



2023 年 3 月

QuantiFERON®-TB Gold Plus

ELISA Kit 使用説明書



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

バージョン 1

IVD

体外診断用医薬品

QuantiFERON®-TB Gold Plus Blood Collection Tubes 用



REF

622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ドイツ

R4

MAT

1123669JA

目次

使用目的	5
対象ユーザー	5
説明と原理	6
病原体情報	6
概要と説明	6
アッセイの原則	9
キットに含まれる資材	11
キットの内容	11
キットのコンポーネント	12
プラットフォームおよびソフトウェア	12
キット以外に必要な資材	13
追加の試薬	13
消耗品	13
器具	13
警告と注意	14
安全情報	14
緊急情報	15
注意事項	16
試薬の保管と取り扱い	18
使用中の安定性	18
溶解された試薬と未使用の試薬	18
検体の保管と取り扱い	19
プロトコール：ELISA の実施	20

結果（計算）	26
標準曲線およびサンプル値の生成	26
検査の品質管理	28
結果の解釈	30
制限事項	32
性能特性	33
臨床試験	33
感度	36
期待値	43
安全性と性能の概要	49
アッセイ性能特性	50
分析性能	50
廃棄	63
参考文献	64
トラブルシューティングガイド	66
図記号	70
付録 A：技術情報	73
不確定結果	73
凝固した血漿サンプル	73
高脂肪血漿サンプル	73
付録 B：省略された ELISA 試験手順	74
注文情報	76
文書の改訂履歴	78

使用目的

QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) アッセイは、ESAT-6 および CFP-10 タンパク質をシミュレートするペプチドカクテルにより、ヘパリン処理全血中の細胞を刺激するための体外診断テストです。酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によるインターフェロン- γ (IFN- γ) の検出は、ヒト型結核菌の感染に関連するペプチド抗原への体外反応を特定するために使用します。

QFT-Plus は *M. tuberculosis* 感染（疾患を含む）の間接的検査であり、リスク評価、X 線撮影、その他の医学的・診断的評価と併せて使用することを目的としています。

対象ユーザー

このキットは専門家が使用するためのものです。

QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) アッセイは、実験室環境で訓練を受けた人員が使用するものです。

説明と原理

病原体情報

結核は、*M. tuberculosis* 菌群 (*M. tuberculosis*、*M. bovis*、*M. africanum*、*M. microti*、*M. microti*、*M. caprae*) の感染を原因とする伝染病です。これらの菌は通常、肺結核患者からの飛沫核を通じて空気感染により新しい宿主に広がります。新しい感染者は数週間から数か月のうちに結核から体調を崩すことがありますが、ほとんどの感染者は健康を維持します。一部の感染者においては無症候性で非感染性の潜在性結核感染症 (Latent Tuberculosis Infection、LTBI) が持続し、数か月から数年後に結核を発症する場合があります。LTBI を診断する主な目的は、結核を防ぐための治療を検討することにあります。100 年以上にわたり、ツベルクリン反応検査 (Tuberculin Skin Test、TST) は LTBI を診断する唯一の手段でした (4) 。ツベルクリンに対する皮膚感受性は、感染後 2~10 週間後に形成されます。ただし、免疫機能を妨げる広範な症状を有する一部の感染者だけでなく、そのような症状のない感染者においても、ツベルクリンに反応しない人がいます。反対に、*M. tuberculosis* に感染していないと思われる人では、ツベルクリンに対する感受性を示して Bacille Calmette-Guérin (BCG) ワクチンを接種した後や、*M. tuberculosis* 群以外の抗酸菌に感染したり、あるいはその他不明の原因により、陽性の TST 結果が出ることもあります。

LTBI は、通常は肺や下気道に関わり、ときに他の臓器系に影響する場合もある報告可能な症状である結核とは区別する必要があります。結核は、病歴、身体、放射線画像、抗酸菌学の所見によって診断されます。

概要と説明

QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) 試験は、全血サンプル中の IFN γ の定量測定により細胞性応答を評価する、第 4 世代の QuantiFERON-TB 検査技術です。QFT-Plus は、抗酸菌タンパク質をシミュレートするペプチド抗原に対する細胞性免疫 (Cell-Mediated Immune、CMI)

応答を測定する定性試験です。これらのタンパク質、ESAT-6 および CFP-10 は、*M. kansasii*、*M. szulgai* と *M. marinum* を除き、すべての BCG 株やほとんどの非結核性抗酸菌には存在しません (1)。*M. tuberculosis* 群に感染した人では、通常、抗酸菌抗原を認識するリンパ球が血中に存在します。このような認識プロセスは、サイトカイン、IFN- γ の生成と分泌に関連しており、IFN- γ の検出とそれに続く定量が、この検査の基盤となっています。

ツベルクリン反応検査と IGRA の検査は有用ではありますが、病気の患者の *M. tuberculosis* 群感染の診断には十分ではありません。陽性判定は結核であるという診断を裏付けることはできますが、他の抗酸菌 (*M. kansasii* など) の感染によっても陽性の結果が出る可能性があります。結核の確定や排除には、他の医療的・診断的な評価が必要です。

QFT-Plus で使用する抗原は、タンパク質 ESAT-6 および CFP-10 をシミュレートするペプチドカクテルです。これらのペプチド抗原は、*M. tuberculosis* 感染者の T 細胞において IFN- γ 応答を刺激しますが、通常は、非感染者や、BCG ワクチンを接種した、疾患のない、または LTBI のリスクのない人の T 細胞では刺激しないことが多数の研究により実証されています (1、2、6、9)。ただし、免疫機能を阻害する治療や症状によって、IFN- γ 応答が低下する可能性があります。その他の特定の抗酸菌に感染している患者でも ESAT-6 および CFP-10 に応答を示す可能性があります。これは、これらのタンパク質をコードする遺伝子が *M. kansasii*、*M. szulgai*、*M. marinum* に存在するためです (1、3、7)。

QFT-Plus 検査の被検者は、活動性結核が臨床的に確認された患者、および結核の感染または潜在性結核感染症 (Latent Tuberculosis Infection、LTBI) のリスクがある患者です。年齢や性別などの制限は適用されません。

MTB 感染では、CD4⁺T 細胞がサイトカイン IFN- γ の分泌を通じた免疫制御において重要な役割を担っています。現在では、MTB に対する宿主の防御に参加する CD8⁺T 細胞の役割を裏付ける証拠があります。この細胞は、MTB の増殖を抑制したり、感染細胞を破壊したり、細胞内 MTB を直接溶解させたりするマクロファージを活性化する IFN- γ やその他の可溶性因子を生成します。LTBI や活動性結核の被験者では、MTB に特異的な CD8⁺細胞を生成する IFN- γ が検出されています。さらに、ESAT-6 および CFP-10 に特異的な CD8⁺T リンパ球は、LTBI と比べて活動性結核に感染した被験者で検出されることが多いとされており、最近の MTB 曝露に関連している可能性があります (8、10-12)。また、IFN- γ を生成する MTB 特異的 CD8⁺T 細胞は、HIV に同時感染している活動性結核の被験者や (13、14)、結核を患っている幼児 (15) でも検出されています。

QFT-Plus には、TB 結核抗原チューブ 1 (TB1) と TB 結核抗原チューブ 2 (TB2) の 2 本の異なる結核抗原チューブがあります。どちらのチューブにも、結核菌群関連抗原である ESAT-6 および CFP-10 由来のペプチド抗原が含まれています。TB1 チューブと TB2 チューブには、どちらも CD4⁺T ヘルパーリンパ球から CMI 応答を誘導するよう設計された、ESAT-6 および CFP-10 由来のペプチドが含まれています。また、TB2 チューブには、CD8⁺細胞傷害性 T リンパ球から CMI 応答を誘導することを目的とした、追加のペプチドのセットが含まれています。

M. tuberculosis 感染のリスク因子には、結核に対する病歴、医療、疫学的な予測因子や、結核への曝露などがあります。*M. tuberculosis* の感染 (疾患を含む) の診断と、検査被験者の選択に関する詳しい推奨事項については、最新の WHO ガイダンス (<https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment>) を参照してください (16)。ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus、HIV) の検査で陽性となった人、最近の結核患者に接触した人、人口密度の高い環境における居住者で、結核のリスクが高い成人に曝露した人など (5)、最新の WHO ガイダンスに従い、QFT-Plus は結核感染のスクリーニングに適応する患者群で検査されています (16)。

アッセイの原則

QFT-Plus は、*M. tuberculosis* タンパク質をシミュレートするペプチド抗原が含まれ、全血の採取に使用される専用の血液採取チューブを使用する定性アッセイです。血液のインキュベーションはチューブ内で 16~24 時間かけて行われ、その後に血漿を回収し、ペプチド抗原への応答において生成される IFN- γ の有無を検査します。

まず、全血が、Nil チューブ、TB1 チューブ、TB2 チューブ、Mitogen チューブなどからなる各 QFT-Plus Blood Collection Tubes に採取されます。または、抗凝固剤として、リチウムヘパリンまたはヘパリンナトリウムを含む 1 本の血液採取チューブに血液を採取してから、QFT-Plus Blood Collection Tubes に移してもかまいません。

QFT-Plus Blood Collection Tubes を振とうして抗原と血液を混和し、採取から 16 時間以内に、できるだけ早く 37°C $\pm$ 1°C でインキュベートする必要があります。16~24 時間のインキュベーションに続き、チューブを遠心分離し、血漿を処理し、ELISA によって IFN- γ (IU/ml) の量を測定します。QFT-Plus ELISA では、参照 IFN- γ 調製 (NIH Ref: Gxg01-902-535) に対して評価された、組換えヒト IFN- γ 標準を使用します。テストサンプルの結果は、キットに付属の標準をテスト希釈して調製された標準曲線に対し、ml あたりの国際単位 (IU/ml) で報告されます。

特定の個人の血清または血漿中のヘテロフィル (ヒト抗マウスなど) 抗体は、免疫アッセイの干渉の原因になることがわかっています。QFT-Plus ELISA のヘテロフィル抗体の効果は、正常マウスの血清をグリーン希釈剤に添加し、マイクロプレートウエルに塗布される IFN- γ 捕捉抗体として F(ab')₂ モノクローナル抗体フラグメントを使用することで最小限に抑制されます。

QFT-Plus アッセイは、Nil IFN- γ IU/ml の値を大幅に上回るいずれかの結核抗原チューブに対する IFN- γ 応答への陽性とみなされます。Mitogen チューブの血漿サンプルは、試験対象の各試料に対する IFN- γ 陽性コントロールとして機能します。Mitogen (<0.5 IU/ml) に対する低い反応は、血液サンプルが結核抗原に対して陰性反応であった場合に、結果が確定できないことを示します。このようなパターンは、リンパ球が不十分であったり、不適切な検体の取り扱いによってリンパ球活動が低かったり、Mitogen チューブの充填/混合、または患者のリンパ球が IFN- γ を生成できない場合に発生します。Nil サンプル中の高濃度の IFN- γ は、ヘテロフィル抗体の存在に伴い、または内因性の IFN- γ 分泌に対して発生する場合があります。Nil チューブは、バックグラウンド（高濃度の循環 IFN- γ や、ヘテロフィル抗体の存在など）に合わせて調整します。Nil チューブの IFN- γ 濃度は、結核抗原チューブおよび Mitogen チューブの IFN- γ 濃度から差し引かれます。QFT-Plus ELISA の測定範囲は最大で 10 IU/ml です。

キットに含まれる資材

キットの内容

ELISA コンポーネント カタログ番号	2 プレートキット 622120	参照ラボパック 622822
マイクロプレートストリップ （12 x 8 ウェル）、マウスの抗ヒト IFN- γ モノクローナル抗体を塗布	12 x 8 マイクロ プレートストリッ プ 2 セット	12 x 8 マイクロプ レートストリップ 20 セット
IFN- γ Standard, (IFN γ 標準、凍結乾燥 （組換えヒト IFN- γ 、ウシカゼイン、 0.01% w/v チメロサルを含む））	1 x バイアル （溶解した場合 8 IU/ml）	10 x バイアル （溶解した場合 8 IU/ml）
Green Diluent（グリーン希釈剤（ウシカゼイン、正常マウスの血清、0.01% w/v チメロサルを含む））	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate,（コンジュゲート 100x 濃縮液、凍結乾燥（マウスの抗ヒト IFN- γ HRP、0.01%チメロサルを含む））	1 x 0.3 ml （溶解した場合）	10 x 0.3 ml （溶解した場合）
Wash Buffer 20x Concentrate（洗浄バッファー20x 濃縮液（pH 7.2、0.05% v/v ProClin® 300 を含む））	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution（酵素基質溶液（H ₂ O ₂ 、3,3', 5,5'テトラメチルベンジジンを含む））	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution（酵素反応停止液（0.5 M H ₂ SO ₄ を含む））	1 x 15 ml	10 x 15 ml
QuantiFERON TB-Gold Plus ELISA Kit 使用説明書	1	1

キットのコンポーネント

コントロールとキャリブレーター

QFT-Plus ELISA では、参照 IFN- γ 調製 (NIH Ref: Gxg01-902-535) に対して評価された、組換えヒト IFN- γ 標準を使用します。

プラットフォームおよびソフトウェア

QFT-Plus Analysis Software はオプションで使用し、生データの解析や結果の計算に使用できます。 www.qiagen.com からダウンロードできます。

キット以外に必要な資材

追加の試薬

- QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- 脱イオンまたは蒸留水、2L

消耗品

- 96 ウェルプレート用プレート蓋
- オプション：96-ウェルフォーマットラックに入ったキャップ付き 1 ml マイクロチューブ、または血漿保管用プラスチックシール付きの非コーティングマイクロプレート（ラックまたはプレート当たり患者 22 人分）
- 試薬リザーバ

器具 *

- 37°C ± 1°C インキュベーター（CO₂ あり、またはなし）
- キャリブレーション済み容量可変ピペット、10µl～1000µl に対応、使い捨てチップ付き
- キャリブレーション済みマルチチャンネルピペット、50µl および 100µl に対応、使い捨てチップ付き
- マイクロプレートシェーカー、速度 500～1000 rpm に対応
- マイクロプレートワッシャー（血漿サンプル取り扱いにおける安全を考慮し、自動プレートワッシャーを推奨）
- マイクロプレートリーダー、450 nm フィルター、および 620 nm～650 nm 参照フィルター付き
- 可変速ボルテックス
- 遠心分離機、3000 RCF (g) 以上で Blood Collection Tubes を遠心分離可能
- メスシリンダー、1 L または 2 L

*使用開始前に、装置が製造者の推奨に従って点検され、キャリブレーションされていることを確認してください。

警告と注意

デバイスに関連して発生した重大なインシデントを、製造元やその権限を有する代表者、ならびにユーザーや患者を規定する規制当局に報告するときは、地域の規制に留意しなければならない可能性要があることにご注意ください。

体外診断用医薬品。

安全情報

薬品を取り扱う際には、必ず適切な白衣を着用し、使い捨ての手袋と保護メガネを使用してください。詳細は、適切な安全データシート（Safety Data Sheets, SDS）を参照してください。これらは、各 QIAGEN キットおよびキットコンポーネントの SDS を検索、表示、印刷可能な www.qiagen.com/safety から、便利でコンパクトな PDF 形式でオンラインにて入手できます。

- 検体とサンプルは潜在的に感染力があります。サンプルとアッセイの廃棄物は、地域の安全手順に従って廃棄してください。
- 陰性の QFT-Plus 結果は、*M. tuberculosis* 感染や結核の可能性を除外するものではありません。感染段階（細胞性免疫応答発症前に採取した試料など）、静脈穿刺後の血液採取チューブの不適切な取り扱い、アッセイの不適切な性能、または共存疾患に関連する個人の免疫学的可変要素によって偽陰性の結果が出る場合があります。その他の炎症性疾患によるヘテロフィル抗体または非特異的 IFN- γ の生成により、ESAT-6 または CFP-10 ペプチドに対する特定の応答が覆い隠されることがあります。
- 陽性の QFT-Plus 結果を、*M. tuberculosis* の感染を判断する唯一または決定的な根拠とするべきではありません。アッセイの不適切な性能により、偽陽性の QFT-Plus の結果が出る可能性があります。

- 陽性の QFT-Plus 結果の後には、活動性結核についてさらに詳しい医学的評価を行う必要があります（抗酸菌塗抹・培養検査、胸部 X 線）。
- ESAT-6 および CFP-10 はすべての BCG 株、および大半の既知の非結核性抗酸菌には存在しないものの、陽性の QFT-Plus 結果が *M. kansasii*、*M. szulgai*、または *M. marinum* の感染によるものであることがあります。このような感染が疑われる場合は、代替検査を実施する必要があります。
- 偽陰性の QFT-Plus 結果は、不正な血液サンプルの採取、またはリンパ球の機能に影響を及ぼすような不適切な試料の取り扱いが原因で発生することがあります。血液検体の適切な取り扱いについては、「プロトコール：ELISA の実施」セクション（20 ページ）を参照してください。インキュベーションの遅れによって偽陰性や不確定結果の原因となったり、その他の技術的パラメーターが重要な IFN- γ 応答の検出に影響を及ぼしたりすることがあります。

緊急情報

CHEMTREC

米国およびカナダ以外の国 +1 703-527-3887

注意事項

注意 	ヒト血液は、感染の可能性があるものとして取り扱ってください。 関連の血液取り扱いガイドラインを遵守してください。連邦、州、地域の規制に従い、血液や血液製剤に接触したサンプルや材料は廃棄してください。
---	---

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



硫酸を含む。警告金属を腐食させるおそれがあります。皮膚の刺激の原因となります。重大な目刺激の原因となります。防護用手袋、防護服、目および顔面の保護具を使用してください。

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

警告皮膚への軽い刺激の原因となります。防護用手袋、防護服、目および顔面の保護具を使用してください。

QuantiFERON Green Diluent



タルトラジンを含む。警告皮膚のアレルギー反応の原因となる可能性があります。防護用手袋、防護服、目および顔面の保護具を使用してください。

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

長期的、持続的に水性生物に有害性をもたらす恐れがあります。環境に出しないでください。

詳細情報

安全データシート：www.qiagen.com/safety

- 一部の QFT-Plus 試薬では、保存料としてチメロサルが使用されています。飲み込んだり、吸入したり、皮膚に接触すると有害となる恐れがあります。
- *QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) 使用説明書*に従わない場合、誤った結果となる可能性があります。使用前に説明をよく読んでください。
- 使用する前に試薬ボトルに損傷や漏れが見られる場合には、キットを使用しないでください。
- **重要：**使用前にバイアルを点検します。損傷が見られたり、ゴム製のシールが損なわれたりしている場合は、コンジュゲートまたは IFN- γ 標準バイアルを使用しないでください。破損したバイアルを取り扱わないでください。適切な安全上の注意事項に従い、バイアルを安全に廃棄してください。金属製のクリンプキャップによる怪我のリスクを最小限に抑制するため、バイアルデクリンパーを使用してコンジュゲートまたは IFN- γ 標準バイアルを開けることを推奨します。
- 別の QFT-Plus キットのバッチのマイクロプレートストリップ、IFN- γ 標準、グリーン希釈剤、またはコンジュゲート 100x 濃縮液を混和したり使用したりしないでください。試薬が有効期限の範囲内であり、ロットの詳細情報が記録されている場合は、キット間でその他の試薬（洗浄バッファー 20x 濃縮液、酵素基質溶液、酵素反応停止液）を交換できます。
- 未使用の試薬と生物学的サンプルは、地域、州、および連邦の規制に従って廃棄してください。
- 有効期限を過ぎた QFT-Plus ELISA キットを使用しないでください。
- 常に適切な実験室の手順に従ってください。
- プレートワッシャーやリーダーなどの実験室の装置が、使用できるようにキャリブレーションされ、検証されていることを確認します。

試薬の保管と取り扱い

すべてのコンポーネントの箱とラベルに印刷された有効期限と保管条件に注意する必要があります。期限切れの、または不適切な方法で保管したコンポーネントは使用しないでください。

使用中の安定性

- ELISA キットは 2～8℃ で保管します。
- 酵素基質溶液は、必ず直射日光から保護してください。

溶解された試薬と未使用の試薬

- 試薬の溶解方法については、「プロトコール：ELISA の実施」（20 ページ）を参照してください。
- 溶解されたキット標準は、2～8℃ で保管されている場合、最長 3 か月保管できます。

キット標準が溶解された日付をメモしてください。

- 溶解されたコンジュゲート 100x 濃縮液は 2～8℃ で保管するように戻し、3 か月以内に使い切ります。

コンジュゲートが溶解された日付をメモしてください。

- 有効な強度のコンジュゲートは、調製から 6 時間以内に使い切ってください。
- 有効な強度の洗浄バッファーは、室温で最長 2 週間保管できます。
- マイクロプレートストリップは使い捨てです。未使用のストリップはプレートフレームから取り外し、今後の使用のために保管できます。

検体の保管と取り扱い

QFT-Plus 検査の血液採取ワークフローの詳細は、*QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes 使用説明書* (1123668) を参照してください。

プロトコール：ELISA の実施

開始する前の重要な留意点

設定（アッセイ実施の所要時間）

- QFT-Plus アッセイから有効な結果を得るには、オペレーターは設定された時間内に特定のタスクを実行する必要があります。アッセイを使用する前に、オペレーターがアッセイの各段階を慎重に計画し、各段階の実施に適切な時間を配分することを推奨します。およその所要時間は以下の通りです。バッチ処理での複数のサンプルの検査時間も示されています。
 - 1 枚の ELISA プレートにつき約 3 時間
 - 作業は 1 時間未満
 - プレートが 1 枚増えるごとに 10～15 分を追加

IFN- γ ELISA

- ELISA を実施するために必要な材料については、「キットの内容」（11 ページ）および「キット以外に必要な資材」（13 ページ）を参照してください。

操作手順

1. 使用前に、コンジュゲート 100x 濃縮液を除き、すべての血漿サンプルと試薬を室温（22°C $\pm$ 5°C）に戻す必要があります。平衡化に最低でも 60 分を割り当てます。
2. フレームから不要な ELISA プレートストリップを取り除き、フォイルポーチに入れて再密封し、必要になるまで冷蔵庫で保管します。

3. QFT-Plus 標準に対して最低 1 ストリップを、また検査対象の被験者の数に対して十分なストリップを用意します（推奨プレートフォーマットについては図 2 を参照）。使用後、残ったストリップで使用しますので、フレームと蓋は保持しておきます。
- 3a. バイアルのラベルに記載された量の脱イオン水または蒸留水で IFN- γ 標準を溶解します。泡立ちを最小限に抑制するよう、そっとかき混ぜ、バイアルの内容物がすべて完全に溶解したことを確認します。IFN- γ 標準を適切な量に溶解すると、8.0 IU/ml の濃度の溶液ができます。
- 3b. 溶解された標準を使用して、4 つの IFN- γ 濃度の希釈系列を調製します（図 1 を参照）。
- 3c. 以下の IFN- γ 濃度で標準曲線が生成されます。
- S1 (Standard1)、4.0 IU/ml を含む
 - S2 (Standard2)、1.0 IU/ml を含む
 - S3 (Standard3)、0.25 IU/ml を含む
 - S4 (Standard4)、0 IU/ml を含む（グリーン希釈剤[GD]のみ）。
- 3d. 標準は最低でも二重に評価する必要があります。
- 3e. ELISA セッションごとにキット標準の新鮮な希釈液を調製します。

操作手順

A	ラベル 4 チューブ：S1、S2、S3、S4
B	150 μ l の GD を S1、S2、S3、S4 に添加します
C	150 μ l のキット標準を S1 に添加し、十分に混和します
D	S1 から S2 に 50 μ l を移し、十分に混和します
E	S2 から S3 に 50 μ l を移し、十分に混和します
F	GD のみがゼロ標準となります（S4）

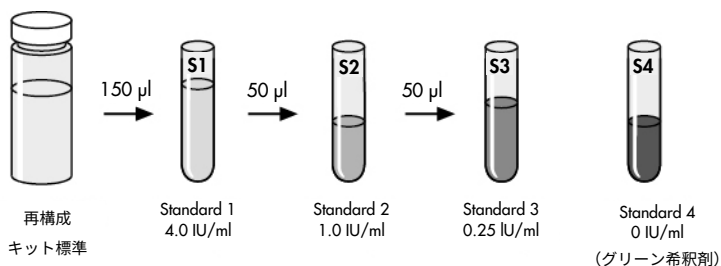


図 1. 標準曲線希釈系列の調製

4. 0.3 ml の脱イオン水または蒸留水で凍結乾燥されたコンジュゲート 100x 濃縮液を溶解します。泡立ちを最小限に抑制するよう、そっとかき混ぜ、バイアルの内容物がすべて完全に溶解したことを確認します。
 - 4a. 有効な強度のコンジュゲートは、必要な量の溶解されたコンジュゲート 100x 濃縮液をグリーン希釈剤で希釈して調製します（表 1）。
 - 4b. 有効な強度のコンジュゲートは調製から 6 時間以内に使用する必要があります。
 - 4c. 使用後すぐに、未使用のコンジュゲート 100x 濃縮液を 2°C～8°C に戻します。

表 1. コンジュゲートの調製（有効な強度）

ストリップ数	コンジュゲートの量 (100x 濃縮)	グリーン希釈剤の量
2	10 μ l	1.0 ml
3	15 μ l	1.5 ml
4	20 μ l	2.0 ml
5	25 μ l	2.5 ml
6	30 μ l	3.0 ml
7	35 μ l	3.5 ml
8	40 μ l	4.0 ml
9	45 μ l	4.5 ml
10	50 μ l	5.0 ml
11	55 μ l	5.5 ml
12	60 μ l	6.0 ml

5. 血液採取チューブから取得し、その後保管した（冷蔵または冷凍）血漿サンプルは、ELISA ウェルに添加する前に、保管したサンプルを十分に混和します。血漿サンプルは、2～8℃で最長 28 日間、遠心分離した QFT-Plus Blood Collection Tubes で保管できます。あるいは、取得した血漿サンプルは 2～8℃で最長 28 日間保管できます。また、取得した血漿サンプルは、-20℃（望ましくは-70℃未満）未満で長期間保管できます。

血漿サンプルは、遠心分離した血液採取チューブから直接ロード／使用して QFT-Plus ELISA プレートで測定できます。

重要：遠心分離した QFT-Plus Blood Collection Tubes から血漿サンプルを直接移す場合、血漿は一切混和しないようにしてください。ゲル表面の材料を乱さないように常に気を付けてください。

6. 各 ELISA プレートウェルに新しく調製された有効な強度のコンジュゲートを 50 μ l 添加します。

7. 適切なウェルに 50 μ l の検査血漿サンプルを添加します（図 2 の推奨 ELISA プレートレイアウトを参照）。

8. 最後に、標準 1 から標準 4 をそれぞれ 50 μ l ずつ適切なプレートウェルに添加します（図 2 の推奨 ELISA プレートレイアウトを参照）。標準は最低でも二重に評価する必要があります。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
C	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
G	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

図 2. 推奨 ELISA プレートレイアウト. S1 (Standard 1)、S2 (Standard 2)、S3 (Standard 3)、S4 (Standard 4)。1N (サンプル 1.Nil コントロール血漿)、1 TB1 (サンプル 1.TB1 血漿)、1 TB2 (サンプル 1.TB2 血漿)、1 M (サンプル 1.Mitogen 血漿)

9. ELISA プレートを覆い、マイクロプレートシェーカーを使用して 500~1000 rpm で 1 分間、コンジュゲートと血漿サンプル／標準を十分に混和します。こぼれないように注意してください。

10. ELISA プレートを覆い、室温 (22°C $\pm$ 5°C) で 120 $\pm$ 5 分間インキュベートします。インキュベーション中、ELISA プレートが直射日光に晒されないようにしてください。指定された温度範囲から逸脱すると、誤った結果が出る可能性があります。

11. ELISA プレートのインキュベーション中、有効な強度の洗浄バッファーを調製します。洗浄バッファー20x 濃縮液 1 に対して、脱イオン水または蒸留水 19 で希釈し、十分に混和します。2 L の有効な強度の洗浄バッファーの調製に十分な洗浄バッファー20x 濃縮液が提供されています。

12. ELISA プレートのインキュベーションが完了したら、400 μ l の有効な強度の洗浄バッファーで ELISA プレートウェルを洗浄します。洗浄ステップを 6 回以上実行します。血漿サンプルを扱う際には、安全上の理由から、自動プレートワッシャーを推奨します。
- アッセイの性能を確実にするためには、十分な洗浄が非常に重要です。洗浄サイクルごとに、各ウェルの上部まで洗浄バッファーが充填されていることを確認します。各サイクルの間に 5 秒間の浸漬時間を設けることを推奨します。
- 標準的なラボ消毒剤を排水リザーバに添加し、感染の恐れがある材料を除染する手順を確立してください。
13. 吸収性の（糸くずの少ない）タオルに下向きに ELISA プレートを置いて軽くたたき、残りの洗浄バッファーを取り除きます。各プレートウェルに 100 μ l の酵素基質溶液を添加し、プレートを覆い、マイクロプレートシェーカーを使用して 1 分間 500～1000 rpm で十分に混和します。
14. ELISA プレートを覆い、室温（22°C $\pm$ 5°C）で 30 分間インキュベートします。インキュベーション中、ELISA プレートが直射日光に晒されないようにしてください。
15. 30 分のインキュベーションの後、基材の添加と同じ順序で各プレートウェルに 50 μ l の酵素反応停止液を添加し、マイクロプレートシェーカーを使用して 500～1000 rpm で十分に混和します。
16. 450 nm フィルターと 620 nm～650 nm 参照フィルターが取り付けられたマイクロプレートリーダーを使用して、反応が停止してから 5 分以内に ELISA プレートウェルの光学濃度（Optical Density、OD）を測定します。OD 値を使用して結果を計算します。

結果（計算）

QFT-Plus Analysis Software を使用して生データを解析し、結果を計算できます。ソフトウェアは、www.qiagen.com から入手できます。必ず最新版の QFT-Plus Analysis Software を使用するようにしてください。

「結果の解釈」（30 ページ）の説明のように、ソフトウェアは、各被験者に対してアッセイの品質管理評価を実行し、標準曲線を生成し、検査結果を提供します。ソフトウェアは、10 IU/ml を上回る濃度はすべて「>10」と報告します。このような値は、ELISA の有効な線形範囲外になるからです。

QFT-Plus Analysis Software 使用の代替手段として、以下の方法に従って結果を決定することもできます。

標準曲線およびサンプル値の生成

QFT-Plus Analysis Software を使用しない場合

QFT-Plus Analysis Software を使用しない場合、標準曲線とサンプル IU/ml 値を決定するには、Microsoft® Excel® などのスプレッドシートプログラムが必要になります。

スプレッドシートプログラムの使用

1. 各プレートでキット標準レプリケートの平均 OD 値を決定します。
2. IU/ml の標準の IFN- γ 濃度の $\log_{(e)}$ (X 軸) に対して平均 OD の $\log_{(e)}$ (Y 軸) をプロットすることにより、これらの計算からゼロ標準を除外し、 $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ 標準曲線を構築します。回帰分析により標準曲線のベストフィット線を計算します。

3. 各サンプルの OD 値を使用して、標準曲線でそれぞれの検査血漿サンプルの IFN- γ 濃度 (IU/ml) を決定します。
4. これらの計算は、マイクロプレートリーダー対応のソフトウェアパッケージ、標準的なスプレッドシート、または統計ソフトウェア (Microsoft Excel など) を使用して実行できます。回帰分析、標準の変動係数 (%CV)、標準曲線の相関係数 (r) を計算するには、このようなパッケージを使用することを推奨します。

サンプルの計算

標準に対して以下の OD 読み取り値が取得された場合、 $-\log(e)$ を使用した計算は表 2 のとおりとなります。

表 2. 標準曲線

標準	IU/ml	OD 値 a および b	平均 OD	%CV	$\log_{10}$ IU/ml	$\log_{10}$ 平均 (OD)
Standard 1	4	1.089, 1.136	1.113	3.0	1.386	0.107
Standard 2	1	0.357, 0.395	0.376	7.1	0.000	-0.978
Standard 3	0.25	0.114, 0.136	0.125	NA	-1.386	-2.079
Standard 4	0	0.034, 0.037	0.036	NA	NA	NA

曲線の式は、 $y = 0.7885(X) - 0.9837$ 。ここで「 m 」= 0.7885、「 c 」= -0.9837。 $X = (Y - c)/m$ の式でこれらの値を使用して X を求めます。標準曲線に基づき、計算された相関係数 (r) = 1.000 となります。NA：該当なし。

「検査の品質管理」(28 ページ) に明記されている基準を使用して、アッセイの有効性を決定します。

標準曲線 (表 2) を使用して、抗原 OD 応答を国際単位 (IU/ml) に変換します。

表 3. サンプルの計算

抗原	OD 値	Log ₁₀ OD 値	X	e ^x (IU/ml)	抗原 -Nil (IU/ml)
Nil	0.037	-3.297	-2.934	0.05	—
TB1	1.161	0.149	1.437	4.21	4.16
TB2	1.356	0.305	1.634	5.12	5.07
Mitogen	1.783	0.578	1.981	7.25	7.20

TB1、TB2、Mitogen の IFN- γ 値 (IU/ml) は、それぞれの Nil コントロールに対して取得された IU/ml 値を差し引いて、バックグラウンドに対して修正されています。これらの修正済みの値を使用して、検査結果を解釈します。

検査の品質管理

検査結果の精度は、正確な標準曲線の生成に依存します。従って、検査サンプルの結果を解釈する前に、標準から得た結果を調査する必要があります。

ELISA を有効とするための基準：

- 標準 1 の平均 OD 値は 0.600 以上。
- 標準 1 と標準 2 のレプリケート値の%CV は 15%以下。
- 標準 3 と標準 4 のレプリケート OD 値は平均から 0.040 光学濃度単位以内。
- 標準の平均吸光度から計算した相関係数 (r) は 0.98 以上。
- 上記の基準が満たされない場合、ランは無効となり、繰り返す必要がある。
- ゼロ標準（グリーン希釈剤）の平均 OD 値は 0.150 以下。平均 OD 値が 0.150 を上回る場合、プレート洗浄手順を調べる必要がある。

QFT-Plus Analysis Software は、これらの品質管理パラメーターを計算し、レポートします。

地域、州、連邦、またはその他の該当の認定機関に従い、それぞれの実験室で、適切なタイプのコントロール物質と検査頻度を決定する必要があります。また、外部の品質評価や、代替の検証手順を検討します。

注釈：組換え IFN- γ でスパイクした血漿は、2～8°C または-20°C で保管すると、濃度が最大 50%低下することが示されています。コントロール標準の確立には、組換え IFN- γ は推奨されません。

結果の解釈

QFT-Plus 結果は以下の基準を使用して解釈します（表 4）。

重要：結核の診断または除外、LTBI の可能性の評価には、QFT-Plus の結果を解釈する際に検討すべき、免疫学的、病歴、医学的、診断上の所見を組み合わせる必要があります。結核および LTBI の診断と治療に関する一般的なガイダンスを参照してください

(<https://www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/default.htm>) 。

表 4. QFT-Plus 検査結果の解釈

Nil (IU/ml)	TB1 から Nil を減算した値 (IU/ml)	TB2 から Nil を減算した値 (IU/ml)	Mitogen から Nil を減算した値 (IU/ml) *	QFT-Plus 結果	レポート／解釈
≤8.0	≥0.35 および Nil の ≥25%	任意の値	任意の値	陽性 [†]	<i>M. tuberculosis</i> 感染の可能性が高い
	任意の値	≥0.35 および Nil の ≥25%			
	<0.35、または ≥0.35 で Nil の<25%	<0.35、または ≥0.35 で Nil の<25%	≥0.50	陰性	<i>M. tuberculosis</i> 感染の可能性は低い
	<0.35、または ≥0.35 で Nil の<25%	<0.35、または ≥0.35 で Nil の<25%	<0.50	不確定 [‡]	<i>M. tuberculosis</i> 感染の可能性は判断できない
>8.0 [§]	任意の値				

* Mitogen 陽性コントロール（ときに結核抗原）に対する応答がマイクロプレートリーダーの範囲外になることがあります。これは検査結果に影響しません。10 IU/ml を上回る値は、QFT-Plus ソフトウェアにより >10 IU/ml と報告されます。

[†] *M. tuberculosis* 感染が疑われない場合、最初の陽性の結果は QFT-Plus ELISA で元の血漿サンプルを二重に再検査することで確定できます。1 つまたは両方のレプリケートの再検査が陽性である場合、検査結果は陽性であるとみなされます。

[‡] 考えられる原因については、「トラブルシューティングガイド」（66 ページ）を参照してください。

[§] 臨床試験では、被験者の 0.25%未満で、Nil 値に対して 8.0 IU/ml を上回るレベルの IFN-γ が見られました。

測定された IFN- γ レベルの大きさは、感染の段階や程度、免疫応答のレベル、活動性疾患への進行の可能性に関連付けられません。Mitogen に陰性の人における陽性の結核反応は稀ですが、結核患者では確認されています。これは、結核抗原に対する IFN- γ 応答が、Mitogen に対する応答より大きいことを示しており、Mitogen のレベルがリンパ球による IFN- γ の生成を最大限に刺激していないものである可能性があります。

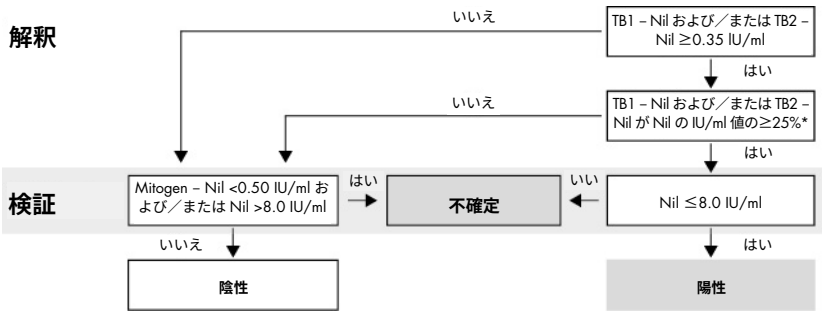


図 3. QFT-Plus 検査の解釈 *TB1 から Nil を減算した値または TB2 から Nil を減算した値を有効とするには、Nil IU/ml 値の $\geq 25\%$ が、最初の ≥ 0.35 IU/ml の結果と同じチューブからのものである必要があります。

制限事項

QFT-Plus 検査の結果は、各個人の疫学的履歴、現在の医学的状态、その他の診断評価と併せて使用する必要があります。

Nil 値が 8 IU/ml を上回る個人の場合、結核抗原に対する 25%高い応答がアッセイの測定範囲外になる可能性があるため、「不確定」と分類されます。

- *M. tuberculosis* 感染の診断における陽性の QFT-Plus 結果の予測値は感染の可能性に依存し、これは病歴、疫学的、診断、その他の所見によって評価されます。
- LTBI の診断には、適応があれば疾患に対する現在の医療および診断テストによる評価など、医学的評価によって結核が除外されていることが必要です。
- 特に免疫機能に障害がある人など、陰性結果は、*M. tuberculosis* 感染の可能性と結核へと進行する潜在リスクに関連して、個人の医学的および病歴のデータと共に検討する必要があります。

信頼性の低い、または不確定の結果の原因は以下のようなものである可能性があります。

- 使用説明書に記載の手順からの逸脱
- 血液検体の不正な輸送／取り扱い
- 高レベルの循環 IFN- γ またはヘテロフィル抗体の存在
- 血液検体採取からインキュベーションまでの有効な血液時間の超過。

QFT-Blood Collection Tubes 使用説明書 (1123668) を参照

性能特性

臨床試験

LTBI を確定したり診断を除外したりできる決定的な標準検査はないため、実質的には QFT-Plus の推定感度と特異性は評価できません。QFT-Plus の特異性は、結核感染のリスクが低い（既知のリスク要因がない）人の偽陽性率を評価して概算されています。感度は、培養陽性となった活動性結核の被験者グループを評価して概算されています。さらに、アッセイ性能は、結核感染のリスク因子が確認された健康な被験者群（様々なリスクの被験者群）の陽性率と陰性率で評価しました。

特異性

M. tuberculosis 感染のリスクが低い、または感染への曝露や疾患のリスク因子がないとみなされた 733 人の被験者に対し、QFT-Plus の臨床的特異性を評価する多施設試験を実施しました。結核曝露に関する人口統計学的情報およびリスク因子は、検査の時点で標準化された調査を使用して決定しました。この研究は、米国 1 か所、日本 2 か所、オーストラリア 1 か所の、4 か所の独立した施設で実施し、QFT-Plus 検査と QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT) 検査を比較しました。調査施設と地域により層別化した臨床的特異性の性能データの概要を表 5 に示します。性能の結果は、有効な検査の合計数に基づいています。不確定の結果はありませんでした。

表 5. 低リスク群の QFT-Plus 特異性

施設	N	陽性		陰性		不確定		特異性 (95% CI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
米国									
(#1) USA-4	212	2	4	210	208	0	0	99.06% (210/212) (96.63-99.74)	98.11% (208/212) (95.25-99.26)
日本									
(#2) JPN-3	106	1	2	105	104	0	0	99.06% (105/106) (94.85-99.83)	98.11% (104/106) (93.38-99.48)
(#3) JPN-1	216	3	5	213	211	0	0	98.61% (213/216) (96.00-99.53)	97.69% (211/216) (94.70-99.01)
日本の合計	322	4	7	318	315	0	0	98.76% (318/322) (96.85-99.52)	97.83% (315/322) (95.6-98.9)
オーストラ リア									
(#4) AU-3	199	8	9	191	190	0	0	95.98% (191/199) (92.27-97.95)	95.48% (190/199) (91.63-97.60)

QFT-Plus の特異性は米国では 98.11%、日本では 97.83%、オーストラリアでは 95.48%でした。QFT-Plus の総合的な特異性は 97.27% (713/733) でした。QFT の特異性は米国で 99.06%、日本で 98.76%、オーストラリアで 95.98%でした。QFT の総合的な特異性は 98.09% (719/733) でした。

低リスク群での予測結果の例として、TB 抗原チューブのタイプごと、およびそれらの組み合わせによる結果の内訳を示します（表 6）。

表 6. TB 抗原チューブごとの QFT-Plus 特異性調査の結果

結核抗原-Nil (IU/ml) に基づく		QFT-Plus (TB1 およ び／または TB2 によ り陽性) *		
解釈	TB1	TB2	一致した陽性 TB1 および TB2 (代替分析) †	
陽性	10	18	20	8
陰性	723	715	713	725
不確定	0	0	0	0
特異性 (95% CI)	–	–	97.3% (713/733) (95.8–98.2)	–
陰性率 (95% CI)	98.6% (723/733) (97.5–99.3)	97.5% (715/733) (96.2–98.4)	–	98.9% (725/733) (97.9–99.5)

* QFT-Plus (TB1 または TB2) で陽性と判定される解釈基準に合わせた、両方 (TB1 および TB2) 、またはいずれかの TB チューブでの結核抗原 – Nil 値 (≥0.35 IU/ml) に基づく解釈。

† 代替分析は、情報提供のみを目的としています。

結核感染のリスクが低い被験者においては、733 人中合計で 20 人の被験者で陽性結果が出ました。そのうち、TB1 および TB2 チューブの両方で 0.35 IU/ml を上回る値を返したのは、8 人の被験者だけでした。低リスクの研究コホートで QFT と QFT-Plus アッセイの比較を行い、97.5% (715/733) の全体的な一致率と、98.3% (707/719) の陰性一致率が示されました。

感度

LTBI の確定的な標準検査はないものの、結核感染が疾患に必要な前兆であるため、*M. tuberculosis* の微生物培養が適切な代替手段となります。

培養および／またはPCRで活動性 *M. tuberculosis* 疾患が確認され、その兆候や症状を示し、かつ血液採取の前に結核の治療を受けていない、または治療日数が 14 日以下の 434 人の被験者に対し、QFT-Plus の臨床的感度を評価する多施設試験を実施しました。この研究は、米国 3 か所、日本 3 か所、オーストラリア 1 か所の、7 か所の独立した施設で実施し、QFT-Plus 検査と QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT) 検査を比較しました。調査施設と国により層別化した臨床的感度の性能データの概要を表 7 に示します。性能の結果は、有効な検査の合計数に基づいています。QFT および QFT-Plus の不確定結果の頻度は、それぞれ 2.3% (10/434) と 2.5% (11/434) でした。

表 7. 施設、国、および全体で層別化した、臨床的感度調査の性能概要

		陽性		陰性		不確定		感度 (95% CI)	
施設	N	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
米国									
(#1) USA-5	15	13	13	2	2	0	0	86.67% (13/15) (62.12-96.26)	86.67% (13/15) (62.12-96.26)
(#2) USA-1	33	29	29	4	4	0	0	87.88% (29/33) (72.67-95.18)	87.88% (29/33) (72.67-95.18)
(#3) USA-4	5	5	5	0	0	0	0	100.0% (5/5) (56.55-100.0)	100.0% (5/5) (56.55-100.0)
米国の合計	53	47	47	6	6	0	0	88.7% (47/53) (77.4-94.7)	88.7% (47/53) (77.4-94.7)
日本									
(#4) JPN-2	76	72	67	1	3	3	6	98.63% (72/73) (92.64-99.76)	95.71% (67/70) (88.14-98.53)
(#5) JPN-3	99	97	98	2	1	0	0	97.98% (97/99) (92.93-99.44)	98.99% (98/99) (94.50-99.82)

次のページへ続く

前のページからの続き

表 7.施設、国、および全体で層別化した、臨床的感度調査の性能概要（続き）

施設	N	陽性		陰性		不確定		感度（95% CI）	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(#6) JPN-1	177	159	157	12	15	6	5	92.98% (159/171) (88.14-95.94)	91.28% (157/172) (86.11-94.64)
日本の合計	352	328	322	15	19	9	11	95.63% (328/343) (92.91-97.33)	94.43% (322/341) (91.5-96.4)
オーストラリア									
(#7) AU-2	29	27	29	1	0	1	0	96.43% (27/28) (82.29-99.37)	100.0% (29/29) (88.30-100.0)

上の表の分析には、不確定結果は含まれていません。

QFT-Plus の感度は米国では 88.7%、日本では 94.43%、オーストラリアでは 100.0%でした。QFT-Plus の総合的な感度は 94.09% (398/423) でした。QFT の感度は米国で 88.7%、日本で 95.63%、オーストラリアで 96.43%でした。QFT の総合的な感度は 94.81% (402/424) でした。

結核感染が確認された被験者群での予測結果の例として、TB 抗原チューブのタイプごと、およびそれらの組み合わせによる結果の内訳を示します（表 8）。

表 8. TB 抗原チューブごとの QFT-Plus 感度の調査結果

結核抗原-Nil (IU/ml) に基づく解釈	TB1	TB2	QFT-Plus (TB1 および/ または TB2 により陽性)
陽性	388	397	398
陰性	32	26	25
不確定	14	11	11
感度* (95% CI)	-	-	94% (398/423) (91.4-96.0)
陽性率* (95% CI)	92.4% (388/420) (89.4-94.6)	93.9% (397/423) (91.1-95.8)	-

* 不確定値は除外。

QFT と QFT-Plus アッセイの比較は、培養陽性となった活動性結核コホート（感度調査コホート）で評価し、全体一致率 95.9%、陽性一致率 97.3%（391/402）を示しました。

表 9. QFT-Plus 尤度比

施設*	感度	特異性	LR+	LR-
オーストラリア	100.00%	95.48%	22.11	0.00
日本	94.43%	97.83%	43.44	0.06
米国	88.68%	98.11%	47.00	0.12

*合計

MTB 感染のリスク因子が確認された（様々なリスクの個人）被験者での性能

結核感染の様々なリスク因子（HIV 陽性、活動性または潜在性結核の治療歴、活動性結核への曝露、医療従事者など）601 人からなるコホートに対し、QFT および QFT-Plus 検査の両方で評価を行いました。リスク因子は、標準化された調査と、採用時に活動性結核に関連した症状を示していない個人で確認しました。人口統計とリスク因子を表 10 に示します。この被験者群では、601 中 68 人（11.3%）が陽性の QFT-Plus 結果となり、陽性一致率（PPA）と陰性一致率（NPA）はそれぞれ 98.44%と 99.07%でした（表 11）。68 人の QFT-Plus 陽性の被験者からなるこのコホートで、合計 62 人が TB1 および TB2 チューブの両方で陽性となり、2 人が TB1 のみ、4 人が TB2 のみで陽性となりました。不確定結果（0/601）は確認されませんでした。

表 10. 混合コホートにおける人口統計と結核感染リスクに関連した因子

総被験者数 (601)		番号	割合 (%)
性別	男性	539	89.7%
	女性	62	10.3%
年齢 (歳)	範囲	18~70	-
	平均	46.7	-
BCG 接種	はい	15	2.5%
	いいえ	586	97.5%
HIV 陽性、または HTLV ウイルスの陽性反応	はい	12	2.0%
	いいえ	589	98%
活動性結核の診断歴	はい	11	1.8%
	いいえ	590	98.2%
ツベルクリン反応検査 (TST) / 結核のマントウー検査で陽性	はい	47	7.8%
	いいえ	554	92.2%
活動性または潜在性結核の治療歴	はい	35	5.8%
	いいえ	566	94.2%
拘置所や刑務所での滞在、就労またはボランティア経験 (1 か月超)	はい	373	62.1%
	いいえ	228	37.9%
ホームレスシェルターでの滞在、就労またはボランティア経験 (1 か月超)	はい	525	87.4%
	いいえ	76	12.6%
医療従事者	はい	8	1.3%
	いいえ	593	98.7%
活動性結核の患者、または活動性結核が疑われる人との濃厚接触	はい	9	1.5%
	いいえ	592	98.5%

表 11. 潜在性結核感染の既知のリスク因子を有する被験者における QFT-Plus と QFT の性能概要

		QFT		
		陽性 (+)	陰性 (-)	合計
QFT-Plus	陽性 (+)	63	5*	68
	陰性 (-)	1*	532	533
	合計	64	537	601

*一致しなかった 6 つのサンプルはすべて、TB 抗原チューブの IFN- γ レベルがアッセイのカットオフに近い値を示しました。

QFT と QFT-Plus の結果における陽性一致率 (Positive Percent Agreement, PPA) および陰性一致率 (Negative Percent Agreement, NPA) は、次のようになりました。

- PPA : 98.44% (63/64) 、95%CI (91.67、99.72)
- NPA : 99.07% (532/537) 、95% CI (97.84、99.60)

下の表 12 に、BCG 接種済み被験者における QFT-Plus と QFT 検査の性能比較を示します。

表 12. BCG 接種済みの被験者における QFT-Plus と QFT 検査の性能比較 (感度、特異性、LTBI 被験者からのデータを組み合わせたもの)

		QFT		
		陽性 (+)	陰性 (-)	合計
QFT-Plus	陽性 (+)	66	5	71
	陰性 (-)	3	268	271
	合計	69	273	342*

* 2 人の感度調査被験者は、不確定結果により分析から除外されています。

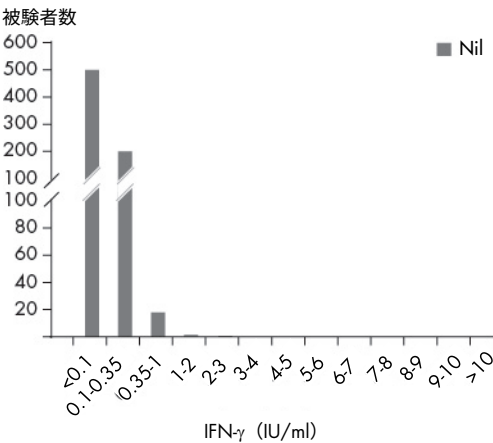
- PPA = 95.6% (66/69) 、95%CI (87.98、98.51)
- NPA = 98.2% (268/273) 、95%CI (95.79、99.22)

期待値

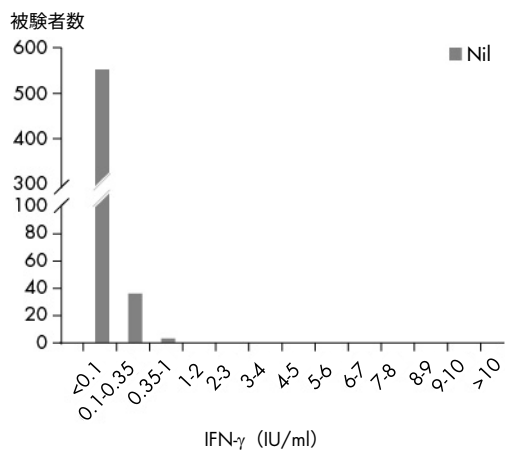
観察された応答の分布 — リスク別

臨床試験において TB1、TB2、コントロールチューブに対する IFN- γ 応答の範囲を観察し、*M. tuberculosis* 感染のリスクで層別化しました (図 4～図 7)。様々なリスクからなる群は、活動性結核の可能性が低い (すなわち、LTBI)、結核曝露のリスク因子を持つ、および持たない被験者を含む一般的な被検者を代表する人たちで構成されています。

A



B



C

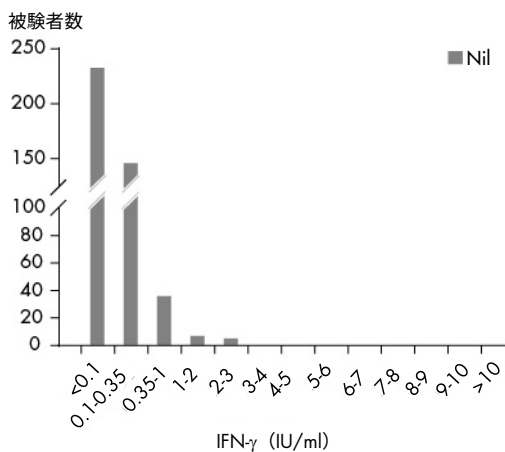
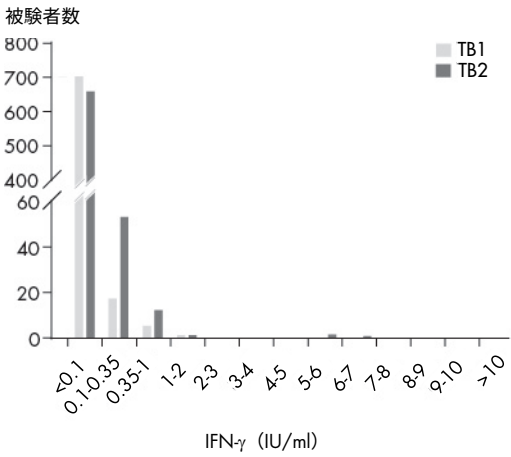
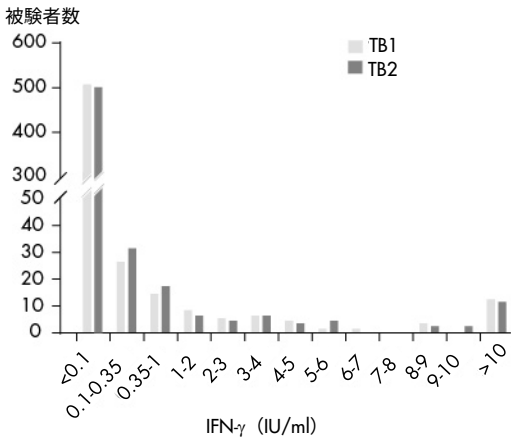


図 4. Nil の分布. A 低リスクの被験者群における Nil 値の分布 (n=744)。B 様々なリスクの被験者群における Nil 値の分布 (n=601)。C 培養陽性 *M. tuberculosis* 感染被験者群における Nil 値の分布 (n=416)。

A



B



C

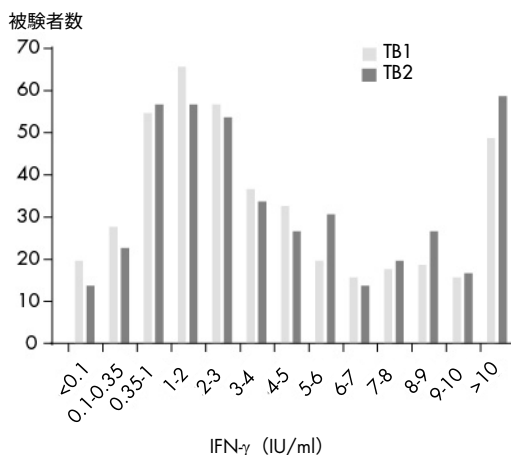
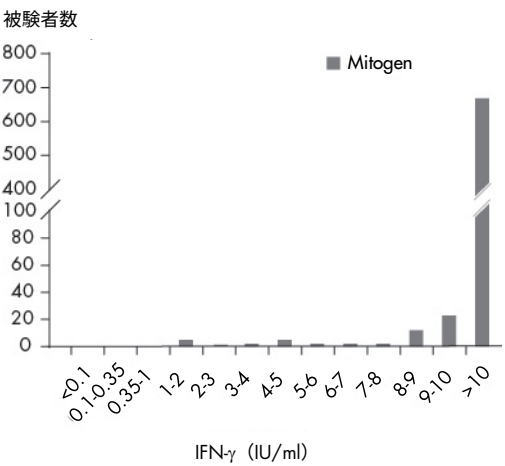
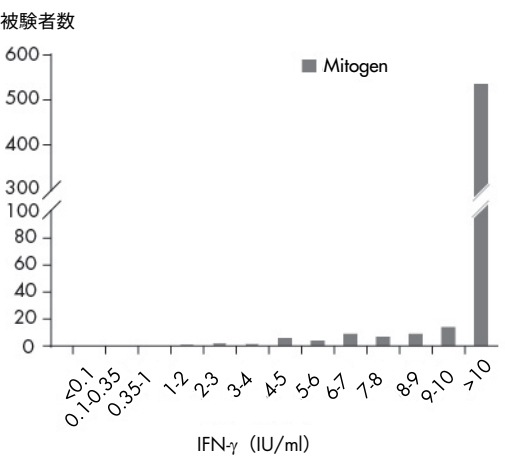


図 5. TB1 および TB2 の分布 (Nil は減算済み) . A 低リスクの被験者群における TB1 および TB2 (Nil は減算済み) の値の分布 (n=744) 。 B 様々なリスクの被験者群における TB1 および TB2 (Nil は減算済み) の値の分布 (n=601) 。 C 培養陽性 *M. tuberculosis* 感染被験者群における TB1 および TB2 (Nil は減算済み) の値の分布 (n=416) 。

A



B



C

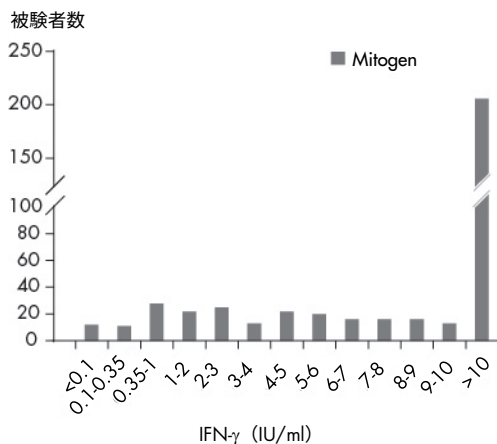


図 6. Mitogen (Nil は減算済み) の分布。 **A** 低リスクの被験者群における Mitogen (Nil は減算済み) の値の分布 (n=744)。 **B** 様々なリスクの被験者群における Mitogen (Nil は減算済み) の値の分布 (n=601)。 **C** 培養陽性 *M. tuberculosis* 感染被験者群における Mitogen (Nil は減算済み) の値の分布 (n=415)。

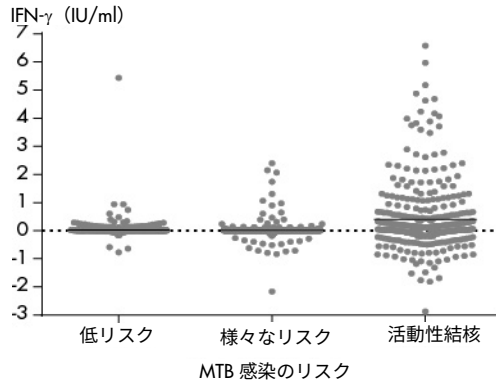


図 7. リスクで層別化した、TB1 と TB2 値 (Nil は減算済み) 間で観察された差. 低リスク、活動性リスク、様々なリスクのコホート間での違いを示すため、様々なリスクのコホート研究からのデータが含まれています。このデータ分析には、既知のリスク因子を有する様々なリスクのコホートを含めました。従って、低リスクコホートは n=733、様々なリスクのコホートは n=588、活動性結核コホートは n=357 となります。各被験者の IU/ml の定量的な差は、TB2 値から TB1 値を減算して取得しました。

安全性と性能の概要

安全性と性能の概要は、EUDAMED ウェブサイトで参照できます。

アッセイ性能特性

分析性能

アッセイのカットオフ

QFT-Plus アッセイのカットオフは、BCG 接種済みで感染していないと思われる、結核曝露のリスク因子が確認されていない被験者 216 人と、培養陽性の *M. tuberculosis* 感染被験者 118 人のデータを使用して決定しました。感度と特異性のデータを組み合わせ、受信者動作特性 (ROC) 曲線分析によって分析しました。ROC 分析による感度と特異性のデータは、最適な ELISA カットオフが 0.35 IU/ml であると示しました (図 8 を参照)。

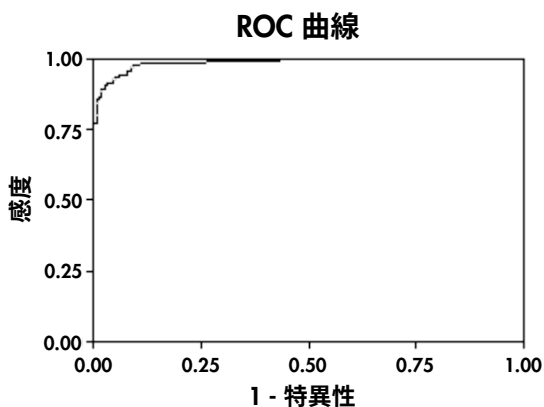


図 8. ESAT-6 および CFP-10 応答の ROC 曲線.

表 13. 様々なカットオフにおける ELISA の感度および特異性値

カットオフ IU/ml IFN- γ	感度 (%)	95% CI	特異性 (%)	95% CI	感度 + 特異性
0.20	91.53	84.97%~ 95.86%	96.31	92.87%~ 98.40%	187.84
0.23	91.53	84.97%~ 95.86%	96.77	93.47%~ 98.69%	188.30
0.26	90.68	83.93%~ 95.25%	96.77	93.47%~ 98.69%	187.45
0.28	90.68	83.93%~ 95.25%	97.24	94.08%~ 98.98%	187.92
0.30	89.83	82.91%~ 94.63%	97.24	94.08%~ 98.98%	187.07
0.31	88.98	81.90%~ 94.00%	97.24	94.08%~ 98.98%	186.22
0.33	88.98	81.90%~ 94.00%	97.70	94.71%~ 99.25%	186.68
0.35	88.98	81.90%~ 94.00%	98.16	95.35%~ 99.50%	187.14
0.39	88.14	80.90%~ 93.36%	98.16	95.35%~ 99.50%	186.3
0.42	87.29	79.90%~ 92.71%	98.16	95.35%~ 99.50%	185.45
0.43	86.44	78.92%~ 92.05%	98.16	95.35%~ 99.50%	184.6
0.45	86.44	78.92%~ 92.05%	98.62	96.01%~ 99.71%	185.06

次のページへ続く

前のページからの続き

表 13. 様々なカットオフにおける ELISA の感度および特異性値

カットオフ IU/ml IFN- γ	感度 (%)	95% CI	特異性 (%)	95% CI	感度 + 特異性
0.47	85.59	77.94%~ 91.38%	99.08	96.71%~ 99.89%	184.67
0.48	84.75	76.97%~ 90.70%	99.08	96.71%~ 99.89%	183.83
0.50	83.90	76.00%~ 90.02%	99.08	96.71%~ 99.89%	182.98

直線性

既知の IFN- γ 濃度を持つ 11 個の血漿プールの 5 つのレプリケートを ELISA プレート上に無作為に配置することにより、QFT-Plus ELISA が直線性であることを示しました。線形回帰線には 1.002 ± 0.011 の傾きと、0.99 の相関係数があります（図 9）。

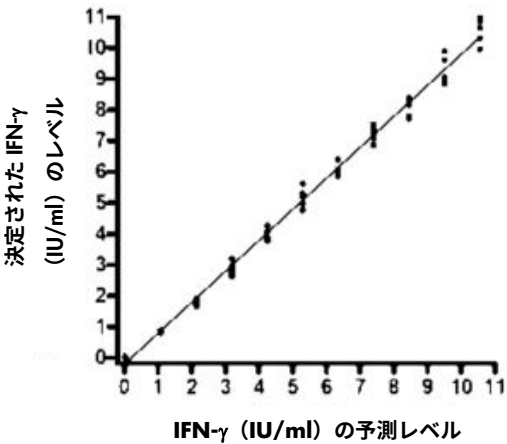


図 9. 直線性調査の回帰分析の図 – 高いプール平均 = $-0.24 + 0.9964 \times \text{予測}$ 。

再現性

複数のオペレーターによる複数試験施設での QFT-Plus の性能を評価するために、多施設試験の再現性試験を実施しました。これは前向き研究で、3 か所の外部検査施設と 1 か所の採取施設で行い、合計で 32 人の陽性被験者と 34 人の陰性（QFT 検査で判定）被験者が登録しました。被験者は米国の医療従事者で構成されていました。被験者は、職業上の理由から、または結核の比率が 50/100,000 を超える地域出身の外国生まれの医療従事者であることから、結核曝露の様々なリスクのグループを代表していました。

採取施設で各被験者から 3 本のリチウム-ヘパリン血液採取チューブを取得しました。次にリチウム-ヘパリン血液採取チューブをそれぞれ 3 か所の検査施設に送り、2 セットの QFT-Plus Blood Collection Tubes（QFT-Plus TB1、TB2、Mitogen、Nil）にアリコートしてから、QFT-Plus アッセイの手順に従って検査しました。各施設では 2 人以上のオペレーターが単独で被験者当たり 2 つの検査を実行しました。各オペレーターには、他のオペレーターが取得した結果や、被験者の QFT 検査の結果はわからないようになっています。

3 か所の検査施設全体で 66 人の被験者それぞれに 6 つの結果が生成され、合計で 396 のデータポイントが得られました。再現性の結果の概要を表 14 に示します。

表 14. 再現性調査結果の概要 – 施設内のオペレーター間の定性結果の一致率、N = 66 人の患者サンプル

施設 1 – オペレーター 2 人	施設 2 – オペレーター 2 人	施設 3 – オペレーター 3 人
64/66 = 96.97%	64/66 = 96.97%	59/66 = 89.39%
チューブセット 1 およびチューブ セット 2 の定性結果の一致率	チューブセット 1 およびチュー ブセット 2 の定性結果の一致率	チューブセット 1 およびチューブ セット 2 の定性結果の一致率

すべての試験施設における定性結果の一致率は 94.7%（375/396）です。この計算で、一致した試験結果の合計数（375）には、6 つすべての結果が一致したもの、6 つのうち 5 つの結果が一致したもの、6 つのうち 4 つの結果が一致したもの、6 つのうち 3 つの結果が一致したものがすべて含まれています。

ロット間再現性

QFT チューブと比較した場合の、QFT-Plus Blood Collection Tubes のロット間の変動を判断するための試験を実施しました。合計 30 人の被験者（QFT 検査で 15 人が結核陽性、15 人が結核陰性であることを確認）を検査しました。この調査では、QFT-Plus TB1、TB2、QFT TB Blood Collection Tubes のそれぞれに 3 つの別々のロットを使用しました。1 本の血液採取チューブ、1 人の被験者あたり 3 つのレプリケートを検査しました。また、1 つのレプリケートごとに、Nil と Mitogen チューブを検査しました。

各被験者の血液をリチウムヘパリン血液採取チューブに採取してから、血液 1 ml を QFT-Plus と QFT Blood Collection Tubes に移し、アッセイの手順に従って検査しました。それぞれの陽性および陰性サンプルグループに対し、QFT-Plus チューブの結果の全分散は、QFT チューブの結果の全分散よりも有意に高くなっていない必要があります。これは、ルビーンの等分散性（HOV）検定によって得られる p 値で決定されます。p 値が有意水準を上回り ($p>0.05$)、かつ／または QFT-Plus TB Tube の偏差が QFT TB チューブの偏差よりも小さい場合、QFT-Plus チューブと QFT TB チューブとの間に分散があったことになります。

表 15. ルビーンの HOV 検定による QFT-Plus および QFT TB Blood Collection Tubes 間の分散の比較

サンプルのタイプ	差異	効果	従属	P 値	有意
陽性	TB2 vs QFT	Sub_Type	残留	0.0378	はい
陽性	TB2 vs QFT	Sub_Type	残留	0.0540	いいえ
陰性	TB2 vs QFT	Sub_Type	残留	0.1025	いいえ
陰性	TB2 vs QFT	Sub_Type	残留	0.6344	いいえ

陽性の被験者で検査した場合、QFT-Plus TB2 チューブを除き、QFT-Plus と QFT TB Blood Collection Tubes 間に大きな偏差はありませんでした。標準偏差の推定値を分析すると、表 16 に示されているように、QFT-Plus TB2 チューブで見られた偏差 (0.06089) は QFT TB チューブでの偏差 (0.07641) よりも小さくなりました。従って、QFT-Plus TB1 と TB2 Blood Collection Tubes の分散は、QFT TB Blood Collection チューブ以下でした。

表 16. 陽性被験者の残差および 95%信頼区間の標準偏差

サンプルのタイプ	サブタイプ	標準偏差推定値	95%下側信頼限界	95%上側信頼限界
陽性	QFT	0.07641	0.06826	0.08680
陽性	TB1	0.06275	0.05605	0.07127
陽性	TB2	0.06089	0.05439	0.06917

ロット内再現性

血液の QFT-Plus TB Blood Collection Tubes のレプリケートからの IFN- γ 濃度を比較して、QFT-Plus Blood Collection Tubes のロット内再現性を評価するための試験を実施しました。

結核感染が確認された同じ被験者からの 1 つの血液サンプル由来の 6 つのアリコートを、両方の QFT-Plus チューブ（TB1 および TB2）の各ロットからの 6 本の反復血液採取チューブで試験しました。試験は 13 人の被験者で実施しました。各ドナーと、すべてのドナーで%CV を計算し、表 17 に示す平均%CV を生成しました。

表 17. 結核陽性被験者における各 QFT-Plus TB Blood Collection Tube の平均、標準偏差、最小値、中央値、最大値の%CV

QFT-Plus Tube	サンプル数	平均 (%CV)	標準偏差	最小値	中央値	最大値
TB1	13	13.31	6.88	4.17	12.87	29.56
TB2	13	13.04	7.48	4.86	10.75	29.44

結果は、TB1 および TB2 の平均%CV が約 13%で、 $\leq 30\%$ の許容基準を満たしており、ロット間の再現性が示されました。

ブランク限界 (Limit of Blank、LoB)

QFT-Plus アッセイのブランク限界 (Limit of Blank、LoB) を評価しました。各 ELISA キットロットからの合計 84 のレプリケートに対し、14 人の正常なヒト血漿サンプルそれぞれに 2 つのレプリケート (ブランクとして) を、QFT-Plus ELISA の 2 つのロットで、3 人のオペレーターによって、または 3 試験日で 1 試験日あたり 1 人のオペレーターで検査しました。

2 つの ELISA キットロットの LoB 値 (IU/ml) は、表 18 に示されているように、別々に計算しています。

表 18. 2 つの QFT-Plus ELISA Kit ロットの LoB 値 (IU/ml)

QFT-Plus ELISA Kit	推定 LoB 値 (IU/ml)
Kit 1	0.030
Kit 2	0.040

両方の QFT-Plus ELISA kit ロットで大きい方の LoB 値、0.040 IU/ml が最終 LoB 値として報告されました。

検出限界 (Limit of Detection、LoD)

QFT-Plus アッセイの検出限界 (Limit of Detection、LoD) を評価しました。14 人の血漿サンプルを統合して、結核陰性のヒト血漿プールを生成しました。3 人のオペレーターそれぞれが、バッファーで 1.0 IU/ml に希釈した IFN- γ 参照標準ストックを調製しました。8 つの濃度の連続希釈を作成しました。3 日間にわたり、3 人のオペレーターが交代で、2 つの QFT-Plus ELISA kit ロットを使用して試験を実施しました。各試験日には、各 QFT-Plus ELISA kit ロットの IFN- γ 濃度の各希釈液のレプリケート合計 45 個に対し、連続希釈の各セット内の各濃度の 5 つのレプリケートを検査しました。

検査したそれぞれの QFT-Plus ELISA kit ロットの LoD 値は、表 19 に示しているように、別々に計算しています。

表 19. 2 つの QFT-Plus ELISA Kit ロットの推定 LoD 値 (IU/ml)

QFT-Plus ELISA Kit	確率	濃度推定値 (IU/ml)	推定値の下側 95% 信頼限界	推定値の上側 95% 信頼限界
Kit 1	0.95	0.063	0.060	0.067
Kit 2	0.95	0.065	0.060	0.073

両方の QFT-Plus ELISA kit ロットで計算した大きい方の LoD 値は 0.065 IU/ml で、これが最終 LoD 値として報告されました。

妨害物質

IFN- γ を検出する QFT-Plus ELISA の性能に対する潜在的妨害物質の効果を判断する試験を実施しました。この試験では、トリグリセリド（合計）、ヘモグロビン、タンパク質（全血清）、ビリルビン（抱合型）、ビリルビン（非抱合型）、アバカビル硫酸塩、シクロスポリン、プレドニゾンなどの妨害物質を使用しました。複数の妨害物質濃度を使用して、既知の濃度の IFN- γ を持つ 5 つの血漿プールを調製しました。ベースプールの IFN- γ レベルは、事前定義された量の存在する IFN- γ （約 0.21、0.45、1.4 IU/ml）によって以前に調整されています。次に、このプールを使用して妨害物質プールを調製しました。検査した妨害物質の濃度は、0 mg/dL、5 mg/dL、10 mg/dL、15 mg/dL、20 mg/dL でした。ターゲット妨害物質の濃度は、基準間隔、病理学的値、治療範囲、毒性範囲に基づくか、または、ベンダーもしくはは一般的な臨床的レベルによる推奨に従いました。それぞれの妨害物質サンプルの濃度レベルに対し、6 つのレプリケートを検査しました。

それぞれのサンプル濃度に対し、2 つのサンプルの t 検定を実施し、表 20 と表 21 に示すように、コントロール（妨害物質を含まないレベル）と比較した場合尾の主要妨害物質レベルの平均 log₁₀ (IU/ml) の差を比較しました。対応する両側 95%信頼限界および p 値とともに、応答平均の推定差が報告されました。

表 20. Log10 IU/ml：各妨害物質と IFN- γ 濃度レベルに対するコントロールおよび主要妨害物質レベル間での平均値の差に関する t 検定の概要表

妨害物質	妨害物質 レベル	サンプル濃度 (IU/ml)	分散	平均差	下側 95%CI	上側 95%CI	P 値	合格
トリグリセリド	高	1.4	同等	0.019	-0.040	0.077	0.491	はい
		0.45	同等	0.004	-0.022	0.030	0.732	はい
		0.21	同等	0.006	-0.035	0.047	0.759	はい
ヘモグロビン	高	1.4	同等	-0.005	-0.42	0.032	0.784	はい
		0.45	同等	-0.000	-0.023	0.023	0.981	はい
		0.21	同等	0.000	-0.034	0.035	0.980	はい
タンパク質	高	1.4	同等	0.004	-0.034	0.042	0.836	はい
		0.45	同等	0.001	-0.38	0.040	0.962	はい
		0.21	同等	-0.008	-0.076	0.060	0.809	はい
ビリルビン 抱合型	高	1.4	同等	-0.011	-0.057	0.034	0.589	はい
		0.45	同等	-0.002	-0.058	0.053	0.923	はい
		0.21	同等	-0.014	0.074	0.046	0.625	はい
ビリルビン 非抱合型	高	1.4	同等	-0.008	-0.041	0.026	0.614	はい
		0.45	同等	-0.000	-0.042	0.041	0.982	はい
		0.21	同等	-0.000	-0.048	0.048	0.989	はい
アバカビル	高	1.4	同等	0.008	-0.025	0.041	0.601	はい
		0.45	同等	0.012	-0.019	0.044	0.412	はい
		0.21	同等	-0.006	-0.052	0.040	0.770	はい

次のページへ続く

前のページからの続き

表 20. Log10 IU/ml：各妨害物質と IFN- γ 濃度レベルに対するコントロールおよび主要妨害物質レベル間の平均値の差に関する t 検定の概要表

妨害物質	妨害物質 レベル	サンプル濃度 (IU/ml)	分散	平均差	下側 95%CI	上側 95%CI	P 値	合格
シクロスポリン	高	1.4	同等	0.014	-0.020	0.047	0.383	はい
		0.45	同等	0.005	-0.035	0.045	0.773	はい
		0.21	同等	0.024	-0.008	0.056	0.131	はい
プレドニゾロン	高	1.4	同等	0.017	-0.017	0.050	0.293	はい
		0.45	同等	0.000	-0.036	0.036	0.979	はい
		0.21	同等	0.015	-0.035	0.065	0.524	はい

表 21. Log10 IU/ml：各妨害物質と IFN- γ 濃度レベルに対するコントロールおよび高妨害物質レベル間の平均値の差に関する t 検定の概要表

妨害物質	妨害物質 レベル	サンプル濃度 (IU/ml)	分散	平均差	下側 95%CI	上側 95%CI	P 値	合格
トリグリセリ ド	高	1.4	同等	0.053	-0.004	0.110	0.063	はい
		0.45	同等	0.039	-0.021	0.058	<.001	はい
		0.21	同等	0.034	-0.002	0.071	0.061	はい
ヘモグロビン	高	1.4	同等	-0.001	-0.042	0.040	0.967	はい
		0.45	同等	0.016	-0.007	0.040	0.152	はい
		0.21	同等	0.014	-0.030	0.059	0.489	はい
タンパク質	高	1.4	同等	-0.030	-0.071	0.011	0.136	はい
		0.45	同等	0.000	-0.046	0.046	0.992	はい
		0.21	同等	-0.045	-0.103	0.012	0.109	はい
ビリルビン 抱合型	高	1.4	同等	0.001	-0.046	0.048	0.961	はい
		0.45	同等	0.012	-0.043	0.067	0.639	はい
		0.21	同等	0.015	-0.044	0.074	0.586	はい
ビリルビン 非抱合型	高	1.4	同等	0.015	-0.011	0.042	0.231	はい
		0.45	同等	0.015	-0.023	0.052	0.411	はい
		0.21	同等	0.012	-0.033	0.057	0.566	はい
アバカビル	高	1.4	同等	0.013	-0.015	0.040	0.322	はい
		0.45	同等	0.015	-0.014	0.044	0.283	はい
		0.21	同等	0.008	-0.034	0.050	0.677	はい

次のページへ続く

前のページからの続き

表 21. Log10 IU/ml：各妨害物質と IFN- γ 濃度レベルに対するコントロールおよび高妨害物質レベル間の平均値の差に関する t 検定の概要表

妨害物質	妨害物質レベル	サンプル濃度 (IU/ml)	分散	平均差	下側 95%CI	上側 95%CI	P 値	合格
シクロスポリン	高	1.4	同等	0.002	-0.019	0.024	0.816	はい
		0.45	同等	0.007	-0.030	0.043	0.682	はい
		0.21	同等	0.015	-0.007	0.038	0.155	はい
プレドニゾロン	高	1.4	同等	0.007	-0.016	0.030	0.518	はい
		0.45	同等	-0.001	-0.034	0.033	0.964	はい
		0.21	同等	0.021	-0.025	0.068	0.334	はい

結果では、主要な妨害物質レベルとコントロール（妨害物質ゼロ）の間や、トリグリセリドの 0.45 IU/ml 濃度レベルを除く高い妨害物質レベルにおいて、有意差は示されませんでした。平均差は、標準偏差範囲の+/- 2 内であると判断されました。これは、差がアッセイの予測される偏差の範囲内であり、トリグリセリドは QFT-Plus ELISA に妨害効果をもたらさなかったことを示しています。

廃棄

関連の血液取り扱いガイドラインを遵守してください。連邦、州、地域の規制に従い、血液や血液製剤に接触したサンプルや材料は廃棄してください。

参考文献

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 645.
3. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 84.
4. Rothel, J.S., Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: Is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 3, 981.
5. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, 681.
6. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. *J. Immunol.* 166, 439.
7. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. *PLoS Pathol.* 3, 1240.
8. Barcellini, L. et al. (2016) First independent evaluation of QuantiFERON - TB Plus performance. *Eur. Respir. J.* 47, 1587.
9. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J. Immunol.* 187, 2222.

10. Rozot, V. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur. J. Immunol.* 43, 1568.
11. Nikolava, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75, 277.
12. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. *J. Infect.* 69, 533.
13. Ongaya, A. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. *Tuberculosis* 93, S60.
14. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 206.
15. Mazurek, G.H., et al.; IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection – United States, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* 59, 1.
16. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: tuberculosis preventive treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

トラブルシューティングガイド

このトラブルシューティングガイドは何らかの問題が発生した際にお役立てください。テクニカルアシスタンスおよび詳細については、www.qiagen.com/Support の弊社のテクニカルサポートをご覧ください（問い合わせ先については、www.qiagen.com をご覧ください）。

コメントと推奨事項

ELISA トラブルシューティング

非特異的な発色

- | | |
|---------------------------|---|
| a) プレートの不完全な洗浄 | 400 µl/well の洗浄バッファーで 6 回以上プレートを洗浄します。使用されているワッシャーに応じて、6 回以上の洗浄サイクルが必要になる場合があります。サイクルの間に 5 秒以上の浸漬時間を設けます。 |
| b) ELISA ウェルのクロスコンタミネーション | サンプルのピペット滴下と混和を行う際には、リスクを最小限に抑制するよう注意してください。 |
| c) キット／コンポーネントの期限が切れている | キットの有効期限が切れていないことを確認します。溶解された標準とコンジュゲート 100x 濃縮液は、溶解日から 3 か月以内に使用してください。 |
| d) 酵素基質溶液が汚染されている | 青の発色がある場合は基材を廃棄してください。清浄な試薬リザーバを使用してください。 |

コメントと推奨事項

- | | |
|--|--|
| e) 採取前に QFT- Blood Collection Tubes で血漿を混和 | 遠心分離後、回収前に上下にピペッティングしたり、血漿をかき混ぜたりしないようにします。ゲル表面の材料を乱さないように常に気を付けてください。 |
|--|--|

標準の光学濃度の読み取り値が低い

- | | |
|-------------------------|--|
| a) 標準の希釈のミス | 本使用説明書に従い、キット標準の希釈を適切に実施します。 |
| b) ピペット滴下のミス | ピペットをキャリブレーションし、製造元の指示に従って使用してください。 |
| c) インキュベーション温度が低すぎる | ELISA のインキュベーションは室温 ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) で行う必要があります。 |
| d) インキュベーション時間が短すぎる | コンジュゲート、標準、サンプルがロードされたプレートのインキュベーションは、 120 ± 5 分間にわたり実施する必要があります。酵素基質溶液は、プレート上で 30 分間インキュベートします。 |
| e) プレートリーダーフィルターの不正確な使用 | プレートは、 $620 \text{ nm} \sim 650 \text{ nm}$ の参照フィルターにより、 450 nm で読み取る必要があります。 |
| f) 試薬の温度が低すぎる | コンジュゲート 100x 濃縮液を除くすべての試薬は、アッセイ開始前に室温に戻す必要があります。これには約 1 時間かかります。 |

コメントと推奨事項

- | | |
|-------------------------|---|
| g) キット／コンポーネントの期限が切れている | 必ず有効期限が切れる前にキットを使用します。溶解された標準とコンジュゲート 100x 濃縮液は、溶解日から 3 か月以内に使用します。 |
|-------------------------|---|

高いバックグラウンド

- | | |
|-------------------------|--|
| a) プレートの不完全な洗浄 | 400 µl/well の洗浄バッファーで 6 回以上プレートを洗浄します。6 回以上の洗浄サイクルが必要である場合があります。サイクルの間に 5 秒以上の浸漬時間を設けます。 |
| b) インキュベーション温度が高すぎる | ELISA のインキュベーションは室温 (22°C ± 5°C) で行う必要があります。 |
| c) キット／コンポーネントの期限が切れている | 必ず有効期限内にキットを使用します。溶解された標準とコンジュゲート 100x 濃縮液は、溶解日から 3 か月以内に使用してください。 |
| d) 酵素基質溶液が汚染されている | 青の発色がある場合は基材を廃棄してください。清浄な試薬リザーバを使用してください。 |

非線形標準曲線と複製の変動

- | | |
|----------------|--|
| a) プレートの不完全な洗浄 | 400 µl/well の洗浄バッファーで 6 回以上プレートを洗浄します。6 回以上の洗浄サイクルが必要である場合があります。サイクルの間に 5 秒以上の浸漬時間を設けます。 |
| b) 標準希釈のミス | 本使用説明書に従い、標準の希釈を適切に実施します。 |

コメントと推奨事項

- | | |
|---------------------------------|--|
| c) 不十分な混和 | プレートに添加する前に、逆さまにしたり、ボルテックスミキサーでしずかに攪拌して試薬を十分に混和します。 |
| d) 一貫性のないピペット滴下手法、またはアッセイ設定中の中断 | サンプルや標準の添加は、切れ目なく行う必要があります。すべての試薬はアッセイを開始する前に調製してください。 |

図記号

使用説明書やパッケージ、ラベルには、次の図記号が表示されます。

図記号	図記号の定義
 <N>	<N>回の反応に必要な試薬が含まれています。
	使用者
 0197	この製品は、体外診断用医療機器に関する欧州規制 2017/746 の要件に準拠しています。
	欧州共同体／欧州連合の認定代理業者
	体外診断用医療機器
	カタログ番号
	ロット番号
	資材番号（コンポーネントのラベル）
	コンポーネント
	含有物質
	番号
	グローバルトレードアイテム番号
Rn	R は使用説明書の改訂を示し、n は改訂番号を示す。
	温度制限

図記号

図記号の定義



製造者



製品説明書を参照



遮光してください



警告／注意または注意、付属の文書を参照してください

An in vitro diagnostic test using a peptide cocktail simulating ESAT-6 and CFP-10 proteins to stimulate cells in heparinized whole blood.

ESAT-6 および CFP-10 タンパク質をシミュレートするペプチドカクテルでヘパリン処理全血の細胞を刺激する体外診断テスト



生体物質または動物由来の物質を含む



ヒト由来の生物材料を含む



固有のデバイス識別子

図記号

図記号の定義

tartrazine

タルトラジンを含む

sulfuric acid

硫酸を含む

付録 A：技術情報

不確定結果

不確定の結果は一般的でなく、検査を受けた個人の免疫状態に関連していることがあります。上記の使用説明書に従っていない場合には、多数の技術的要因（血液採取チューブの不適切な取り扱い／保管、不完全な ELISA プレート洗浄）に関連していることもあります。

試薬の保管、血液の採取、血液サンプルの取り扱いに関する技術的な問題が疑われる場合は、新しい血液検体で QFT-Plus 試験全体を繰り返してください。不適切な洗浄や、ELISA 試験の手順に関するその他の逸脱が疑われる場合は、刺激された血漿の ELISA 試験を再度実施してもかまいません。医師が試料を再度採取するか、適宜他の手順を実施する場合があります。

凝固した血漿サンプル

血漿サンプルの長期保管に伴いフィブリン塊が発生した場合は、凝血塊になるまでサンプルを遠心分離して、血漿をピペット滴下しやすくします。

高脂肪血漿サンプル

脂肪沈着物がピペットチップに詰まる可能性があるため、高脂肪サンプルをピペット滴下する際には注意が必要です。

付録 B：省略された ELISA 試験手順

1. コンジュゲート 100x 濃縮液を除き、ELISA コンポーネントは 60 分以上かけて室温に戻します。

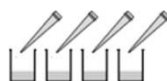


2. 蒸留水または脱イオン水でキット標準を 8.0 IU/ml に溶解します。標準の希釈液を 4 つ調製します。



3. 蒸留水または脱イオン水で冷凍乾燥させたコンジュゲート 100x 濃縮液を溶解します。

4. グリーン希釈剤で有効な強度のコンジュゲートを調製し、50 μ l をすべてのウェルに添加します。



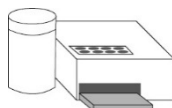
5. 該当のウェルに 50 μ l の試験血漿サンプルと 50 μ l の標準を添加します。シェーカーを使用して混和します。



6. 室温で 120 分間インキュベートします。



7. 400 μ l/well の洗浄バッファーでウェルを 6 回以上洗浄します。



8. 100 μ l の酵素基質溶液をウェルに添加します。シェーカーを使用して混和します。



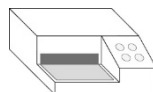
9. 室温で 30 分間インキュベートします。



10. 50 μ l の酵素反応停止液をウェルに添加します。シェーカーを使用して混和します。



11. 620～650 nm の参照フィルターを使って 450 nm での結果を読み取ります。



12. 結果の分析を行います。



注文情報

製品	内容	カタログ番号
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit	2-plate ELISA kit	622120
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	20-plate ELISA kit	622822
Related products		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 本 (Nil、TB1、TB2、Mitogen 各 50 本ずつ)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 本 (Nil、TB1、TB2、Mitogen 各 50 本ずつ)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 本 (Nil、TB1、TB2、Mitogen1 パックにつき各 1 本ずつ) 、10 パック	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 本 (Nil、TB1、TB2、Mitogen 各 25 本ずつ)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 本 (Nil、TB1、TB2、Mitogen 各 50 本ずつ)	623423
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Single Patient Pack	40 本 (Nil、TB1、TB2、Mitogen1 パックにつき各 1 本ずつ) 、10 パック	623222

ライセンスに関する最新情報や製品に固有の免責事項については、それぞれの QIAGEN キットの使用説明書をご覧ください。QIAGEN キットの使用説明書は、www.qiagen.com から入手できます。QIAGEN テクニカルサービスや最寄りの代理店でも入手可能です。

文書の改訂履歴

日付	変更
R2、2021 年 6 月	患者 1 人パックの情報を含めた 表 10 および 11 を改訂し、QFT-GIT と QFT-Plus データを区別した 「説明と原理」セクションを更新し、被検者と測定範囲に関する情報を追加した 表 9 を追加し、QFT-Plus 尤度比に関するデータを追加した
R3、2021 年 10 月	カタログ番号を元のカatalog番号に戻した キットの内容のマイクロプレートストリップについて、単回使用の説明を追加した
R4、2023 年 3 月	フォーマットの修正

このページは意図的に空白のままにしています

QuantifERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit の制限付きライセンス契約

本製品を使用することで、本製品の購入者またはユーザーは以下の条項に合意し、本契約を締結したものとみなされます。

1. 本製品は、本製品書と共に提供されるプロトコールおよび本使用説明書のみに従い、パネルに含まれるコンポーネントのみを用いて使用することができます。
QIAGEN は、本製品と共に提供されるプロトコール、本使用説明書、www.qiagen.com に掲載されている追加プロトコールに説明されているものを除き、所有する知的財産の下、このパネルに含まれるコンポーネントをこのパネルに含まれていないコンポーネントと一緒に使用または組み込むライセンスを一切許諾しません。追加プロトコールには、QIAGEN のユーザーが QIAGEN の他のユーザーに提供しているものもあります。このようなプロトコールは QIAGEN による完全なテストや最適化が施されていません。QIAGEN はこれらを保証せず、また、これらが第三者の権利を侵害しないことを保証しません。
2. 明示されたライセンスを除き、QIAGEN は本パネル、その使用、またはそれら両方が第三者の権利を侵害しないことを保証しません。
3. 本パネルとそのコンポーネントは 1 回のみの使用についてライセンスが許諾されるものであり、それらを再使用したり、再生したり、再販したりすることはありません。
4. QIAGEN は明確に表示されたものを除き、明示、黙示を問わず、他のライセンス許諾から明確に免責されます。
5. 本パネルの購入者とユーザーは、上記の禁止事項に示した行為を行わず、またかかる行為につながる、もしくは容易にする一切の手段をいずれの者にも許可しないことに同意します。QIAGEN は、本限定ライセンス契約の禁止事項の執行を法廷に対して強要することができ、本限定ライセンス契約、本パネルおよびそのコンポーネントに関する所有する知的財産権行使の一切の行為において、弁護士費用を含む調査と法的措置の経費を回収するものとします。

最新の契約条項については、www.qiagen.com を参照してください。

商標：QIAGEN®、Sample to Insight®、QuantifERON® (QIAGEN Group) Proclin®。本文書で使用している登録済みの名称、商標などは、具体的な表示がない場合でも法的保護の対象となります。

03/2023 L1123669 1123669JA © 2023 QIAGEN、無断複写・転載を禁じます。

ご注文 www.qiagen.com/shop | テクニカルサポート support.qiagen.com |
ウェブサイト www.qiagen.com