

结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒（酶联免疫法）

说明书

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒（酶联免疫法）

英文名称：QuantiFERON-TB Gold

【包装规格】

酶免试剂部分（货号：0594-0201）：56 人份/盒；

结核抗原及对照血液培养管部分（货号：0590-0301）：空白对照管 100 支/盒×1 盒，结核抗原管 100 支/盒×1 盒，丝裂原阳性对照管 100 支/盒×1 盒。

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人新鲜外周静脉抗凝血中结核分枝杆菌特异性的T细胞免疫反应。

本产品适用于临床疑似结核病的辅助诊断。此方法不受卡介苗（BCG疫苗）的影响，特异性检测结核复合群（人型、牛型、非洲型）引起的结核感染。

由于血液培养管中含有结核杆菌特异性抗原 ESAT-6, CFP 10 和 TB7.7(p4)，不需分离淋巴细胞而直接在全血中检测T细胞免疫反应，在临床中实现简便的自动化检测与结果解读。

【检验原理】

本产品使用特殊的血液培养管孵育全血，血液在血液培养管中孵育 16 至 24 小时，提取血浆，检测受结核杆菌特异性抗原刺激产生的 γ -干扰素含量。来判断其是否存在结核杆菌特异性的细胞免疫反应。

QFT 测试分二阶段进行。首先，将全血分至每个血液培养管，这些血液培养管包括空白对照（Nil）管、结核（TB）抗原管和丝裂原阳性对照（Mitogen）管。

Mitogen 管可作为本测试的阳性对照。当无法肯定受试者的免疫状况时，使用 Mitogen 管更能确定其检测结果。Mitogen 管亦可作为是否正确血液处理及孵育的控制对照。

血液培养管必须在采血后 16 小时内，尽快在 37℃ 孵育。孵育 16~24 小时后，将试管离心，取出血浆，并用 ELISA 测定 γ -干扰素(IU/mL)含量。

结核抗原管的 γ -干扰素浓度若显著高于 Nil 对照管，则检测结果视为阳性。Mitogen 刺激的血浆样本则作为每个检测样本的 γ -干扰素阳性对照。对 Mitogen 反应较低(<0.5IU/mL)且对结核抗原无反应者，其结果则视为不确定。产生这种现象的原因可能是：淋巴细胞不足；样本处理不正确导致淋巴细胞活力降低；Mitogen 血液培养管操作或混合不当；病人的淋巴细胞无法产生 γ -干扰素。Nil 管样本用于调整背景、异嗜性抗体效应和血液样本中的非特异的 γ -干扰素。因此结核抗原管及 Mitogen 对照管的 γ -干扰素含量需减去 Nil 管的 γ -干扰素含量。

【主要组成成分】

1. 酶免试剂部分：

酶标板条：包被有小鼠抗人 γ -干扰素单克隆抗体，96 孔/板 $\times$ 2 板；

标准品：包含冻干的重组人 γ -干扰素、牛酪蛋白和 0.01% w/v 硫柳汞，1 瓶；

绿色稀释液：包含牛酪蛋白、正常小鼠血清和 0.01% w/v 硫柳汞，30mL/瓶 $\times$ 1 瓶；

100X 浓缩结合物：辣根过氧化物酶标记的小鼠抗人 γ -干扰素抗体，含有 0.01% w/v 硫柳汞，1 瓶；

20X 浓缩洗涤液：pH7.2，含有 0.01% w/v 硫柳汞，100mL/瓶 $\times$ 1 瓶；

酶底物溶液：含有 H_2O_2 、3,3',5,5'-四甲基联苯胺，30mL/瓶 $\times$ 1 瓶；

终止液：含硫酸 0.5M，15mL/瓶 $\times$ 1 瓶。

2. 结核抗原及对照血液培养管部分：

空白对照管 100 支/盒 $\times$ 1 盒，结核抗原管 100 支/盒 $\times$ 1 盒，丝裂原阳性对照管 100 支/盒 $\times$ 1 盒。

试剂盒未提供的其它材料及设备：

- 37℃ 培养箱，不需 CO_2 ；
- 可调式（10-1000 μL ）移液器及一次性加样枪头；
- 多通道移液器（50 μL 、100 μL ）及一次性加样枪头；
- 酶标板振荡器；
- 2L 去离子水或蒸馏水。
- 洗板机

【储存条件及有效期】

1. 酶免试剂部分：在 2~8℃ 保存，有效期 36 个月；

结核抗原及对照血液培养管部分：在 4~25℃ 保存，有效期 15 个月。

生产日期、失效日期：见标签。

酶底物溶液须避免阳光直射。

2. 配制后但未使用的试剂：

- 复溶的标准品在 2~8℃ 最多可储存 3 个月（请注明标准品的配制日期）。
- 一旦复溶，未使用的 100 倍浓缩结合物必须再放回 2~8℃ 保存，并在 3 个月内使用完（请注明浓缩结合物的配制日期）。
- 稀释后的的结合物必须在 6 小时内使用。
- 稀释后的洗涤液于室温最多可储存 2 周。

【适用仪器】

酶标仪（带有 450nm 及 620~650nm 波长）。

【样本要求】

由于抗原经过干燥附着于血液培养管的内壁上，因此充分混合试管内含物与血液是非常重要的。血液培养管必须在采血后 16 小时内尽快移至 37℃ 培养箱中孵育。

为了得到最佳结果，应遵守下列步骤：

1. 采集测试者血液，向每支血液培养管充入 1mL 血液。

- a. 血液培养管旁的黑色标记表示 1mL 血液量。已验证血液培养管可在 0.8~1.2mL 范围间应用。
 - b. 选用单支含肝素锂抗凝剂的采血管采集血液，然后将血液分到血液培养管。只能使用肝素锂作为血液抗凝剂，其它抗凝剂会干扰检测。采集血液到单支采血管(最少 5mL)，轻轻地颠倒采血管几次进行混合，以溶解肝素锂。血液在分到血液培养管孵育前应在室温（22℃±5℃）放置，孵育必须在采血后 16 小时内开始。
2. 血液培养管充入血液后立即充分地上下振摇 10 次，确保整个试管内层都被血液覆盖，以溶解管壁上的抗原。
 - 血液采集到肝素锂抗凝管后，血液样本在分到血液培养管前必须要均匀地混合。在分配前先用滚轮摇臂或轻轻颠倒血液培养管 20 次进行混合。分配每等份 1mL 的血液（每支血液培养管一等份）到对应的 Nil、TB 抗原和 Mitogen 管。打开这三支血液培养管的盖子，每支管加入 1mL 血液（到管子标签边上的黑色标记处）。再把管盖牢固地盖上，按上述方式混合。
 3. 正确地标记血液培养管。
 4. 采血后 16 小时内，血液需尽快移至 37℃±1℃培养箱中孵育。在进行孵育前，应将血液培养管在室温（22℃±5℃）放置，切勿冷藏或冷冻血液样本。

【检验方法】

第一阶段—血液孵育及提取血浆

已提供的材料：血液培养管部分

实验必须但未提供的材料（请见【主要组成成分】）

步骤

- 1.若采血后未能立即进行孵育，则孵育前必须立即颠倒血液培养管 10 次来进行混匀。
- 2.保持血液培养管直立，在 37℃孵育 16~24 小时。培养箱不需 CO₂，也没有湿度要求。
3. 37℃孵育结束后，血液培养管在离心前可在 4~27℃放置最多 3 天。
4. 37℃孵育结束后，血液培养管以 2000~3000RCF(g)离心 15 分钟以收集血浆。分离胶将血细胞从血浆中分离出去。若未出现分离，则血液培养管须以更高转速再次离心。
 - 亦可不经离心就吸取血浆，但在吸取时必须特别注意不要扰动血细胞。
- 5.离心后在吸取血浆之前，要避免上下反复吸液和其它任何混合血浆的操作。始终注意不要触碰分离胶表面的物质。
 - 血浆样本应只用一个移液器来吸取。
 - 血浆样本可直接从离心后的血液培养管加入到 ELISA 板微孔中，包括使用自动 ELISA 工作站进行检测时。
 - 血浆样本可于 2~8℃保存最多 28 天。血浆吸出后在-20℃以下能保存更长时间。

第二阶段—人 γ-干扰素的 ELISA 测定

已提供的材料：酶免试剂部分（参见【主要组成成分】）

实验必须但未提供的材料及设备（【主要组成成分】）。

步骤

- 1.100 倍浓缩结合剂以外的其它全部血浆样本及试剂，在使用前必须在室温（22℃±5℃）平衡至少 60 分钟。
- 2.从酶标板取出此次用不到的板条，回封于铝箔袋内，送至冰箱存放。

留下的板条中，至少有一条要供标准品使用，其余的要足够本次测定的样本数量。（见表 2 建议配置图）。本次实验后，保留酶标板框和封盖供剩余板条使用。

3.依试剂盒标准品瓶签所示，在冻干人 IFN- γ 标准品小瓶内加入标示量的去离子水或蒸馏水来复溶。轻轻混合以防止形成泡沫，并确保完全溶解。复溶至标示容量的标准品溶液浓度为 8.0IU/mL。

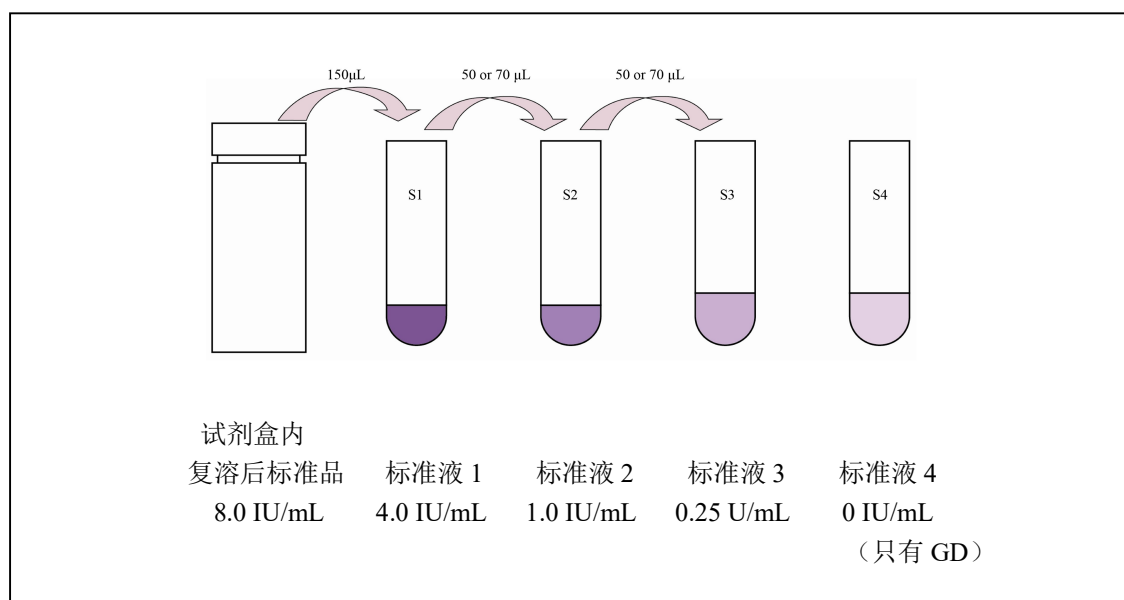
注意：不同批次的试剂盒标准品所标示的复溶体积不同。

用绿色稀释剂（GD）将复溶后的标准品稀释成 4 个浓度梯度的 γ -干扰素标准液，请参考图 1。S1（标准液 1）浓度为 4 IU/mL、S2（标准液 2）浓度为 1 IU/mL、S3（标准液 3）浓度为 0.25 IU/mL、S4（标准液 4）为 0 IU/mL（只有 GD）。这些标准液应至少做重复测定。

附：

图 1：标准液稀释示意图

标准液重复测定时建议稀释步骤	标准液 3 次测定时建议稀释步骤
a. 4 支试管分别标示为 S1、S2、S3、S4。 b. S1、S2、S3、S4 中分别加入 150μL 的 GD。 c. S1 中加入复溶后的标准品 150μL，并充分混匀。 d. 从 S1 中吸取 50μL 加入 S2，并充分混匀。 e. 从 S2 中吸取 50μL 加入 S3，并充分混匀。 f. S4 只含有 GD，作为零浓度标准品。	a. 4 支试管分别标示为 S1、S2、S3、S4。 b. S1 管加入 150μL 的 GD。 c. S2、S3、S4 管中分别加入 210μL 的 GD。 d. S1 管中加入复溶后的标准品 150μL，并充分混匀。 e. 从 S1 中吸取 70μL 加入 S2，并充分混匀。 f. 从 S2 中吸取 70μL 加入 S3，并充分混匀。 g. S4 只含有 GD，作为零浓度标准品。



•每次 ELISA 测定前，必须配制新的标准品稀释液。

4.以 0.3mL 去离子水或蒸馏水复溶冻干的 100 倍浓缩结合物。轻轻混匀以减少泡沫形成，并确保浓缩结合物完全溶解。

按照表 1 所示，视所需的测定量，用绿色稀释剂稀释复溶后的 100 倍浓缩结合物，配制成本实验所需浓度的结合物。

表 1：结合物的配制

酶标板条数	100 倍浓缩结合物	绿色稀释剂
2	10 μ L	1.0mL

3	15μL	1.5mL
4	20μL	2.0mL
5	25μL	2.5mL
6	30μL	3.0mL
7	35μL	3.5mL
8	40μL	4.0mL
9	45μL	4.5mL
10	50μL	5.0mL
11	55μL	5.5mL
12	60μL	6.0mL

•充分混匀，但要轻柔避免形成泡沫。

•配制后，立即将不再使用的 100 倍浓缩结合物再放回 2~8℃存放。

•只能使用绿色稀释剂来配制。

5.对于从血液培养管里吸出后被冷藏或在检测前存放超过 24 小时的血浆样本，在加入 ELISA 酶标板孔前要进行彻底混匀。

•如血浆样本直接从离心后的血液培养管加入，任何混匀血浆的操作都要避免。

6.用多通道微量加样器将 50μL 新配制的结合物加至 ELISA 酶标板孔中。

7.用多通道微量加样器将 50μL 血浆样本加至上述酶标板的对应微孔中（见表 2 推荐样本布局图）。最后，再加入标准液 1 至 4 各 50 μL。

表 2：3 管（Nil+TB+Mitogen）测定时推荐样本布局图（每板 28 个测试）

排	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

• S1（标准液 1）、S2（标准液 2）、S3（标准液 3）、S4（标准液 4）

• 1N（样本 1. Nil 对照血浆）；1A（样本 1. TB 抗原血浆）；1M（样本 1. Mitogen 对照血浆）

8.用酶标板振荡器将结合物与血浆样本或标准液充分混合 1 分钟。

9.以封盖覆盖酶标板，并于室温（22±5℃）孵育 120±5 分钟。

•孵育期间，酶标板不可受阳光直射。

10.在孵育期间，可进行洗涤液的配制。将 20 倍浓缩洗涤液与去离子水或蒸馏水按照 1：19 的比例稀释并充分混合。试剂盒提供足量的 20 倍浓缩洗涤液，可配制 2L 实验所需浓度的洗涤液。每个微孔用 400μL 洗涤液至少清洗 6 次。建议使用自动洗板机操作。

•彻底清洗对本测定的效果极为重要。需确保每个微孔在每次清洗时，能完全被洗涤液充满至顶。建议每次清洗间至少有 5 秒钟的浸泡期。

•添加标准的实验室消毒剂到废液贮水槽，并建立去除潜在传染物质污染的处理程序。

11.将酶标板面向下，在吸收纸巾上轻敲，以去除残余的洗涤液。然后在每个微孔内加入 100μL 酶底物溶液，并用酶标板振荡器充分混合。

- 12.以封盖覆盖酶标板，并于室温（22±5℃）孵育 30 分钟。
- 孵育时，酶标板不可受阳光直射。
- 13.孵育 30 分钟后，在每个微孔内加入 50μL 终止液并混合。
- 终止液要用与步骤 11 加酶底物溶液相同的顺序及相似的速度加至各微孔。
- 14.在终止反应后的 5 分钟内，用装有 450nm 主滤光片及 620~650nm 参考滤光片的酶标仪来测量每个微孔的光密度（Optical Density, OD）值。

计算方法和实验室质控

1. 标准曲线的绘制

确定酶标板中各浓度标准品重复测定的平均 OD 值。

以平均 OD 值的自然对数为 y 轴，标准品的 γ -干扰素浓度（IU/mL）的自然对数为 x 轴，制作标准曲线（计算时省略零浓度标准品）。通过回归分析，计算最佳的标准曲线。

按照每个样本的 OD 值，使用标准曲线来确定每个检测血浆样本的 γ -干扰素浓度（IU/mL）。这些计算可使用酶标仪所附的软件、标准电子数据表或统计软件（如: Microsoft Excel）来完成。建议所使用的软件能计算回归分析、标准品的变异系数（%CV）及标准曲线的相关系数（r）。

2. 实验室质控

检测结果的准确性取决于生成准确的标准曲线。因此，在解释样本结果前，必须先检验标准品的结果。

符合下列规则 ELISA 测定是有效的：

- 标准液 1 的平均 OD 值 ≥ 0.600 。
- 标准液 1 及标准液 2 重复测定的 OD 值的变异系数（CV） $\leq 15\%$ 。
- 标准液 3 及标准液 4 重复测定的 OD 值与其平均值之差，变动范围不超过 0.040 光密度值。
- 由各标准液平均 OD 值计算而得的相关系数（r） ≥ 0.98 。

若结果不符合上述规则，则本次测试是无效的且必须重新检测。

- 零浓度标准品（绿色稀释剂）的平均 OD 值 ≤ 0.150 。若平均 OD 值 > 0.150 ，则必须检查酶标板清洗步骤。

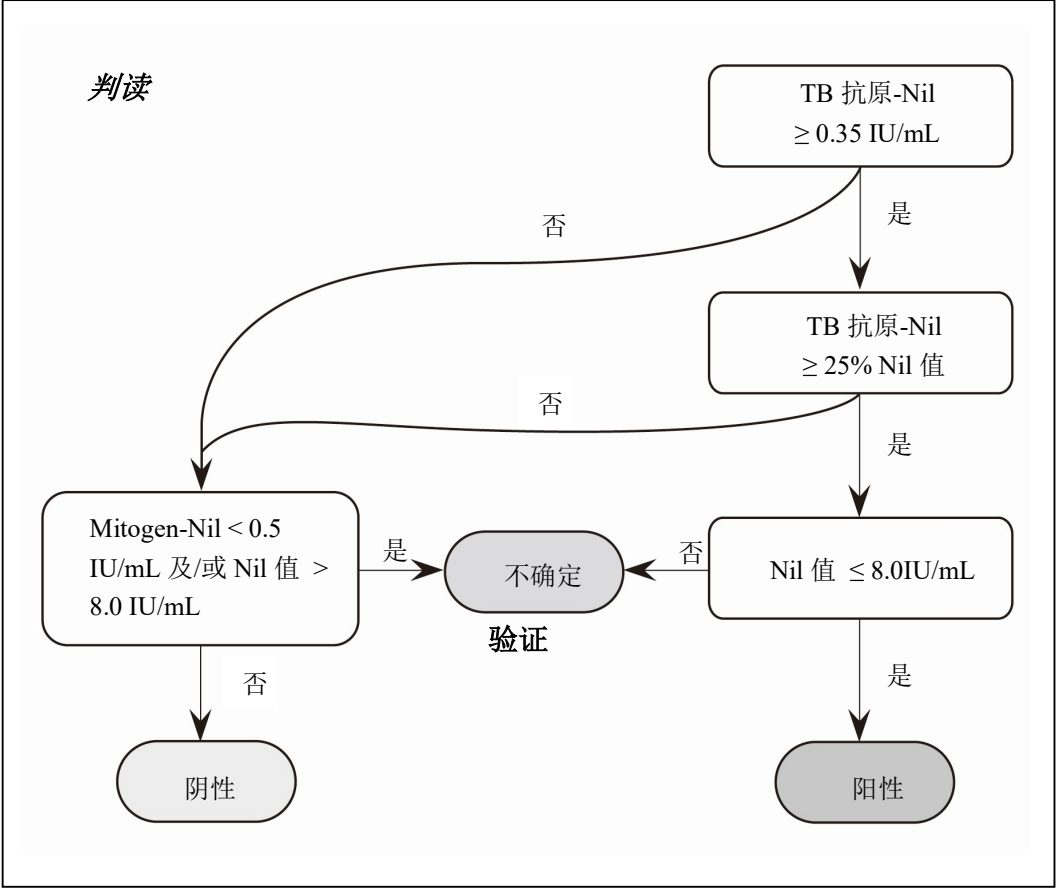
【阳性判断值】

Nil (IU/mL)	TB 抗原减去 Nil (IU/mL)	Mitogen 减去 Nil (IU/mL) ¹	本测试结果
≤ 8.0	< 0.35	≥ 0.5	阴性
	≥ 0.35 和 $< 25\%$ Nil 值	≥ 0.5	
	≥ 0.35 和 $\geq 25\%$ Nil 值	任何值	阳性 ²
	< 0.35	< 0.5	不确定
	≥ 0.35 和 $< 25\%$ Nil 值	< 0.5	
> 8.0 ³	任何值	任何值	

1. 对 Mitogen 阳性对照（有时是结核抗原）的反应结果，可能会落在酶标仪的范围之外，这不会对检测结果判读造成影响。
2. 未怀疑结核杆菌感染，但初次结果阳性者，可再次用试剂盒重复检测原始血浆两次来确认。若再次试验中一个或两个结果是阳性，则该测试者被认为检测阳性。
3. 在临床试验中，少于 0.25%的测试者的 Nil 对照的 γ -干扰素反应会 > 8.0 IU/mL。

所测得的 γ -干扰素浓度不会与感染阶段或程度、免疫反应水平、或可能发展至活动性结核有相互关系。

判读流程图



【检验结果的解释】

结核抗原管的 γ -干扰素含量若显著高于 Nil 对照管，则视为实验结果阳性。如血液样本对 Mitogen 反应弱 (< 0.5 IU/mL) 且对结核抗原呈阴性反应时，表示结果不确定。产生这种现象的原因可能是：淋巴细胞不足；样本处理不正确导致淋巴细胞活力降低；Mitogen 血液培养管采血或混合不当；病人的淋巴细胞无法产生 γ -干扰素。Nil 管样本用于修正背景、异嗜抗体效应和血液样本中非特异的 γ -干扰素影响。因此结核抗原管及 Mitogen 对照管的 γ -干扰素测定值需减去 Nil 管的 γ -干扰素测定值。

Mitogen 管可作为本测试的阳性对照，当无法肯定受试者的免疫状况时，使用 Mitogen 管更能确定其检测结果。Mitogen 管亦可作为是否正确采血及孵育的控制对照。

阴性：可能不存在结核感染 T 细胞免疫反应

阳性：可能存在结核感染 T 细胞免疫反应

不确定：不能确定是否存在结核感染 T 细胞免疫反应

注意：诊断或排除结核病及评估是否有结核感染的可能性时，须结合流行病学、病史、医学、和其他诊断结果一起考虑。

【检验方法的局限性】

- 1) 本测试结果必须结合测试者的流行病史、目前病史及其他诊断评估一起使用。
- 2) 测试者的 Nil 值若高于 8 IU/mL 时，将被视为“不确定”。因为在此情况下，对结核抗原的反应可能 $\geq 25\%$ Nil 值，而使其落在本测试可测量范围之外。
- 3) 不可靠或不确定的结果，可能起因于以下几点：
 - 未按说明书描述的步骤来操作。
 - 血液循环中的 γ -干扰素浓度过高或存在异嗜性抗体。
 - 从采血到 37℃ 孵育的间隔时间超过 16 小时。

【产品性能指标】

国外数据

由于潜伏结核感染（LTBI）尚未有明确的标准，因此 QFT 的灵敏度及特异性无法做实际评估。QFT 的特异性采用在低结核感染风险（无已知风险因素）人群的假阳性率来近似评估。灵敏度采用在经培养确认是活动性结核病的患者群的阳性率来近似评估。

特异性

在美国的一个研究中，有 866 位志愿者接受 TST 测试时，同时抽血做 QFT 测试。测试时以标准调查方式确定人口统计学信息及结核风险因素。432 人无已知结核分枝杆菌感染风险因素，其中 391 人得到 QFT 和 TST 结果，且没有人接种过卡介苗。第二个特异性研究是在日本低风险人群中做 QFT 测试，其中约有 90% 的人曾经接受卡介苗接种。两个特异性研究结果请见表 3。

表 3：QFT 特异性—无已知结核分枝杆菌感染风险因素的人群的结果

研究	卡介苗 接种率 %	测试者 总数	QFT 结果 为不确定 的数量	QFT 结果为 阳性的数量/ 有效测试数 量	QFT 特异性 (95%CI)	TST 结 果为阳 性数量/ 测试数 量	TST*特异 性(95%CI)
美国 (未发表)	0%	391	1	3/390	99.2% (98~100)	6/391	98.5% (97~99)
日本 ¹⁵	~90%	168	6	2/162	98.8% (95~100)	—	—
总计		559	7/559 (1.3%)	5/552	99.1% (98~100)	—	—

*对未接种卡介苗人群采用 10mm 为 TST 临界值。若用 15mm 临界值 TST 特异性为 99.1%。

对活动性结核病的灵敏度

美国、澳大利亚及日本的疑似结核病患者，经培养确认有结核分枝杆菌感染后，进行检测来评估 QFT 灵敏度。由于尚未有潜伏结核感染的明确的标准检测方法，一个恰当的替代方法是做结核分枝杆菌的微生物培养，因为有活动性结核病的患者可确定被结核分枝杆菌感染。患者在抽血进行 QFT 测试前，所接受的治疗必须少于 8 天。

表 4 总结三组结核分枝杆菌培养阳性患者的研究发现。QFT 对活动性结核病的整体灵敏度为 89%（157/177）。

表 4：QFT—经培养确认结核分枝杆菌感染的目标人群

研究	QFT 结果为阳性的数量/有效测试数量	QFT 灵敏度（95%CI）
日本 TB 患者 ¹⁵	86/92	93%（86~97%）
澳大利亚	24/27	89%（70~97%）
美国	47/58	81%（68~90%）
总计	157/177	89%（83~93%）

LTBI 的诊断

大量已发表的研究显示 QFT 在各种有 LTBI 风险人群的性能。一些挑选出来的研究的原则发现请见表 5。

表 5：选出的已发表的 QFT 在有 LTBI 风险人群的研究

研究	总测试数	结果与发现
印度 医务工作者 (Pai et al 2005) ²⁶	726	背景为极高的结核发病率。QFT 阳性为 40%，TST 阳性（10mm）为 41%，两者高度一致，都不受卡介苗接种的影响。两测试都与年龄及从事医务工作时间的风险因素相关。
丹麦 HIV 患者 (Brock et al 2006) ⁵	590	QFT 测得 HIV 阳性患者的 LTBI 总体患病率为 4.6%（27/590）。阳性结果与结核病风险有关。有 2 位 QFT 阳性的患者在 1 年内发展为活动性结核病。不确定反应者（n=20，3.4%）与 CD4 计数<100/μL 显著相关。
住院儿童 (Dogra et al 2006) ¹⁰	105	在疑似结核或有结核接触史的儿童中同时做 QFT 及 TST 检测。QFT 阳性为 10.5%，TST 阳性（10mm）为 9.5%。两者的一致性总体为 95.2%，在未接受卡介苗接种者为 100%。
德国 接触者 (Diel et al 2006) ⁹	309	15 个不同病例的密切接触者被检测。51%有接种卡介苗，27%是国外出生。70%接种卡介苗者和 18%未接种者是 TST 阳性（5mm），而 QFT 阳性分别是 9%及 11%。显示 QFT 与结核病风险相关，而 TST 只与卡介苗接种相关。

更多发表的文献报告了使用灵敏度稍低的液体抗原的 QuantiFERON - TB Gold（QFT 上代产品）和 QFT 测试的性能。这些研究包括在活动性结核病接触者^{9,11,19,25}、儿童^{6,10,25,28}、HIV 阳性患者^{2,5,20}、医务工作者^{13,26,32}、免疫抑制者^{3,4,22,23,27,30,31}，以及疑似结核病患者^{7,8,10,18} 和低风险个体¹⁵ 使用该测试。

重复性和 TST 对后续 QFT 测试的影响

作为美国的特异性研究的一部分，部分测试者在初次 QFT 和 TST 检测之后的 4~5 周，再次进行 QFT 测试。有 260 人完成此两次的检测，其结果一致性达 99.6%（259/260）。显示前面

的 TST 测试不会引起 QFT 测试产生阳性反应。

【注意事项】

警告：

- 阴性检测结果不能排除结核分枝杆菌感染或结核病的可能性。导致假阴性结果的原因可能是：感染阶段（如在发生细胞免疫反应之前采集标本）、患有影响免疫功能的疾病、静脉穿刺后血液培养管的操作不正确、检测操作不正确、或其它免疫学改变。
- 阳性检测结果不能作为判定结核菌感染的唯一或绝对依据。不正确的检测操作可能会造成假阳性反应。
- 当检测结果呈阳性时，应进一步进行活动性结核病的医学及诊断评估（如：细菌抗酸染色涂片及培养、胸部 X 光）。
- 虽然所有种类的 BCG 疫苗及大部分已知的非结核分枝杆菌并不含有 ESAT-6、CFP-10 及 TB7.7(p4)，但 *M. kansasii*、*M. szulgai* 或 *M. marinum* 感染可使检测结果呈阳性。若怀疑有这些细菌感染，则应该用其它方法进行检测。

注意事项

- 仅供体外诊断使用。
- 有害物质：酶底物溶液含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（Tetramethylbenzidine），若摄入、吸入及接触皮肤会对人体造成危害。对皮肤及眼睛有刺激性。诱变剂。须作为潜在致癌物处理，使用时需配戴眼罩、手套。
- 有害物质：终止液包含硫酸（H₂SO₄）。摄入、眼睛接触、皮肤接触或吸入会对人体造成危害。使用时需配戴眼罩、手套并穿着常规实验室防护服。如果终止液不慎接触到皮肤或眼睛，应立即用大量清水冲洗并迅速就医。
- 有害物质：γ-干扰素标准品及 100 倍浓缩结合物如果误食可能会不舒服，或可能造成皮肤刺痛。请配戴手套及穿着常规实验室防护服。
- 人血液样本应视为有潜在传染性。请遵从血液处理的相关规范。
- 硫柳汞作为某些试剂的防腐剂。误食、吸入、或皮肤接触有可能具有毒性。
- 绿色稀释剂含有正常小鼠血清和酪蛋白，可能诱发过敏反应，应避免接触皮肤。
- 未遵照本说明书进行测定可能会得到错误结果。请于使用前认真阅读说明书。
- 使用前如果发现试剂瓶有任何破损或泄露现象，请勿使用。
- 请勿混合或使用其它批次的试剂盒。
- 应按照当地法规处理未使用的试剂及生物样品。
- 请勿使用已过期的血液培养管或酶免试剂部分。
- 实验室设备如洗板机和酶标仪，已经过校准或验证确保能正常使用。
- 血液培养管在采血后 16 小时内，应尽快置于 37℃ 孵育。孵育 16~24 小时后，将血液培养管离心，取出血浆，并用酶联免疫法（ELISA）测定 γ-干扰素（IU/mL）含量。

技术信息

不确定的结果

不确定的结果是非常少见的，可能与测试者的免疫状况有关，但也可能与一些技术因素有关：

- 从抽血到开始在 37℃ 孵育的时间超过 16 小时。
- 未在建议的温度范围内（22℃±5℃）储存血液。
- 血液培养管未充分混合。
- ELISA 酶标板的清洗不彻底。

若怀疑有采血或处理血液样本的技术问题时，须采集新的血液样本重做整个 QFT 测试。若

怀疑是不当的清洗或其他 ELISA 操作上的误差时,可将已刺激的血浆样本再重新进行 ELISA 检测。除非 ELISA 检测时有错误,否则因过低 Mitogen 值或过高 Nil 值所造成的不确定结果预计不会在复测时改变。不确定的结果应该如实报告。医生可选择重新采血或酌情执行其它程序。

凝固的血浆样本

长时间储存的血浆样本会出现纤维蛋白凝块,可离心样本来沉淀凝结物质,减少吸取血浆的困难。

ELISA 问题解答

非特异的颜色产生

可能原因	解决方法
酶标板清洗不完全	每个微孔要用 400 μ L 洗涤液清洗至少 6 次。根据使用的洗板机不同,有可能要求清洗超过 6 次。每次清洗间应该至少要有 5 秒钟的浸泡期。
ELISA 微孔交叉污染	样品的吸取及混合时要小心,降低错误风险。
试剂盒/成分过期	确保试剂盒在有效期内使用。确保复溶的标准品及 100 倍浓缩结合物在复溶后 3 个月内使用。
酶底物溶液被污染	如酶底物溶液呈现蓝色则不再使用。确保使用清洁的盛放试剂的凹槽。
吸取样本前混合离心过的血液培养管里的血浆	确保小心地从分离胶上面吸取血浆样本,不要上下反复吸取,注意不要搅动分离胶表面的物质。

标准品的吸光度值过低

可能原因	解决方法
标准品稀释错误	确保试剂盒标准品的稀释按照说明书要求正确准备。
移液错误	确保移液器已校正,并按照制造商的操作指南使用。
孵育温度过低	ELISA 的孵育应在室温 (17~27°C) 进行。
孵育时间太短	加入酶结合物、标准品和样品的酶标板应孵育 120 $\pm$ 5 分钟。加入酶底物溶液后应孵育 30 分钟。
酶标仪的滤光片使用错误	酶标板应用 450nm 滤光片及 620~650nm 参考滤光片读数。
试剂过冷	100 倍浓缩结合物以外的所有试剂,均应于检测前置于室温约 1 小时。
试剂盒/成分过期	确保试剂盒在有效期内使用。确保复溶的标准品及 100 倍浓缩结合物在复溶后 3 个月内使用。

背景值过高

可能原因	解决方法
酶标板清洗不完全	每个微孔要用 400 μ L 洗涤液清洗至少 6 次。根据使用的洗板机不同，有可能要求清洗超过 6 次。每次清洗间应该至少要有 5 秒钟的浸泡期。
孵育温度过高	ELISA 的孵育应在室温（17~27℃）进行。
试剂盒/成分过期	确保试剂盒在有效期内使用。确保复溶的标准品及 100 倍浓缩结合物在复溶后 3 个月内使用。
酶底物溶液被污染	如酶底物溶液呈现蓝色则不再使用。确保使用清洁的盛放试剂的凹槽。

非线性标准曲线及复测差异

可能原因	解决方法
酶标板清洗不完全	每个微孔要用 400 μ L 洗涤液清洗至少 6 次。根据使用的洗板机不同，有可能要求清洗超过 6 次。每次清洗间应该至少要有 5 秒钟的浸泡期。
标准品稀释错误	确保试剂盒标准品的稀释按照说明书要求正确准备。
混合不足	在加入酶标板前，通过倒置或温和涡旋充分混合试剂。
不一致的移液操作或检测过程中断	加入样本和标准品应当连续进行。所有试剂都应在开始检测前准备好。

检测步骤视频及大多数技术问题解答可在 Gnowee™ 中找到: QuantiFERON 的参考指南通过代理商或直接在 www.gnowee.net 注册，可从 Cellestis 公司免费获得。

简略检测步骤

第一阶段—血液孵育及提取血浆

1. 充入血液至血液培养管，并充分地上下振摇血液培养管 10 次，确保整个试管内壁都被血液覆盖，以溶解管壁上的抗原。

2. 将血液培养管直立，在 37℃ 孵育 16~24 小时。

3. 孵育结束后，以 2000~3000RCF (g) 离心血液培养管 15 分钟，分离血浆和红细胞。

4. 离心后，用移液器收集血浆样本。收集前要避免反复上下吸取或任何混合血浆的操作。始终注意不要搅动分离胶表面的物质。

第二阶段—人 γ 干扰素的 ELISA 测定

1. 平衡 ELISA 试剂。除 100 倍浓缩结合物外所有试剂在室温下平衡至少 60 分钟。

2. 以蒸馏水或去离子水复溶试剂盒标准品成 8.0IU/mL。
准备 4 个标准品稀释液。

3. 以蒸馏水或去离子水复溶冻干的 100 倍浓缩结合物。

4. 以绿色稀释剂配制实验所需浓度的结合物，并于每个微孔加入 50 μ L。

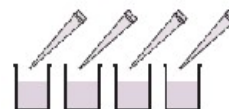
5. 加入 50 μ L 血浆样本和 50 μ L 标准品到相应的微孔，用酶标板振荡器混合。

6. 室温下孵育 120 分钟。

7. 每个微孔以 400 μ L 洗涤液清洗至少 6 次。



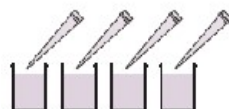
8. 加入 100 μL 酶底物溶液到微孔中，用酶标板振荡器混合。



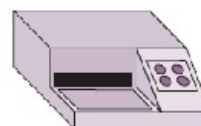
9. 室温下孵育 30 分钟。



10. 加入 50 μL 终止液到微孔中，用酶标板振荡器混合。



11. 以装有 450nm 滤光片及 620~650nm 参考滤光片的酶标仪来读取结果。



12. 分析结果。



【参考文献】

1. Andersen, P., et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. Balcells, M.E., et al. A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis*. 2008. 12; 645-52.
3. Bartalesi, F., et al. QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J*. 2009. 33; 586-93.
4. Bocchino, M., et al. Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008. 27; 907-13.
5. Brock, I., et al. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res*. 2006.7; 56.
6. Chun, J.K., et al. The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008. 62; 389-94.
7. Connell, T.G., et al. A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. Detjen, A.K., et al. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007. 45; 332-8.
9. Diel, R., et al. Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest*. 2009. 135; 1010-8.
10. Diel, R., et al. Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008. 177; 1164-70.
11. Diel, R., et al. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res*. 2006. 7; 77.
12. Dogra, S., et al. Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect*. 2007. 54; 267-76.
13. Drobniewski, F., et al. Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med*. 2007. 4; e55.
14. Gerogianni, L., et al. Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology*. 2008. 13; 270-4.
15. Harada, N., et al. Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect*. 2008. 56; 348-53.
16. Higuchi, K., et al. Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol*. 2009. 198; 33-7.
17. Kang, Y.A., et al. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA*. 2005. 293; 2756-61.
18. Katiyar, S.K., et al. Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment

- efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008. 12; 1146-52.
19. Kipfer, B., et al. Tuberculosis in a Swiss and training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly*. 2008. 138; 267-72.
 20. Luetkemeyer, A., et al. Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007. 175; 737-42.
 21. Mackensen, F., et al. QuantiFERON-TB Gold – A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol*. 2008. 146; 761-6.
 22. Manuel, O., et al. Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant*. 2007. 7; 2797-801.
 23. Matulis, G., et al. Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a Mycobacterium tuberculosis antigen specific IFN-gamma assay. *Ann Rheum Dis*. 2007. 67; 84-90.
 24. Mirtskhulava, V., et al. Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008. 12; 513-519.
 25. Nakaoka, H., et al. Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis*. 2006. 12; 1383-8.
 26. Pai, M., et al. Mycobacterium tuberculin skin testing. *JAMA*. 2005. 293; 2746-55.
 27. Ponce de Leon, D., et al. Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol*. 2008. 35; 776-81.
 28. Richeldi, L., et al. Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur Respir J*. 2008. 32; 524-5.
 29. Rothel, J.S., and Andersen, P. Diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2005. 3; 981-93.
 30. Schoepfer, A.M., et al. Comparison of an interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2008. 103; 2799-806.
 31. Silverman, M.S., et al. Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin Biochem*. 2007. 40; 913-5.
 32. Stebler, A., et al. Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008. 29; 681-3.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：QIAGEN 凯杰

住所：19300 Germantown Road Germantown MD 20874 USA

生产地址：19300 Germantown Road Germantown MD 20874 USA

联系方式：1-800-426-8157

售后服务单位名称：凯杰企业管理（上海）有限公司

联系方式：800-988-0325

代理人名称：凯杰企业管理（上海）有限公司

住所：中国（上海）自由贸易试验区达尔文路 88 号 20 号楼

联系方式：800-988-0325

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注进 20173406702

【说明书核准日期及修改日期】 2018 年 6 月 28 日