERON®TB-Gold Plus (Qiagen)). Конкордантність ЛІОФЕРОНУ®ТБ/ЛТБІ до референтного методу становила 96,00 % для позитивної групи та 98,82 % для негативної групи (табл. 5).

Таблиця 5: Співставлення результатів LIOFeron®TB/LTBI та QuantiFERON®TB-Gold Plus (Qiagen)

МЕТОД		QuantiFERON®TB-Gold Plus *	
		позитивний	негативний
LIOFeron®TB/LTBI	негативний	2	84
	позитивний	48	1
Загальна кількість		50	85
Відповідність		96,00 %	98,82 %

*Qiagen

Чутливість і специфічність

Аналітична чутливість, визначена шляхом вимірювання зразків з різною концентрацією IFN-γ в рамках одного аналізу (5 повторів кожен), становила приблизно 0,0625 МО/мл.

Клінічна чутливість і специфічність

Кожен раз, коли це було можливо, результати LIOFeron®TB/LTBI порівнювалися з остаточним діагнозом. Було проаналізовано 294 проби пацієнтів з відомим діагнозом. Серед негативного пулу 97,61 % були негативними після дослідження з тест-системою LIOFeron®TB/LTBI (мається на увазі здорові пацієнти, пацієнти з ВІЛ та пацієнтів з НТМ, 251 зразок). З позитивного пулу - 97,67 % були визначені позитивними з тест-системою LIOFeron®TB/LTBI (ТБ і LTBI, 43 зразки) (табл. 6).

Група зразків	Позитивні	Негативні	Загальна кількість зразків	Відповідність
Позитивні (ТБ+ЛТБ)	42	1	43	97,67 %
Негативні (ВІЛ, НТМ+, здорові)	6	245	251	97,61%

Ефективність тесту

Точність: Для демонстрації лінійності LIOFeron®_{TB/LTBI} зроблено 5 повторень 17 зразків (пул плазми) з різною концентрацією IFN-γ та пулом плазми без добавок (= нульова плазма) було розкапано в ІФА планшетах у випадковому порядку. Розраховані результати (МО/мл) наносилися на графік і порівнювались з очікуваними результатами. Було продемонстровано, що аналіз є лінійним до 4 МО/мл шляхом розрахунку коефіцієнта кореляції r ($r = 0,9953$, мал. 5), для концентрацій до 8,0 МО/мл аналіз майже лінійним ($r = 0,9824$).

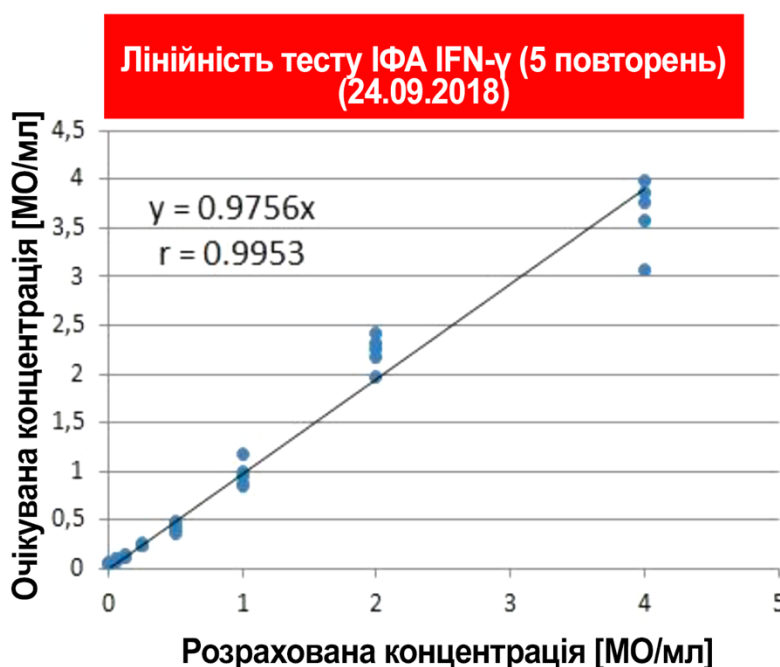


Рисунок 5: LIOFeron®_{TB/LTBI}: лінійності аналізу від 0 до 4 МО/мл.
Коефіцієнт кореляції r становив 0,9953.

Хук-ефект високих концентрацій: Людська плазма була доведена до концентрації 10000 МО/мл IFN-γ, потім зразки вимірювались за допомогою ІФА набором IFN-γ згідно інструкції з використання. Для концентрацій до 10000 МО/мл не спостерігався Хук-ефект високих концентрацій.

Точність: Для оцінки відтворюваності вимірювань були визначені внутрішні та міжвипробувальні варіації, а також між-операційної варіації та варіації від серії до серії шляхом вимірювання зразків з різною реактивністю за допомогою ІФА набору IFN-γ.

Міжсерійну варіацію визначали шляхом повторних вимірювань 3 зразків з різною реактивністю днів (негативний, слабкопозитивний, позитивний) 3 різних серій, протягом 10 різних днів. Похибка між аналізами (CV (%)) становила 11,73% для слабо позитивного зразка та 11,9% для позитивного зразка. Для негативного зразка (нульовий зразок) похибка становила 27,39%. Такий високий рівень

варіації був очікуваним через низький рівень розрахованої концентрації IFN-γ, оскільки варіації навколо низьких концентрацій зазвичай більші, ніж для вищих концентрацій.

Варіацію в межах постановки дослідження визначали шляхом повторних вимірювань зразків з різною реактивністю (3 зразки з різною реактивністю: негативний, слабо позитивний, позитивний зразок; 20 повторів). Внутрішньоаналізована похибка становила від 4,35% до 10,11% (CV (%)).

Варіацію від партії до партії визначали шляхом вимірювання різних зразків з 3 різними партіями наборів. Похибка коливалася від 2,52% до 19,05%. Як і очікувалося, вищий CV (%) вище 10% спостерігався для зразків з низьким рівнем. Відомо, що похибка навколо низьких рівнів вища, ніж для вищих рівнів. Середній CV (%), розрахований для всіх зразків, становив 8,37%.

Для визначення **міжоператорної варіації** 53 зразки з різною реактивністю були виміряні трьома різними операторами в різні дні. Варіації між операторами для значень ОП, виміряних для зразків, коливаються від 1,465% до 31,673%. Для низьких рівнів (МО/мл < 0,35) середній CV (%) становив 22,195%. Для рівнів вище межі (МО/мл > 0,350 < 8,0) середній CV (%) становив 12,759%.

Технічна інформація

Невизначені результати

Результати тестів, які аналізуються як невизначені, є рідкістю та можуть стосуватися імунного статусу досліджуваних осіб, але також можуть бути пов'язані з деякими технічними факторами:

- Інші, ніж рекомендовані температурні умови зберігання цільної крові (15 - 30°C)
- Недостатнє струшування ПРОБІРОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ після заповнення людською кров'ю (10 разів обережно догори дном)
- Більше за 16 годин зберігання людської крові між венепункцією та початком інкубації вже перенесеної крові в ПРОБІРОКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ при 37°C
- Помилки в процедурі промивки.
- Відомо, що частота невизначених результатів у пацієнтів з ослабленим імунітетом може бути вищою, ніж в інших групах²⁶.

Плазма зі згустками

При тривалому зберіганні плазми білки фібрину утворюють згустки, які можна прибрати центрифугуванням і полегшити піпетування необхідних об'ємів плазми.

Керівництво з пошуку і усунення помилок

Цей посібник з усунення несправностей може допомогти у вирішенні будь-яких проблем, які можуть виникнути. Якщо проблема не зникає, зверніться до виробника або місцевого дистриб'ютора (див. контакти в кінці інструкції)

Таблиця 7: Посібник з пошуку та усунення помилок

Неспецифічний розвиток забарвлення або високий фон	
Можлива причина	Що робити
Недостатнє відмивання планшета	Промийте планшет щонайменше 6 разів 400 мкл/лунку розведеним промивним буфером WB (1x)
Термін придатності компонентів набору минув	Використовуйте набір до закінчення терміну придатності. Зверніть увагу на термін придатності розведених компонентів.
Температура інкубації надто висока	Інкубацію ІФА слід проводити при кімнатній температурі (15 - 30°C)
Забули про змішування або розведення	Переконайтеся, що кожен крок виконано. Перевірте ще раз інструкції з пробопідготовки та процедури тестування і повторіть тест, проведіть вимірювання на іншому Рідері
Крос-контамінація	Будьте обережні при піпетуванні зразків і розчинів. Якщо в розчині субстрату TMB з'явився синє забарвлення, викиньте розчин. Зверніть увагу на чистоту резервуарів для реагентів. Після центрифугування ПРОБІРОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ ЛЮДСЬКОЇ КРОВІ не перемішуйте плазму людини перед збиранням, щоб уникнути забруднення зразка гелем з еритроцитами.
Низька оптична щільність стандартів	
Неправильна робота дозаторів	Піпетки повинні бути відкалібровані і використовуватися відповідно до інструкцій виробника.
Термін придатності компонентів набору минув	Використовуйте набір до закінчення терміну придатності. Зверніть увагу на термін придатності розведених компонентів.
Температура інкубації занадто низька	Інкубацію ІФА слід проводити при кімнатній температурі (15 - 30°C)
Помилки при розведенні стандартів	Переконайтеся, що розведення стандартів STA виконано відповідно до інструкцій з використання
Реагенти занадто холодні	Всі реагенти повинні бути прогріті до кімнатної температури (15 - 30°C)
Зчитування ОГ з використанням неправильного фільтра	Планшет має бути зчитаний протягом 60 хвилин після додавання стоп розчину STO при довжині хвилі 450 нм (додаткова довжина хвилі порівняння: 620 нм)
Нелінійна стандартна крива та подвійна мінливість	
Помилки при розведенні стандартів	Переконайтеся, що розведення стандартів STA виконано відповідно до інструкцій з використання
Недостатнє відмивання планшета	Промийте планшет щонайменше 6 разів 400 мкл/лунку розведеним промивним буфером WB (1x)
Недостатнє перемішування	Ретельно перемішуйте стандартні розчини STA під час розведення протягом 10 секунд на вортексері. Обов'язково ретельно перемішайте стандартні розчини S1 - S3 перед і додаванням у мікротитрований планшет
Довгі перерви при піпетуванні або переривання процедури тестування	Піпетування зразків і стандартних розчинів слід виконувати безперервно. Всі реагенти повинні бути підготовлені перед початком процедури аналізу

Список літератури

- [1] Behrman, A; Buchta, WG; Budnick, LD; Hodgson, MJ; Raymond, LW; Russi, M; Spillmann, SJ; Swift, MD (Aug 2013). "Protecting Health Care Workers From Tuberculosis, 2013: ACOEM Medical Center Occupational Health Section Task Force on Tuberculosis and Health Care Workers.". *Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine* 55 (8): 985–8. doi:10.1097/JOM.0b013e3182a0d7cd. PMID 23887706.
- [2] Belleste, B; Coberly, J; Barnes, GL; Ko, C; Chaisson, RE; Comstock, GW; Bishai, WR (Jun 1, 2002). "Evaluation of a whole-blood interferon-gamma release assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in 2 study populations.". *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 34 (11): 1449–56. doi:10.1086/340397. PMID 12015690.
- [3] CDC, Centers for Disease Control and Prevention CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People: Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States. MMWR 2010; 59 (No.RR-5): <https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/testing/igra.htm>.
- [4] Cecilia S. Lindestam Arlehamn, David Lewinsohn, Alessandro Sette, and Deborah Lewinsohn: Antigenes for CD4 and CD8 T Cells in Tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Jul; 4(7): a018465, 1–15. doi: 10.1101/cshperspect.a018465.
- [5] "Cytokine" in John Lackie. *A Dictionary of Biomedicine*. Oxford University Press. 2010. ISBN 9780199549351.
- [6] "Cytokine" in *Stedman's Medical Dictionary*, 28th ed. Wolters Kluwer Health, Lippincott, Williams & Wilkins (2006) http://en.wikipedia.org/wiki/Interferon_gamma.
- [7] Diel, R; Loddenkemper, R; Meywald-Walter, K; Niemann, S; Nienhaus, A (May 15, 2008). "Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (10): 1164–70. doi:10.1164/rccm.200711-1613OC. PMID 18276940.
- [8] Elena Chiappini, Chiara Della Bella, Francesca Bonsignori, Sara Sollai, Amedeo Amedei, Luisa Galli, Elena Niccolai, Gianfranco Del Prete, Mahavir Singh, Mario M. D'Elios, and Maurizio de Martino: Potential Role of *M. tuberculosis* Specific IFN-γ and IL-2 ELISPOT Assays in Discriminating Children with Active or Latent Tuberculosis. *PLoS One*. 2012; 7(9): e46041. Published online Sep 28, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046041
- [9] "Entrez Gene: IFNGR2".
- [10] Franken, WP; Timmermans, JF; Prins, C; Slootman, EJ; Dreverman, J; Bruins, H; van Dissel, JT; Arend, SM (Apr 2007). "Comparison of Mantoux and QuantiFERON TB Gold tests for diagnosis of latent tuberculosis infection in Army personnel.". *Clinical and vaccine immunology : CVI* 14 (4): 477–80. doi:10.1128/CI.00463-06. PMC 1865601. PMID 17301213.
- [11] Gerald H. Mazurek, M.D., Margarita E. Villarino, M.D. "Guidelines for Using the QuantiFERON-TB Test for Diagnosing Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection". Retrieved 2007-06-01.
- [12] Gray PW, Goeddel DV (August 1982). "Structure of the human immune interferon gene". *Nature* 298 (5877): 859–63. doi:10.1038/298859a0. PMID 6180322.
- [13] Green JA, Cooperband SR, Kibrick S (1969). "Immune specific induction of interferon production in cultures of human blood lymphocytes". *Science* 164 (3886): 1415–1417. doi:10.1126/science.164.3886.1415. PMID 5783715.
- [14] Horst Ibelgaufts. *Cytokines in Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia Version 31.4 (Spring/Summer 2013 Edition)*.
- [15] Mazurek, GH; LoBue, PA; Daley, CL; Bernardo, J; Lardizabal, AA; Bishai, WR; Iademarco, MF; Rothel, JS (Oct 10, 2001). "Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection.". *JAMA: the Journal of the American Medical Association* 286 (14): 1740–7. doi:10.1001/jama.286.14.1740. PMID 11594899.
- [16] Milstone, LM; Waksman BH (1970). "Release of virus inhibitor from tuberculin-sensitized peritoneal cells stimulated by antigen". *J Immunol* 105 (5): 1068–1071. PMID 4321289.
- [17] Pottumarthy, S; Morris, AJ; Harrison, AC; Wells, VC (Oct 1999). "Evaluation of the tuberculin gamma interferon assay: potential to replace the Mantoux skin test.". *Journal of clinical microbiology* 37 (10): 3229–32. PMC 85534. PMID 10488182.
- [18] Schoenborn JR, Wilson CB (2007). "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses". *Adv. Immunol.* 96: 41–101. doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2. PMID 17981204.
- [19] Streeton, JA; Desem, N; Jones, SL (Jun 1998). "Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection.". *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 2 (6): 443–50. PMID 9626600.
- [20] Thanassi, Wendy; Noda, Art; Hernandez, Beatriz; Newell, Jeffery; Terpeluk, Paul; Marder, David; Yesavage, Jerome A. (2012). "Delineating a Retesting Zone Using Receiver Operating Characteristic Analysis on Serial QuantiFERON Tuberculosis Test Results in US Healthcare Workers". *Pulmonary Medicine* 2012: 1–7. doi:10.1155/2012/291294.
- [21] Wheelock, EF, Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149, 310–311, 1965. It was also shown to be produced in human lymphocytes.
- [22] WHO (2018). "Latent TB Infection: Updated and consolidated guidelines for programmatic management". WHO/CDS/TB/2018.4, ISBN 978-92-4-155023-9, Page 1-74 (www.who.int/tb/publications/2018/latent-tuberculosis-infection/en/)
- [23] Zwerling, A; Benedetti, A; Cojocariu, M; McIntosh, F; Pietrangeli, F; Behr, MA; Schwartzman, K; Menzies, D; Pai, M (2013). "Repeat IGRA testing in Canadian health workers: conversions or unexplained variability?". *PLoS ONE* 8 (1): e54748. doi:10.1371/journal.pone.0054748. PMID 23382955.
- [24] Global tuberculosis report 2018; WHO http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- [25] Tamara Davenne and Helen McShane. Why don't we have an effective tuberculosis vaccine yet? *Expert Rev Vaccines*. 2016 Aug 2; 15(8): 1009–1013. Published online 2016 May 3. doi: 10.1586/14760584.2016.1170599 PMCID: PMC4950406. PMID: 27010255
- [26] Indeterminate results of a tuberculosis-specific interferon-γ release assay in immunocompromised patients. *Eur Respir J* 2010; 35: 1179–1191. DOI: 10.1183/09031936.00122109. Copyright ERS Journals Ltd 2010.
- [27] Chiara Della Bella, Michele Spinicci, Heba F. Mustafa Alnawisri, Eduard Arkadievich Shuralev, Alessandro Bartoloni, Mario Milco D'Elios. LIOFeron® TB/LTBI: A novel and reliable test for LTBI and tuberculosis. December 23, 2019 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.12.012>
- [28] Rossana Scrivo et al.: Are interferon-gamma release assays reliable to detect tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis treated with Janus kinase inhibitors? *PLOS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275329>

Символи

IVD	Для in vitro діагностики		Зберігати при 2-8°C
CE	Відповідність Директиві IVD 98/79/EG		Зберігати при 2-30°C
GTIN	Міжнародний торговий номер		Ознайомтесь з інструкцією
REF	Каталожний номер		Не використовувати посторно
LOT	Номер партії		Не використовувати у разі пошкодження
	Виробник		Захищати від впливу вологи
	Необхідно для виконання <n> тестів		Тримати подалі від сонячних променів
	Використати до ... (термін придатності)		
PC	Позитивний контроль	TB A	TB антиген А
NC	Негативний контроль	TB B	TB антиген В
MTP	Мікропланшет	TMB	Розчин субстрата
STA	Реконбіантний стандарт IFN-γ людини	STO	Стоп розчин
DET	Розчин для детекції антитіл	WB	Промивний буфер
CON	Розчин кон'югату	IB	Інкубаційний буфер

Контактна інформація

Для отримання додаткової інформації та технічної допомоги, будь ласка, звертайтеся%

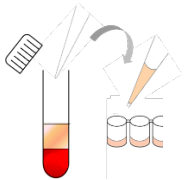
sales@lionex.de

or call+ 49 (0) 531 - 260 12 66

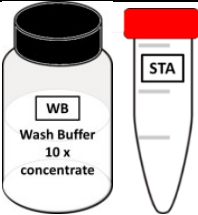
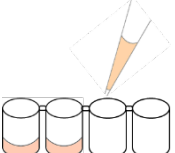
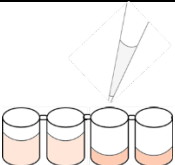
or visit our homepage www.lionex.de

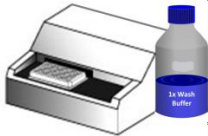
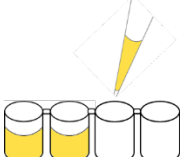
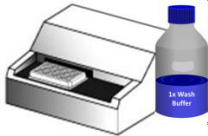
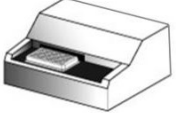
Скорочена процедура проведення тесту

Крок 1 – пробопідготовка з використанням ПРОБІРОК ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

	Забір цільної крові з вени: Заберіть мінімум 4,5 мл крові людини в стандартних лабораторних умовах (асептично, уникайте гемолізу) за допомогою Li-Heparin пробірки для забору крові.
 16 – 24 години	Обережно переверніть пробірку для забору крові з Li-Heparin приблизно 3 рази догори дном. Перенесіть по 1 мл зразка крові в кожен ПРОБІРКУ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ людини НС, ТВ А, ТВ В і РС та обережно перемішайте 10 разів догори дном. Негайно помістіть ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ у вертикальному положенні в інкубатор при температурі 37°C (± 0,5°C) на 16-24 години.
	Для отримання плазми - відцентрифугуйте пробірки протягом 15 хвилин при 2000 - 3000 RCF (g). Еритроцити мають накопичитися в гелевій пробці, яка відокремлює їх від плазми.
	Перенесіть 50 мкл прозорого супернатанту (людської плазми) безпосередньо в лунки планшета для та перейдіть до кроку 5 «Процедура тесту на IFN-γ ELISA ЛЮДИНИ» в інструкції з використання набору HUMAN IFN-γ ELISA. Або перенесіть зразки плазми у свіжі промарковані пробірки (наприклад, пробірки на 1,5 мл) і зберігайте максимум 28 днів при 2–8°C перед визначенням IFN-γ. Уникайте змішуванням з еритроцитами!

Крок 2 – робота з ІФА набором для визначення IFN-γ

 30 хвилин	Дістаньте з холодильника і зачекайте поки всі компоненти набору прогріються до кімнатної температури (15 - 30°C).
	Розведіть промивний буфер WB (10 x концентрат) (1 + 9 об'ємів), дистильованою водою. Розведіть стандарт STA рекомбінантного людського IFN-γ до 12,5 МО/мл вихідного розчину, додавши вказаний об'єм інкубаційного буферу IB та перемішайте шляхом інтенсивного струшування (наприклад, із застосуванням вортексу протягом 10 секунд). Приготуйте наступні стандартні розчини S1 - S4 (див. розділ «Приготування реагентів»).
	Перемішайте кожен зразок перед використанням. Внесіть піпеткою 50 мкл/лунку кожного зразка, підготовлених розчинів стандартів (з використанням IB) STA S1 - S3 і якості бланка (S4) в лунки мікропланшета MTP. Стандарти і бланк слід вносити і вимірювати в паралелях, зразки – по одному.
	Внесіть піпеткою 50 мкл/лунку розчину для детекції антитіл DET у лунки мікропланшета MTP. Ретельно перемішайте зразки, стандарти і розчину для детекції антитіл за допомогою шейкера для мікропланшетів протягом 1 хвилини при 500-1000 об/хв
 60 хвилин	ІНКУБУЙТЕ: 1 годину (± 5 хв) при температурі 15 - 30°C

	Промийте мікропланшет MTP 6 разів по 400 мкл/лунку розведеним промивним буфером WB
	Внесіть піпеткою в кожну лунку 100 мкл розчину кон'югату CON у лунки мікروتитрованого планшета МТР.
 60 хвилин	ІНКУБУЙТЕ: 1 годину (± 5 хв) при температурі 15 - 30°C
	Промийте мікропланшет MTP 6 разів по 400 мкл/лунку розведеним промивним буфером WB
	ІНКУБУЙТЕ: 30 хвилин (± 1 хв) при температурі 15 - 30°C в темряві
	Виміряйте поглинання (ОГ) при 450 нм (додаткова довжина хвилі порівняння: 620 нм). Забарвлення стабільне протягом щонайменше 60 хвилин.
	Обрахуйте результати (за допомогою програмного забезпечення або вручну, дотримуючись цієї інструкції з використання). Примітка: будь ласка, перевірте на сайті www.lionex.de, щоб дізнатися про конкретне програмне забезпечення.

Торгові марки:

LIONEX®, LIOFeron®, Microsoft®, Excel® (Microsoft), QuantiFERON® (Qiagen)

Обмежена ліцензійна угода для LIOFeron®_{TB/LTBI} - 2 компонентний набір включає ПРОБІРКИ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ КРОВІ ЛЮДИНИ та ІФА набір для визначення IFN-γ.

Використання цього продукту означає згоду будь-якого покупця або користувача продукту з наступними умовами:

1. Виріб може використовуватися тільки з інструкціями, що містяться в комплекті, та компонентами комплекту. LIONEX GmbH не надає жодних ліцензій на будь-які компоненти, що входять до складу цього набору, будь-які компоненти, що не входять до складу цього набору (за винятком описаних в інструкції та наборі), або на інтелектуальні здібності.
2. За винятком прямих ліцензій, LIONEX GmbH не дає жодних гарантій, що набір та/або його використання не порушує правила та не обмежує права третіх осіб.
3. Набір та його компоненти ліцензовані для одноразового використання і не допускається повторне використання компонентів набору. Переробляти іншим чином або перепродавати, якщо інше не визначено LIONEX GmbH.
4. LIONEX GmbH відмовляється від будь-яких інших ліцензій, зазначених або позначених, окрім тих, що прямо вказані.
5. Покупець і користувач набору зобов'язується не дозволяти іншим особам здійснювати будь-які дії, які можуть призвести до або сприяти будь-яким діям, забороненим вище. LIONEX GmbH може вимагати виконання заборон цієї Обмеженої ліцензійної угоди в будь-якому суді, а також відшкодувати всі свої витрати на розслідування та судові витрати, гонорари адвокатів, пов'язані з будь-якими діями, спрямованими на виконання цієї Обмеженої ліцензійної угоди або будь-яких прав інтелектуальної власності, які стосуються набору та його компонентів. For updated license terms, see www.lionex.de.

Оновлені умови ліцензії див www.lionex.de або LIOFeron®_{TB/LTBI}.

©2020, LIONEX GmbH, всі права захищені.

Виробник:**LIONEX GmbH**

Зальцдалюмер штрассе 196,

б. 1A 38126 Брауншвайг,

Німеччина

Тел: +49 (0) 531 - 260 12 66

Факс: +49 (0) 531 - 618 06 54

Web: www.lionex.de

E-mail: sales@lionex.de

Дистриб'ютор:**ТОВ Іннова Біо**

вул. Йорданська, буд. 6А,

04211, м. Київ,

Україна

Тел: +38 097-349 19 88

E-mail: sales@lionex.de