

# ***QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold***

***(„In-Tube“-Methode = im Röhrchen)***

**IFN-Gamma-Test für Vollblutproben  
zur Messung von Reaktionen auf die Peptidantigene  
ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p.4)**

**PACKUNGSBEILAGE**

*In-vitro*-Diagnostikum



# INHALTSVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| 1. VERWENDUNGSZWECK  | 2  |
| 2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS                                       | 2  |
| Testprinzip  | 3  |
| Zeitaufwand  | 3  |
| 3. REAGENZIEN UND AUFBEWAHRUNG   | 4  |
| Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien                            | 5  |
| Lagerung   | 5  |
| Blutentnahmeröhrchen   | 5  |
| Kitreagenzien  | 5  |
| Rekonstituierte und nicht benötigte Reagenzien                                   | 5  |
| 4. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE  | 6  |
| Vorsichtsmaßnahmen   | 6  |
| Warnhinweise   | 6  |
| 5. PROBENNAHME UND -HANDHABUNG   | 7  |
| 6. GEBRAUCHSANWEISUNG  | 9  |
| 1. Schritt: Inkubation der Blutprobe und Entnahme des Plasmas                    | 9  |
| 2. Schritt: Human-IFN- $\gamma$ -ELISA   | 10 |
| 7. BERECHNUNGEN UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE                                | 13 |
| Erstellung der Standardkurve   | 13 |
| Qualitätskontrolle   | 16 |
| Interpretation der Ergebnisse  | 17 |
| 8. GRENZEN DES VERFAHRENS  | 19 |
| 9. LEISTUNGSMERKMALE   | 20 |
| 10. TECHNISCHE INFORMATIONEN   | 21 |
| Unschlüssige Ergebnisse  | 21 |
| Geronnene Plasmaproben   | 21 |
| ELISA-Problembhebung   | 22 |
| Unspezifische Farbreaktion   | 22 |
| Niedriger OD-Wert der Standards  | 22 |
| Starke Hintergrundfärbung  | 23 |
| Nicht-lineare Standardkurve und Abweichungen zwischen den beiden<br>Doppelproben | 23 |
| 11. BIBLIOGRAPHIE  | 24 |
| 12. TECHNISCHER KUNDENDIENST   | 25 |
| 13. TESTVERFAHREN (KURZFORM)   | 26 |

## 1. VERWENDUNGSZWECK

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) ist ein Test zur *In-vitro*-Diagnostik, der einen Peptidcocktail enthält, der die Proteine ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4) simuliert und Zellen in heparinisiertem Vollblut stimuliert. Der Nachweis von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) durch die ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-Methode dient der Erkennung von *In-vitro*-Reaktionen auf diese Peptidantigene, die bei einer *Mycobacterium tuberculosis*-Infektion vorliegen.

QuantiFERON®-TB Gold IT ist ein indirekter Test zum Nachweis einer *M. tuberculosis*-Infektion (einschließlich der aktiven Erkrankung). Die Testergebnisse sollten im Zusammenhang mit der Risikobeurteilung, Röntgenuntersuchungen und sonstigen medizinischen und diagnostischen Untersuchungen betrachtet werden.

## 2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTS

Tuberkulose (Tb) ist eine ansteckende Erkrankung, die durch eine Infektion mit Organismen des *M. tuberculosis*-Komplexes (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) verursacht wird. Die Ansteckung durch Personen, die an Tb der Atemwege leiden, erfolgt in der Regel über eine Tröpfcheninfektion. Bei neu infizierten Patienten kann die Tb-Erkrankung innerhalb von Wochen oder Monaten auftreten, aber bei den meisten Infizierten treten keine Beschwerden auf. Bei einigen persistiert eine latente Tuberkulose-Infektion (LTBI), eine nicht ansteckende, asymptomatische Erkrankung, die erst nach Monaten oder Jahren zum Ausbruch kommen kann. Der Hauptzweck der Erkennung der LTBI besteht darin, eine Behandlung zur Prävention des Ausbruchs der Tb-Erkrankung in Betracht zu ziehen. Bis vor Kurzem war der Tuberkulin-Hauttest (tuberculin skin test, TST) die einzige verfügbare Methode zur Diagnose der LTBI. Die kutane Sensitivität für Tuberkulin entsteht 2 bis 10 Wochen nach der Infektion. Jedoch reagieren einige Infizierte nicht auf Tuberkulin, darunter z.B. Patienten mit einer gestörten Immunreaktion infolge anderer Erkrankungen, aber auch Patienten ohne solche Störungen. Umgekehrt weisen jedoch einige Personen, die mit großer Wahrscheinlichkeit nicht an einer *M. tuberculosis*-Infektion leiden, nach der Impfung mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG), nach Infektion mit anderen Mykobakterien als dem *M. tuberculosis*-Komplex oder aufgrund unbekannter anderer Faktoren eine Tuberkulin-Sensitivität auf und erzielen ein positives Testergebnis im Tuberkulin-Hauttest

LTBI muss von einer Tb-Erkrankung unterschieden werden, die meldepflichtig ist und in der Regel die Lunge und die unteren Atemwege befällt; es können jedoch auch andere Organsysteme betroffen sein. Die Tb-Erkrankung wird aufgrund historischer, physischer, radiologischer, histologischer und mykobakteriologischer Untersuchungsergebnisse diagnostiziert.

Der QuantiFERON®-TB Gold IT Test misst die zellvermittelten Immun (CMI)-Reaktionen auf Peptidantigene, die mykobakterielle Proteine simulieren. Diese Proteine (ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4)) fehlen in allen BCG-Stämmen und in den meisten nicht-tuberkulösen Mykobakterien mit Ausnahme von *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum*.<sup>1</sup> Bei Personen, die mit Organismen des *M. tuberculosis*-Komplexes (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) infiziert sind, liegen im Allgemeinen Lymphozyten im Blut vor, die diese und andere mykobakterielle Antigene erkennen. Bei diesem Erkennungsprozess wird das Zytokin IFN- $\gamma$  produziert und freigesetzt. Der Nachweis und die anschließende Quantifizierung von IFN- $\gamma$  bildet die Grundlage dieses Tests.

Die im QuantiFERON®-TB Gold IT Test verwendeten Antigene sind ein Peptidcocktail, der die Proteine ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4) simuliert. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass diese Peptidantigene die IFN- $\gamma$ -Reaktion in den T-Zellen von *M. tuberculosis*-Infizierten stimulieren, aber nicht die T-Zellen von Nicht-infizierten oder BCG-geimpften Personen ohne Tb-Erkrankung oder LTBI-Risiko.<sup>1-32</sup> Jedoch kann die IFN- $\gamma$ -Reaktion durch medizinische Behandlungen oder Erkrankungen, die die Immunfunktion beeinträchtigen, potenziell verringert werden. Patienten mit bestimmten anderen mykobakteriellen Infektionen können ebenfalls auf ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4) reagieren, da die Gene, auf denen sich diese Proteine befinden, auch in *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum*<sup>1,23</sup> vorliegen. Der QuantiFERON®-TB Gold IT Test ist daher eine wertvolle Hilfe bei der Diagnose einer Infektion mit dem *M. tuberculosis*-Komplex bei erkrankten Patienten. Ein positives Testergebnis unterstützt die Diagnose einer Tb-Erkrankung; jedoch kann es auch durch andere Mykobakterien (z.B. *M. kansasii*) hervorgerufen werden. Für die Bestätigung bzw. den Ausschluss einer Tb-Erkrankung sind weitere medizinische und diagnostische Untersuchungen erforderlich.

## Testprinzip

Das QuantiFERON®-TB Gold IT System beinhaltet spezielle Blutentnahmeröhrchen, in die die Vollblutproben entnommen werden. Die anschließende Inkubation der Blutproben im Röhrchen dauert 16 bis 24 Stunden. Danach wird das Plasma entnommen und auf das Vorliegen von IFN- $\gamma$  untersucht, das gegebenenfalls in Reaktion auf die Peptidantigene gebildet wurde.

Der QuantiFERON®-TB Gold IT Test besteht aus zwei Schritten. Im 1. Schritt wird die Vollblutprobe in die verschiedenen QuantiFERON®-TB Gold Blutentnahmeröhrchen entnommen. Hierzu gehören ein Nullkontrollröhrchen, ein Tb-Antigen-Röhrchen und ein optionales Mitogen-Röhrchen.

Das Mitogenröhrchen kann beim QuantiFERON®-TB Gold IT Test als positive Kontrolle verwendet werden. Dies kann besonders angezeigt sein, wenn der Immunstatus des Patienten fraglich ist. Das Mitogenröhrchen kann auch als Kontrolle für den korrekten Umgang mit der Blutprobe und für die korrekte Inkubation eingesetzt werden.

Das Röhrchen sollte so rasch wie möglich, unbedingt jedoch binnen 16 Stunden nach der Blutentnahme, bei 37°C inkubiert werden. Nach der 16- bis 24-stündigen Inkubationszeit werden die Röhrchen zentrifugiert. Dann wird das Plasma entnommen und die IFN- $\gamma$ -Menge (in IE/ml) mit Hilfe der ELISA-Methode bestimmt.

Der Test gilt als positiv für die IFN- $\gamma$ -Reaktion auf das Tb-Antigenröhrchen, wenn dieser Wert signifikant über dem Wert der Nullkontrolle (IFN- $\gamma$  in IE/ml) liegt. Bei Verwendung des Mitogenröhrchens dient die mitogenstimulierte Plasmaprobe als IFN- $\gamma$ -positive Kontrolle für jede getestete Probe. Eine geringe Reaktion auf Mitogen (< 0,5 IE/ml) gilt als unschlüssiges Ergebnis, wenn die Blutprobe auch eine negative Reaktion auf die Tb-Antigene aufweist. Ein solches Muster kann bei ungenügender Lymphozytenzahl, verringerter Lymphozytenaktivität infolge unsachgemäßer Probenbehandlung, unsachgemäßem Befüllen oder Mischen des Mitogenröhrchens entstehen oder dann, wenn die Lymphozyten des Patienten nicht in der Lage sind, IFN- $\gamma$  zu produzieren. Die Nullprobe umfasst eine Korrektur für unspezifische Hintergrundreaktionen, heterophile Antikörpereffekte<sup>7</sup> sowie unspezifisches IFN- $\gamma$  in der Blutprobe. Der IFN- $\gamma$ -Wert des Nullröhrchens wird vom IFN- $\gamma$ -Wert des Tb-Antigen-Röhrchens und des Mitogenröhrchens (sofern verwendet) abgezogen.

## Zeitaufwand für den Test

Nachstehend finden Sie Angaben zur geschätzten Dauer des QuantiFERON®-TB Gold IT Tests sowie zur erforderlichen Zeit beim Testen mehrerer Proben im Batch-Modus.

Inkubation der Probenröhrchen bei 37 °C: 16 - 24 Stunden

ELISA: ca. 3 Stunden pro ELISA-Platte

- < 1 Std. Arbeitszeit
- plus 10 – 15 Min. pro zusätzlicher Platte

### 3. REAGENZIEN UND AUFBEWAHRUNG

#### Tuberkulose- und Kontrollantigen-Blutentnahmeröhrchen

##### Best.-Nr. 0590 0301

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Nullkontrollröhrchen (grauer Verschluss)   | 100 Röhrchen |
| 2. Tb-Antigen-Röhrchen (roter Verschluss)     | 100 Röhrchen |
| 3. Mitogen-Kontrollröhrchen (lila Verschluss) | 100 Röhrchen |

*HINWEIS: Die Röhrchen sind auch wie folgt erhältlich:*

*100 Nullkontrollröhrchen + 100 Tb-Antigen-Röhrchen (Best.-Nr. 0590 0201)*

*100 Mitogen-Kontrollröhrchen (Best.-Nr. 0593 0201)*

*Best.-Nr. 05900210: (für große Höhen) 100 Nullkontrollröhrchen, 100 Tb-Antigen-Röhrchen*

*Best.-Nr. 05900505: (für große Höhen) 100 Nullkontrollröhrchen, 100 Tb-Antigen- und 100-Mitogen-Kontrollröhrchen*

*Best.-Nr. T0593 0502: (für große Höhen) 100 Mitogen-Kontrollröhrchen*

#### ELISA-Bestandteile

##### Best.-Nr. 0594 0201

- |   |                     |
|---|---------------------|
| 1. Mikrotiterstreifen                                       | 24 x 8 Vertiefungen |
| 2. Human-IFN- $\gamma$ -Standard, lyophilisiert             | 1 Fläschchen        |
| 3. Grüne Verdünnungslösung                                  | 1 x 30 ml           |
| 4. Konjugatkonzentrat (100fach konzentriert), lyophilisiert | 1 x 0,3 ml          |
| 5. Waschpufferkonzentrat (20fach konzentriert)              | 1 x 100 ml          |
| 6. Enzymsubstratlösung                                      | 1 x 30 ml           |
| 7. Enzymstopplösung   | 1 x 15 ml           |

## **Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien**

- 37 °C Inkubator; kein CO<sub>2</sub> erforderlich.
- Kalibrierte Pipetten mit variablem Volumen (10 µl bis 1000 µl) mit Einwegspitzen
- Kalibrierte Mehrkanalpipette zur Abgabe von 50 µl und 100 µl mit Einwegspitzen
- Schüttler für Mikrotiterplatten
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser (2 Liter)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (vorzugsweise automatisiert)
- Lesegerät für Mikrotiterplatten mit 450-nm-Filter und 620 bis 650 nm-Referenzfilter

## **Lagerung**

### **Blutentnahmeröhrchen**

- Lagern Sie die Blutentnahmeröhrchen bei 4 - 25 °C.
- Die Haltbarkeit der QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Blutentnahmeröhrchen beträgt 15 Monate ab Herstellungsdatum (Lagerung bei 4 – 25 °C).

### **Kitreagenzien**

- Lagern Sie das Kit bei 2 – 8 °C.
- Schützen Sie die Enzymsubstratlösung stets vor direkter Sonneneinstrahlung.
- Die Haltbarkeit des QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT ELISA-Kits beträgt 3 Jahre ab Herstellungsdatum (Lagerung bei 2 - 8°C).

### **Rekonstituierte und nicht benötigte Reagenzien**

Anweisungen zur Rekonstituierung der Kitreagenzien finden Sie in Kapitel 6 unter „Vorbereitung der Reagenzien“.

- Der rekonstituierte Kitstandard ist bei Lagerung zwischen 2 und 8 °C drei Monate lang haltbar.
  - *Notieren Sie das Datum der Rekonstitution des Kitstandards.*
- Nach der Rekonstitution muss nicht benötigtes Konzentrat (100x) wieder bei 2-8°C gelagert und ebenfalls binnen drei Monaten aufgebraucht werden.
  - *Notieren Sie das Datum der Rekonstitution des Konjugats.*
- Das gebrauchsfertige Konjugat muss binnen 6 Stunden nach Zubereitung verwendet werden.
- Der gebrauchsfertige Waschpuffer ist bei Zimmertemperatur bis zu zwei Wochen lang haltbar.

## 4. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

### Vorsichtsmaßnahmen

- Ein negatives Ergebnis im QuantiFERON®-TB Gold IT Test schließt die Möglichkeit einer *M. tuberculosis*-Infektion oder einer Tb-Erkrankung nicht aus; falsch-negative Ergebnisse können bedingt sein durch die Infektionsphase (z.B. wenn die Blutprobe vor der Entwicklung der zellulären Immunreaktion entnommen wurde), Störungen der Immunfunktion durch andere Erkrankungen, unsachgemäße Handhabung der Röhrchen nach der Blutentnahme, unrichtige Testdurchführung oder sonstige immunologische Variablen.
- Ein positives Ergebnis im QuantiFERON®-TB Gold IT Test sollte nicht als alleinige Grundlage für die Beurteilung einer Infektion mit *M. tuberculosis* dienen; durch unrichtige Testdurchführung kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen.
- Ein positives Ergebnis im QuantiFERON®-TB Gold IT Test sollte durch weitere medizinische und diagnostische Untersuchungen abgeklärt werden; nur so lässt sich ermitteln, ob eine aktive Tb-Erkrankung vorliegt (z.B. durch AFB-Abstrich und Kultur sowie Thorax-Röntgenuntersuchung).
- Zwar sind ESAT-6, CFP-10 und TB7.7(p4) in BCG-Stämmen und in den meisten bekannten nicht-tuberkulösen Mykobakterien nicht enthalten, jedoch kann ein positives Ergebnis im QuantiFERON®-TB Gold IT Test auch auf eine Infektion mit *M. kansasii*, *M. szulgai* oder *M. marinum* zurückzuführen sein. Werden solche Infektionen vermutet, sind alternative Testmethoden einzusetzen.

### Warnhinweise

- **Nur zum diagnostischen Gebrauch *in vitro*.**
- **Vorsicht:** Die **Enzymsubstratlösung** enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, das beim Verschlucken, Einatmen und beim Hautkontakt gefährlich ist. Reizt Haut und Augen. Wirkt mutagen. Tragen Sie eine Schutzbrille und Laborhandschuhe und behandeln Sie diese Lösung als potenziell karzinogen.
- **Vorsicht:** Die **Enzymstopplösung** enthält H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, das beim Verschlucken, Einatmen, bei Augenkontakt und Hautkontakt gefährlich ist. Tragen Sie eine Schutzbrille, Laborhandschuhe und laborübliche Schutzkleidung. Nach versehentlichem Haut- oder Augenkontakt mit der Stopplösung spülen Sie bitte mit großen Mengen Wasser nach und suchen Sie einen Arzt auf.
- **Vorsicht:** Der **IFN-γ Standard** und das **100-fach konzentrierte Konjugatkonzentrat** können bei Verschlucken Beschwerden verursachen und bei Hautkontakt Irritationen auslösen. Tragen Sie Laborhandschuhe und laborübliche Schutzkleidung.
- **Betrachten Sie Humanblutproben stets als potenziell infektiös!** Befolgen Sie die einschlägigen Richtlinien für den Umgang mit Blut.
- Einige Reagenzien enthalten **Thimerosal** als Konservierungsmittel. Thimerosal kann beim Verschlucken, Einatmen und bei Hautkontakt toxisch wirken.
- Die **grüne Verdünnungslösung** enthält normales Mausserum und Kasein; diese Substanzen können allergische Reaktionen auslösen. Hautkontakt ist daher zu vermeiden.
- Abweichungen von den in der Packungsbeilage beschriebenen Verfahren und Instruktionen können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Bitte lesen Sie die Testanweisung vor Gebrauch sorgfältig durch.
- Verwenden Sie das Kit nicht, wenn eine oder mehrere Reagenzienflaschen vor Gebrauch beschädigt oder undicht sind.
- Verwenden Sie mit den Bestandteilen dieser Packung keine ELISA-Reagenzien anderer QuantiFERON®-TB Gold IT Kit-Chargen.
- Entsorgen Sie nicht benötigte Reagenzien und biologische Proben gemäß den örtlichen und nationalen Vorschriften.
- Nach dem Verfallsdatum dürfen die Blutentnahmeröhrchen und ELISA-Kitbestandteile nicht mehr verwendet werden.

## 5. PROBENNAHME UND -HANDHABUNG

### Blutentnahme

Der QuantiFERON®-TB Gold IT Test umfasst folgende Blutentnahmeröhrchen:

1. Nullkontrolle (grauer Verschluss mit weißem Ring) (für Höhen bis zu 810 Meter über dem Meeresspiegel)
2. Tb-spezifische Antigene (roter Verschluss mit weißem Ring) (für Höhen bis zu 810 Meter über dem Meeresspiegel)
3. Mitogen-Kontrolle – optional (lila Verschluss mit weißem Ring) (für Höhen bis zu 810 Meter über dem Meeresspiegel)
4. Nullkontrolle (grauer Verschluss mit gelbem Ring) (für Höhen zwischen 1.020 und 1.875 Metern)
5. Tb-Antigen (roter Verschluss mit gelbem Ring) (für Höhen zwischen 1.020 und 1.875 Metern)
6. Mitogen-Kontrolle – optional (lila Verschluss mit gelbem Ring) (für Höhen zwischen 1.020 und 1.875 Metern)

Die Antigene befinden sich in getrockneter Form in der Beschichtung der Innenwand der Blutentnahmeröhrchen. Daher müssen die Blutproben sorgfältig mit dem Inhalt des Röhrchens vermischt werden. Die Röhrchen werden dann schnellstmöglich, spätestens 16 Stunden nach Blutentnahme, in einen Inkubator (37 °C) überführt.

Optimale Ergebnisse werden bei Einhaltung folgender Anweisungen erzielt:

1. Nehmen Sie von jedem Patienten je 1 ml venöses Blut in jedes der QuantiFERON®-TB Gold IT Blutentnahmeröhrchen.

- Bis zu einer Höhe von 810 m sollten die QuantiFERON® Standard-Blutentnahmeröhrchen benutzt werden. In Höhen ab 1.020 m sollten die speziellen QuantiFERON® Blutentnahmeröhrchen für große Höhen verwendet werden.

*Bei Verwendung der QuantiFERON® Blutentnahmeröhrchen außerhalb der genannten Höhenbereiche oder bei niedrigen Probenvolumen kann das Blut auch mit einer Spritze entnommen werden; dann wird in jedes der drei Röhrchen je 1 ml Blut gegeben. Aus Sicherheitsgründen entfernt man hierzu am besten die Spritzennadel; befolgen Sie hierzu bitte die üblichen Vorsichtsmaßnahmen. Nehmen Sie den Verschluss der drei QFT-Gold IT Röhrchen ab und geben Sie in jedes Röhrchen 1 ml Blut (bis zur schwarzen Markierung am seitlichen Rand des Etiketts). Dann den Verschluss wieder anbringen und mischen wie nachstehend beschrieben.*

- Da die 1-ml-Röhrchen das Blut relativ langsam aufnehmen, belassen Sie das Röhrchen nach dem scheinbaren Erreichen des Füllstands bitte noch 2-3 Sekunden auf der Nadel. Dies gewährleistet, dass die erforderliche Blutmenge entnommen wird.

*Die schwarze Markierung seitlich am Röhrchen ist die 1-ml-Fülllinie. Die QuantiFERON®-TB Gold Blutentnahmeröhrchen wurden für Volumina von 0,8 bis 1,2 ml validiert. Wird bei der Blutentnahme diese Indikatorlinie nicht erreicht, empfiehlt es sich, eine neue Blutprobe zu entnehmen.*

- Bei Verwendung einer Butterfly-Nadel zur Blutentnahme ist mit Hilfe eines Leerröhrchens sicherzustellen, dass die Schlauchverbindung gefüllt ist, bevor die QuantiFERON®-TB Gold Röhrchen aufgesetzt werden.

2. Mischen Sie die Röhrchen durch **5 Sekunden langes kräftiges Schütteln** (oder 10x Schütteln). Vergewissern Sie sich, dass die **gesamte Innenwand des Röhrchens** mit Blut bedeckt ist.

- Sorgfältiges Mischen ist wichtig, um den Röhrcheninhalt vollständig mit der Blutprobe zu vermischen.
- Beim Schütteln ist eine gewisse Schaumbildung zu erwarten. Dies beeinträchtigt die Testleistung nicht und ist kein Grund zur Beunruhigung.

3. Beschriften Sie die Röhrchen.
  
4. Die Röhrchen müssen schnellstmöglich, spätestens jedoch 16 Stunden nach Blutentnahme, in einen Inkubator (37°C) überführt werden. Die Blutproben nicht im Kühlschrank oder Gefrierschrank aufbewahren!

## 6. GEBRAUCHSANWEISUNG

### 1. Schritt: Inkubation der Blutprobe und Entnahme des Plasmas

#### Mitgelieferte Materialien

QuantiFERON®-TB Gold IT Blutentnahmeröhrchen (siehe Kapitel 3).

#### Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien

siehe Kapitel 3.

#### Verfahren

1. Werden die Blutproben nicht sofort nach der Entnahme inkubiert, müssen die **Röhrchen unmittelbar vor der Inkubation erneut gemischt bzw. geschüttelt werden**, wie in Kapitel 5 beschrieben.
2. Inkubieren Sie die Röhrchen **STEHEND** 16 bis 24 Stunden lang bei 37 °C. CO<sub>2</sub> oder Befeuchtung ist hierbei nicht erforderlich.
3. Die Blutentnahmeröhrchen können vor dem Zentrifugieren bis zu 3 Tage lang bei 2 - 27°C aufbewahrt werden.
4. Nach der Inkubation der Röhrchen bei 37 °C werden diese zur leichteren Entnahme des Plasmas 5 – 15 Minuten lang bei 1500 – 2200g (RCF) zentrifugiert. Durch Pfropfenbildung scheiden sich die Zellen vom Plasma ab. Geschieht dies nicht, müssen die Röhrchen bei höherer Geschwindigkeit erneut zentrifugiert werden.
  - Das Plasma kann auch ohne Zentrifugieren entnommen werden, jedoch ist hierbei sehr vorsichtig vorzugehen, um bei der Plasmaentnahme nicht die Zellen aufzuwirbeln.
5. Die Plasmaproben können direkt von den Blutentnahmeröhrchen in die QuantiFERON®-TB Gold ELISA-Platte überführt werden, insbesondere bei Verwendung eines ELISA-Automaten.
6. Alternativ können die Plasmaproben vor dem ELISA gelagert werden, entweder direkt in den zentrifugierten Röhrchen oder sie werden in Plasma-Aufbewahrungsbehälter gegeben (z.B. >150 µl in die Vertiefungen oder in Mikroröhrchen in einem Ständer im 96er-Format. Bei der Aufbewahrung der Proben sind die Platten abzudecken, um Verschüttungen und Verdunstungsverlusten vorzubeugen.
  - Die Plasmaproben können bei 2 – 8 °C bis zu 4 Wochen lang aufbewahrt werden; bei einer Lagertemperatur unter –20 °C (vorzugsweise weniger als –70°C) ist eine noch längere Lagerung möglich.

## 2. Schritt: Human-IFN- $\gamma$ ELISA

### Mitgelieferte Materialien

QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold ELISA-Kit (siehe Kapitel 3).

### Erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien

siehe Kapitel 3.

### Verfahren

1. Alle Plasmaproben und Reagenzien mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats müssen vor Gebrauch Zimmertemperatur ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ) erreichen. Planen Sie hierfür mindestens 60 Minuten ein.
2. Nehmen Sie nicht benötigte Streifen aus dem Rahmen, geben Sie sie in die Folienverpackung zurück und lagern Sie sie bis zum Gebrauch im Kühlschrank.  
Sehen Sie mindestens einen Streifen für die QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Standards und eine ausreichende Zahl von Streifen für die zu testenden Patienten vor (siehe Abbildungen 2A und 2B für die Verwendung von 2 bzw. 3 Röhrchen). Bewahren Sie nach Gebrauch den Rahmen und den Deckel für die verbleibenden Streifen auf.
3. Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Kitstandard mit der auf dem Etikett des Standardfläschchens angegebenen Menge entionisierten oder destillierten Wassers. Mischen Sie das Fläschchen vorsichtig (Minimierung der Schaumbildung) und vergewissern Sie sich, dass der Inhalt vollständig aufgelöst ist. Die Rekonstitution des Standards auf das angegebene Volumen ergibt eine Lösung mit einer Konzentration von 8,0 IE/ml.

**Hinweis: Das Rekonstitutionsvolumen des Kitstandards ist je nach Charge unterschiedlich!**

Verwenden Sie den rekonstituierten Kitstandard zur Herstellung einer 1:4-Verdünnungsserie von IFN- $\gamma$  in grüner Verdünnungslösung (GV) – siehe Abbildung 1. S1 (Standard 1) enthält 4 IE/ml, S2 (Standard 2) enthält 1 IE/ml, S3 (Standard 3) enthält 0,25 IE/ml und S4 (Standard 4) enthält 0 IE/ml (nur GV). Die Standards sollten mindestens doppelt getestet werden.

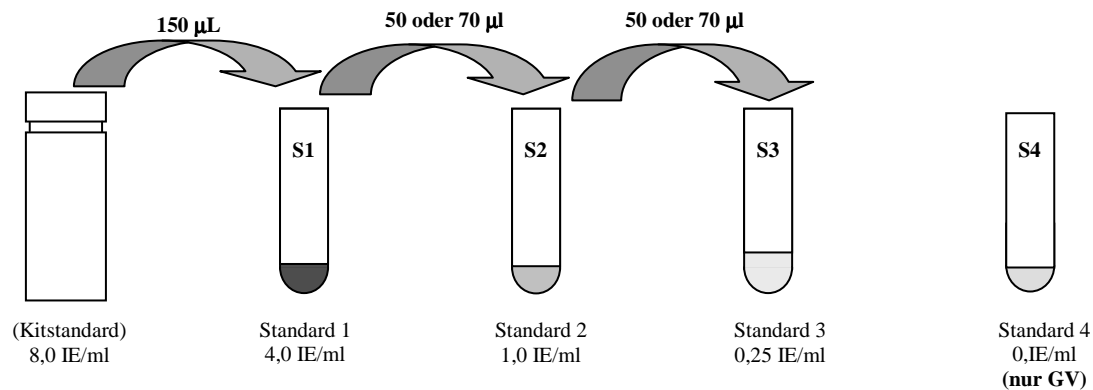
#### EMPFOHLENES VERFAHREN FÜR DOPPELSTANDARDS

- a. Beschriften Sie 4 Röhrchen mit „S1“, „S2“, „S3“ und „S4“.
- b. Geben Sie **150  $\mu\text{l}$**  GV in S1, S2, S3, S4.
- c. Geben Sie **150  $\mu\text{l}$**  Kitstandard in S1 und mischen Sie sorgfältig.
- d. Übertragen Sie **50  $\mu\text{l}$**  von S1 in S2 und mischen Sie sorgfältig.
- e. Übertragen Sie **50  $\mu\text{l}$**  von S2 in S3 und mischen Sie sorgfältig.
- f. „Nur GV“ dient als Nullstandard (S4).

#### EMPFOHLENES VERFAHREN FÜR DREIFACHSTANDARDS

- a. Beschriften Sie 4 Röhrchen mit „S1“, „S2“, „S3“ und „S4“.
- b. Geben Sie **150  $\mu\text{l}$**  GV in S1.
- c. Geben Sie **210  $\mu\text{l}$**  GV in S2, S3, S4.
- d. Geben Sie **150  $\mu\text{l}$**  Kitstandard in S1 und mischen Sie sorgfältig.
- e. Übertragen Sie **70  $\mu\text{l}$**  von S1 in S2 und mischen Sie sorgfältig.
- f. Übertragen Sie **70  $\mu\text{l}$**  von S2 in S3 und mischen Sie sorgfältig.
- g. „Nur GV“ dient als Nullstandard (S4).

**Abbildung 1. Erstellung der Standardkurve**



- Stellen Sie für jeden ELISA-Durchgang neue Verdünnungen des Kitstandards her.

4. Rekonstituieren Sie das lyophilisierte 100x Konjugatkonzentrat mit 0,3 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser. Mischen Sie das Fläschchen vorsichtig (Minimierung der Schaumbildung) und vergewissern Sie sich, dass der Inhalt vollständig aufgelöst ist.

Das gebrauchsfertige Konjugat wird hergestellt, indem Sie die erforderliche Menge des rekonstituierten 100x Konjugatkonzentrats in grüner Verdünnungslösung verdünnen wie in Tabelle 1 (Vorbereitung des Konjugats) gezeigt.

**TABELLE 1. Vorbereitung des Konjugats**

| Anzahl der Streifen | Menge an 100x Konjugatkonzentrat | Menge an grüner Verdünnungslösung |
|---------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 2                   | 10 µl                            | 1,0 ml                            |
| 3                   | 15 µl                            | 1,5 ml                            |
| 4                   | 20 µl                            | 2,0 ml                            |
| 5                   | 25 µl                            | 2,5 ml                            |
| 6                   | 30 µl                            | 3,0 ml                            |
| 7                   | 35 µl                            | 3,5 ml                            |
| 8                   | 40 µl                            | 4,0 ml                            |
| 9                   | 45 µl                            | 4,5 ml                            |
| 10                  | 50 µl                            | 5,0 ml                            |
| 11                  | 55 µl                            | 5,5 ml                            |
| 12                  | 60 µl                            | 6,0 ml                            |

- Gründlich, aber sorgfältig mischen; dabei Schaumbildung vermeiden.
  - Nicht benötigtes 100x Konjugatkonzentrat sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8 °C aufbewahren.
  - Zur Verdünnung nur die grüne Verdünnungslösung verwenden.
5. Vor dem Test ist das Plasma zu mischen, damit sich das IFN- $\gamma$  gleichmäßig in der Probe verteilt.
  6. Geben Sie je 50 µl des frisch zubereiteten gebrauchsfertigen Konjugats mit Hilfe einer Mehrkanalpipette in die jeweiligen ELISA-Vertiefungen.
  7. Geben Sie je 50 µl der Plasmaproben mit einer Mehrkanalpipette in die entsprechenden Vertiefungen (siehe empfohlener Plattenbelegungsplan, nachstehende Abbildungen 2A und 2B). Zuletzt geben Sie je 50 µl der Standards 1 bis 4 hinzu.

**Abbildung 2A. Empfohlene Plattenbelegung für Nullkontroll- und Tb-Antigenröhrchen (44 Tests pro Platte)**

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

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Probe 1, Nullkontrollplasma); 1A (Probe 1, Tb-Antigenplasma).

**Abbildung 2B. Empfohlene Plattenbelegung für Nullkontroll-, Tb-Antigen- und Mitogenröhrchen (28 Tests pro Platte)**

| Reihe | 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 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Probe 1, Nullkontrollplasma); 1A (Probe 1, Tb-Antigenplasma); 1M (Probe 1, Mitogenkontrollplasma).

- Mischen Sie Konjugat und Plasmaproben/Standards sorgfältig 1 Minute lang im Schüttler für Mikrotiterplatten.
- Decken Sie jede Platte mit einem Deckel ab und inkubieren Sie die Platten  $120 \pm 5$  Minuten lang bei Zimmertemperatur ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ).
  - Während der Inkubation sind die Platten vor direkter Sonneneinstrahlung zu schützen.
- Während der Inkubation verdünnen Sie ein Teil 20x Waschpufferkonzentrat mit 19 Teilen entionisierten oder destillierten Wassers und mischen dies sorgfältig. Im Lieferumfang befindet sich ausreichend 20x Waschpufferkonzentrat zur Herstellung von 2 Litern gebrauchsfertigem Waschpuffer.

Waschen Sie die Vertiefungen mindestens 6 Mal mit **400 µl** gebrauchsfertigem Waschpuffer. Wir empfehlen die Verwendung eines Waschautomaten für Mikrotiterplatten.

- Sorgfältiges Waschen ist für die Testleistung sehr wichtig. Prüfen Sie bei jedem Waschzyklus, dass alle Vertiefungen **vollständig bis oben mit Waschpuffer gefüllt** sind. Es empfiehlt sich, zwischen den Waschzyklen jeweils eine Einweichzeit von mindestens 5 Sekunden einzuhalten.
- In den Auffangbehälter für Abfallflüssigkeit sollte ein laborübliches Desinfektionsmittel gegeben werden. Befolgen Sie zudem die in Ihrem Labor geltenden Anweisungen zur Dekontamination potenziell infektiösen Materials.

11. Klopfen Sie die Platten mit den Vertiefungen nach unten auf ein Papiertuch, um verbleibenden Waschpuffer zu entfernen. Geben Sie dann 100 µl Enzymsubstratlösung in jede Vertiefung und mischen Sie die Platten in einem Schüttler.
12. Decken Sie jede Platte mit einem Deckel ab und inkubieren Sie sie 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ).
  - Während der Inkubation sind die Platten vor direkter Sonneneinstrahlung zu schützen.
13. Nach der 30-minütigen Inkubation geben Sie 50 µl Enzymstopplösung in jede Vertiefung und mischen dies.
  - Die Enzymstopplösung sollte in derselben Reihenfolge und etwa im gleichen Tempo in die Vertiefungen eingebracht werden wie das Substrat in Schritt 11.
14. Messen Sie die optische Dichte (OD) jeder Vertiefung innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe der Stopplösung mit Hilfe eines Lesegeräts für Mikrotiterplatten unter Verwendung eines 450-nm-Filters und eines 620 bis 650 nm-Referenzfilters. Die OD-Werte werden für die Berechnung der Ergebnisse benötigt.

## **7. BERECHNUNGEN UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

Cellestis hält für Sie eine QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT Analysesoftware für die Analyse der Rohdaten und Berechnung der Ergebnisse bereit.

Die Software führt eine Qualitätskontrollbeurteilung des Assays durch, erstellt die Standardkurve und liefert für jeden getesteten Patienten ein Ergebnis auf der Grundlage der nachstehend beschriebenen Interpretationsmethode.

Als Alternative zur Verwendung der QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT Analysesoftware können die Ergebnisse auch mit der nachstehend beschriebenen Methode ermittelt werden:

### **Erstellung der Standardkurve**

*(bei Nichtverwendung der QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT Software)*

Ermitteln Sie die mittleren OD-Werte der Kitstandard-Doppelbestimmungen auf jeder Platte.

Erstellen Sie eine  $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$  Standardkurve durch graphische Darstellung des  $\log_{(e)}$  des mittleren OD-Wertes (y-Achse) gegen den  $\log_{(e)}$  der IFN- $\gamma$ -Konzentration des Standards in IE/ml (x-Achse), wobei der Nullstandard bei dieser Berechnung ausgelassen wird. Berechnen Sie die Linie mit der besten Passform für die Standardkurve durch Regressionsanalyse.

Verwenden Sie die Standardkurve zur Ermittlung der IFN- $\gamma$ -Konzentration (IE/ml) für jede getestete Plasmaprobe unter Verwendung des OD-Wertes jeder Probe.

Für diese Berechnungen können Software-Pakete verwendet werden, die für Mikrotiterplatten-Lesegeräte angeboten werden, sowie Standard-Spreadsheet- oder -Statistik-Programme (wie z.B. Microsoft Excel). Wir empfehlen die Verwendung solcher Software-Pakete für die Berechnung der Regressionsanalyse, des Variationskoeffizienten (%VK) der Standards sowie des Korrelationskoeffizienten (r) für die Standardkurve.

## Qualitätskontrolle

Die Richtigkeit der Testergebnisse hängt von der Erstellung einer korrekten Standardkurve ab. Daher müssen die von den Standards abgeleiteten Ergebnisse geprüft werden, bevor die Testergebnisse interpretiert werden dürfen.

Der ELISA ist gültig, wenn alle nachstehenden Kriterien erfüllt sind:

- **Der mittlere OD-Wert von Standard 1 muss  $\geq 0,600$  liegen.**
- **Der VK in % der replizierten OD-Werte von Standard 1 und Standard 2 muss  $\leq 15\%$  betragen.**
- **Die replizierten OD-Werte von Standard 3 und Standard 4 dürfen nicht mehr als 0,040 OD-Einheiten vom jeweiligen Mittelwert abweichen.**
- **Der aus den mittleren Extinktionswerten der Standards errechnete Korrelationskoeffizient ( $r$ ) muss  $\geq 0,98$  betragen.**

Die QuantiFERON®-TB Gold IT Analysesoftware errechnet diese Qualitätskontrollparameter.

**Werden diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.**

- **Der mittlere OD-Wert des Nullstandards (grüne Verdünnungslösung) sollte  $\leq 0,150$  betragen. Liegt der mittlere OD-Wert  $> 0,150$ , so empfiehlt es sich, das Verfahren für das Waschen der Platten zu überprüfen.**

## Interpretation der Ergebnisse

Die QuantiFERON®-TB Gold IT Testergebnisse sind nach folgenden Kriterien zu interpretieren:

**HINWEIS:** Die Diagnose bzw. der Ausschluss einer Tb-Erkrankung sowie die Beurteilung der Wahrscheinlichkeit einer LTBI erfordert die Kombination der epidemiologischen, historischen, medizinischen und diagnostischen Ergebnisse; diese müssen bei der Interpretation der QuantiFERON®-TB Gold IT Testergebnisse in Betracht gezogen werden.

### **BEI VERWENDUNG VON NULLKONTROLL- UND Tb-ANTIGENRÖHRCHEN**

| <u>Null</u><br>[IE/ml] | <u>Tb-Antigen minus Null</u><br>[IE/ml]    | QuantiFERON®-TB<br>Gold IT Ergebnis | Bericht/Interpretation                                    |
|------------------------|--|-------------------------------------|---|
| ≤ 8,0                  | < 0,35                                     | <b>negativ</b>                      | <i>M. tuberculosis</i> -Infektion<br>NICHT wahrscheinlich |
|                        | ≥ 0,35 und < 25% des Nullkontr.-<br>Wertes |                                     |   |
|                        | ≥ 0,35 und ≥ 25% des Nullkontr.-<br>Wertes | <b>positiv</b> <sup>1</sup>         | <i>M. tuberculosis</i> -Infektion<br>wahrscheinlich       |
| > 8,0 <sup>2</sup>     | beliebig                                   | <b>unschlüssig</b> <sup>3</sup>     | Ergebnisse für Tb-<br>Antigenreaktion unschlüssig         |

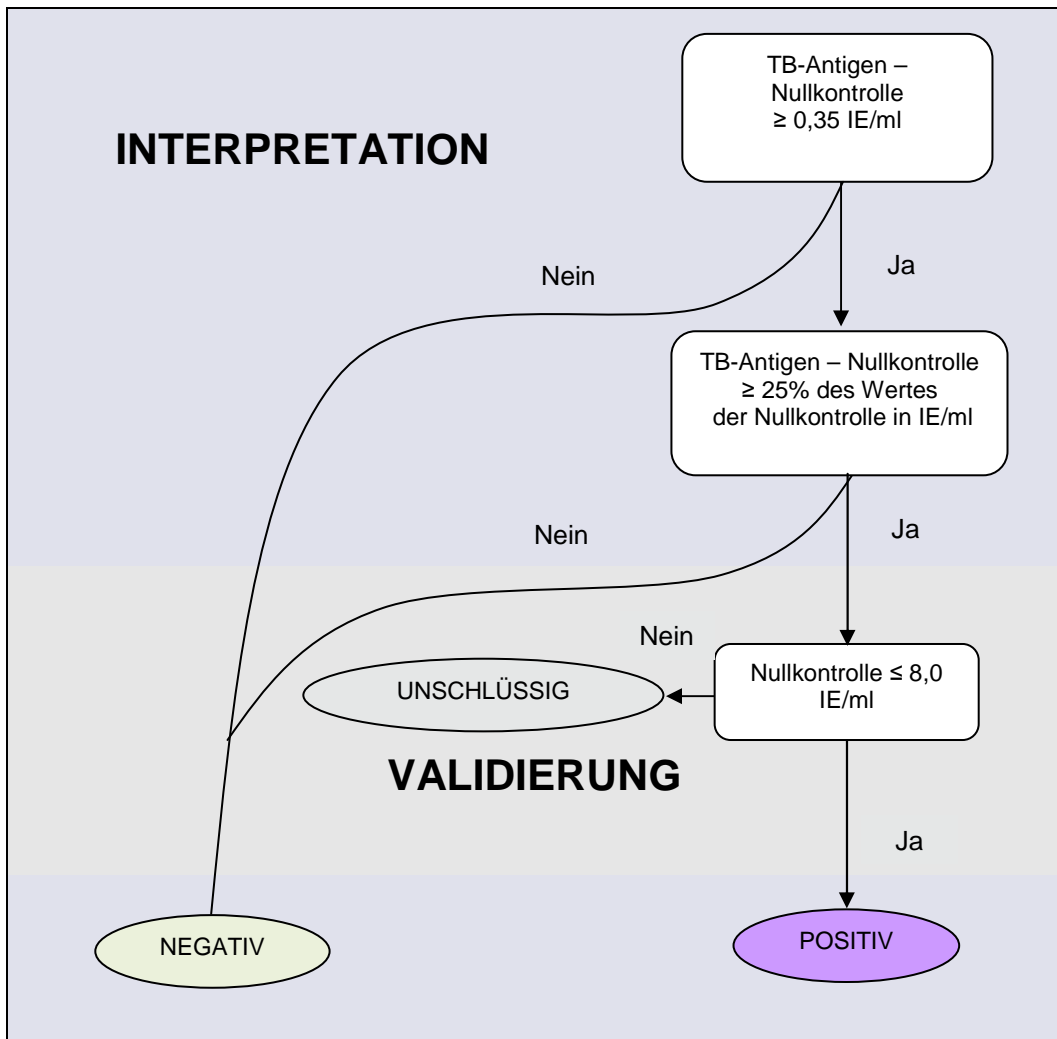
<sup>1</sup> In Fällen, in denen eine *M. tuberculosis*-Infektion nicht vermutet wird, können anfänglich positive Ergebnisse durch erneutes doppeltes Testen der Original-Plasmaproben im QuantiFERON®-TB Gold ELISA bestätigt werden. Ergibt die Testwiederholung bei der ersten oder zweiten Probe ein positives Ergebnis, so ist das Testergebnis als positiv zu bewerten.

<sup>2</sup> In klinischen Studien wiesen weniger als 0,25 % der Teilnehmer bei der Nullkontrolle eine IFN- $\gamma$ -Konzentration von > 8,0 IE/ml auf.

<sup>3</sup> Mögliche Ursachen siehe Kapitel Problembehebung.

Aus der Höhe der gemessenen IFN- $\gamma$ -Konzentration lassen sich keine Rückschlüsse auf das Stadium oder den Grad der Infektion, das Ausmaß der Immunreaktivität oder die Wahrscheinlichkeit einer Progression bei aktiver Erkrankung ziehen.

**Abbildung 3. FLUSSDIAGRAMM ZUR INTERPRETATION  
(BEI VERWENDUNG DER NULL- UND Tb-ANTIGEN-RÖHRCHEN)**



**BEI VERWENDUNG VON NULLKONTROLLRÖHRCHEN, Tb-ANTIGEN- UND MITOGENRÖHRCHEN:**

| <u>Null</u><br>[IE/ ml] | <u>Tb-Antigen minus Null</u><br>[IE/ml]   | <u>Mitogen minus Null</u> [IE/ ml] <sup>1</sup> | QuantiFERON®-Tb<br>Gold IT Ergebnis | Bericht/Interpretation                                    |
|-------------------------|---|---|-------------------------------------|---|
| ≤ 8,0                   | < 0,35                                    | ≥ 0,5   | <b>negativ</b>                      | <i>M. tuberculosis</i> -Infektion<br>NICHT wahrscheinlich |
|                         | ≥ 0,35 und < 25% des<br>Nullkontr.-Wertes | ≥ 0,5   |                                     |   |
|                         | ≥ 0,35 und ≥ 25% des<br>Nullkontr.-Wertes | beliebig  | <b>positiv<sup>2</sup></b>          | <i>M. tuberculosis</i> -Infektion<br>wahrscheinlich       |
|                         | < 0,35                                    | < 0,5   | <b>unschlüssig<sup>3</sup></b>      | Ergebnisse für Tb-<br>Antigenreaktion unschlüssig         |
|                         | ≥ 0,35 und < 25% des<br>Nullkontr.-Wertes | < 0,5   |                                     |   |
| > 8,0 <sup>4</sup>      | beliebig                                  | beliebig  |                                     |   |

<sup>1</sup> Die Reaktion der positiven Mitogenkontrolle (und gelegentlich auch des Tb-Antigens) liegt häufig außerhalb des Messbereichs des Lesegeräts für Mikrotiterplatten. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Testergebnisse.

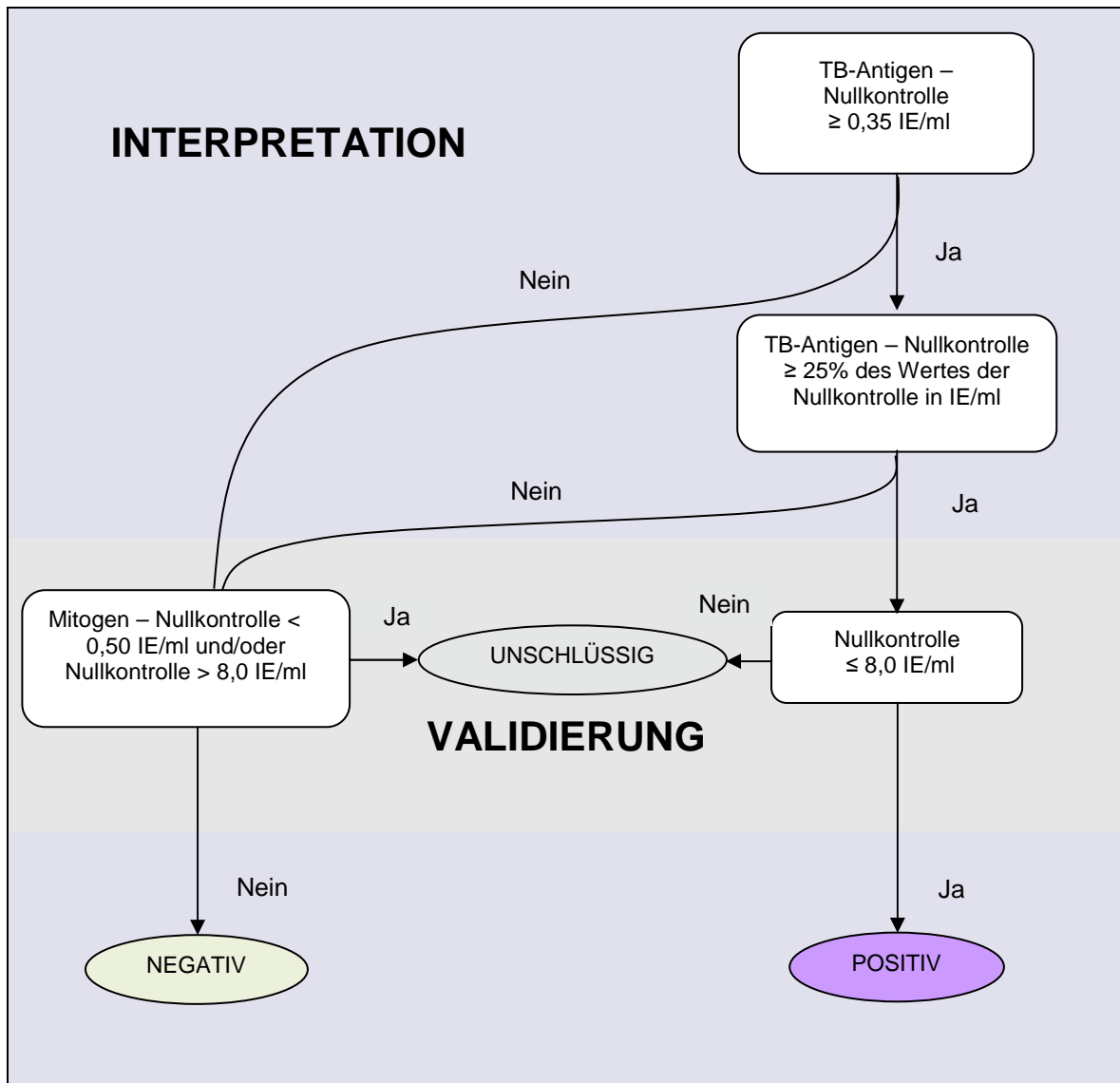
<sup>2</sup> In Fällen, in denen eine *M. tuberculosis*-Infektion nicht vermutet wird, können anfänglich positive Ergebnisse durch erneutes doppeltes Testen der Original-Plasmaproben im QuantiFERON®-TB Gold ELISA bestätigt werden. Ergibt die Testwiederholung bei der ersten oder zweiten Probe ein positives Ergebnis, so ist das Testergebnis als positiv zu bewerten.

<sup>3</sup> Mögliche Ursachen siehe Kapitel Problembehebung.

<sup>4</sup> In klinischen Studien wiesen weniger als 0,25 % der Teilnehmer bei der Nullkontrolle eine IFN- $\gamma$ -Konzentration von > 8,0 IE/ml auf.

Aus der Höhe der gemessenen IFN- $\gamma$ -Konzentration lassen sich keine Rückschlüsse auf das Stadium oder den Grad der Infektion, das Ausmaß der Immunreaktivität oder die Wahrscheinlichkeit einer Progression bei aktiver Erkrankung ziehen.

Abbildung 4: FLUSSDIAGRAMM ZUR INTERPRETATION (BEI VERWENDUNG VON NULLKONTROLLRÖHRCHEN, Tb-ANTIGEN- UND MITOGENRÖHRCHEN)



## 8. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Ergebnisse des QuantiFERON®-TB Gold IT Tests müssen in Kombination mit der epidemiologischen Historie jedes einzelnen Patienten, seinem derzeitigen Gesundheitszustand und sonstiger diagnostischer Untersuchungen betrachtet werden.

Ergebnisse mit einem Nullwert über 8 IE/ml sind als „unschlüssig“ zu bewerten, da eine um 25 % erhöhte Tb-Antigen-Reaktion außerhalb des Messbereichs des Assays liegen kann.

Unzuverlässige oder unschlüssige Ergebnisse können folgende Ursachen haben:

- Abweichungen von dem in der Packungsbeilage beschriebenen Verfahren
- extrem hohe Konzentrationen an zirkulierendem IFN- $\gamma$  oder Vorliegen heterophiler Antikörper
- Überschreitung der Frist von 16 Stunden zwischen Blutentnahme und Inkubation bei 37 °C

## 9. LEISTUNGSMERKMALE

### Klinische Studien

Da es für die latente Tuberkuloseinfektion (LTBI) keinen definitiven Standard gibt, kann eine Schätzung der Empfindlichkeit und Spezifität des QuantiFERON®-TB Gold IT Tests nicht praktisch ausgewertet werden. Die Spezifität des QuantiFERON®-TB Gold IT wurde durch Evaluierung der Rate falsch-positiver Ergebnisse bei Personen mit geringem Risiko (d.h. ohne bekannte Risikofaktoren) einer Tuberkulose-Infektion annähernd ermittelt. Die Empfindlichkeit wurde annähernd ermittelt durch Evaluierung von Patientengruppen mit aktiver Tb-Erkrankung, die durch eine Kultur bestätigt wurde.

#### Spezifität

In einer US-Studie mit 866 Teilnehmern wurde bei der Durchführung des TST eine Blutprobe für den QuantiFERON®-TB Gold IT Test entnommen. Die demographischen Angaben und Tb-Risikofaktoren wurden mit Hilfe einer Standardbefragung zum Zeitpunkt des Tests ermittelt. Von den 432 Teilnehmern ohne bekannte Risikofaktoren einer *M. tuberculosis*-Infektion lagen im Anschluss für 391 Personen QuantiFERON®-TB Gold IT- und TST-Ergebnisse vor. Keine dieser Personen waren mit BCG geimpft. Eine zweite Spezifitätsstudie mit dem QuantiFERON®-TB Gold IT Test wurde in Japan anhand von Teilnehmern mit geringem Risiko durchgeführt; etwa 90 % dieser Personen waren mit BCG geimpft. Die Ergebnisse beider Spezifitätsstudien sind in Tabelle 2 dargestellt.

**TABELLE 2. Spezifität des QuantiFERON®-TB Gold IT Tests: Ergebnisse von Teilnehmern ohne bekannte Risikofaktoren einer *M. tuberculosis*-Infektion.**

| STUDIE                           | BCG Status:<br>% Geimpfte | Anzahl<br>getestete<br>Personen | Anzahl<br>unschlüssiger<br>Ergebnisse im<br>QFT-G | Anzahl der<br>QFT-G-<br>Positiven /<br>Anzahl der<br>gültigen Tests | Spezifität<br>des QFT-G<br>(95% CI**) | Anzahl der<br>TST-<br>Positiven /<br>Anzahl der<br>Tests | Spezifität<br>des TST*<br>(95% CI**) |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---|---|---------------------------------------|--|--------------------------------------|
| USA<br>(unver-<br>öffentlicht)   | 0%                        | 391                             | 1   | 3/390   | 99,2%<br>(97,6-99,8)                  | 6/391  | 98,5%<br>(96,5-99,4)                 |
| Japan<br>(unver-<br>öffentlicht) | ~90%                      | 190                             | 4   | 3/186   | 98,4%<br>(95-99,6)                    | --   | --                                   |
| <b>TOTAL</b>                     |                           | <b>581</b>                      | <b>5/584<br/>(0,9%)</b>                           | <b>6/576</b>  | <b>99,0%</b>                          | <b>--</b>  | <b>--</b>                            |

\* unter Zugrundelegung eines TST-Grenzwerts von 10 mm. Bei Verwendung eines Grenzwertes von 15 mm beträgt die geschätzte TST-Spezifität 99,1%.

\*\* CI = Konfidenzintervall

## Empfindlichkeit für aktive Tb

Zur Ermittlung der Empfindlichkeit des QuantiFERON®-TB Gold IT Tests wurden Personen aus Australien und Japan mit Verdacht auf Tb getestet, deren *M. tuberculosis* –Infektion anschließend durch Kultur bestätigt wurde. Es gibt zwar für die latente Tuberkuloseinfektion (LTBI) keinen definitiven Standard, jedoch ist eine mikrobiologische Kultur von *M. tuberculosis* ein angemessener Ersatz, da erkrankte Personen per Definition infiziert sind. Die Patienten waren vor der Blutentnahme für den QuantiFERON®-TB Gold IT Test weniger als 8 Tage behandelt worden.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der zwei Gruppen von *M. tuberculosis*–kulturpositiven Patienten dargestellt. Die Gesamtempfindlichkeit des QuantiFERON®-TB Gold IT-Test für eine aktive Tb-Erkrankung betrug 89% (48/54).

**TABELLE 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Personen mit kulturbestätigter *M. tuberculosis*- Infektion.**

| STUDIE  |                | Erkrankung bestätigt durch | Anzahl der QFT-Gold-Positiven / Anzahl gültiger Tests | Empfindlichkeit des QFT-Gold (95% CI*) |
|---|----------------|----------------------------|---|--|
| Japanische Tb-Patienten/ Validierungsstudie   |                | Kultur                     | 24/27   | 89%<br>(72-96%)                        |
| Australische Tb-Patienten/ Validierungsstudie | pulmonal       | Kultur                     | 7/10  | 70%<br>(40-89%)                        |
|   | extra-pulmonal |                            | 17/17   | 100%<br>(82-100%)                      |
| <b>GESAMT</b>                                 |                |                            | <b>48/54</b>  | <b>89%</b><br><b>(78-95%)</b>          |

\*CI = Konfidenzintervall

## Diagnose der LTBI

Es wurden eine Reihe von Studien veröffentlicht, die die Leistung des QuantiFERON®-TB Gold IT bei verschiedenen LTBI-Risikopopulationen belegen. Die wichtigsten Daten einiger ausgewählter Studien sind in Tabelle 4 dargestellt.

**TABELLE 4. Ausgewählte veröffentlichte Studien zum Einsatz von QuantiFERON®-TB Gold IT bei LTBI-Risikopopulationen**

| STUDIE  | Getestete Personend | Ergebnisse  |
|---|---------------------|---|
| Med. Personal in Indien (Pai <i>et al</i> 2005) <sup>26</sup>     | 726                 | Umfeld mit sehr hoher Tb-Rate. 40% QFT-Gold IT-Positive bzw. 41% TST-Positive bei Grenzwert 10 mm. Hohe Konkordanz mit TST, kein Effekt von BCG auf die Tests. Beide Tests in Verbindung mit Risikofaktoren "Alter" und "Dauer der Beschäftigung im Gesundheitswesen".  |
| HIV-Positive in Dänemark (Brock <i>et al</i> 2006) <sup>5</sup>   | 590                 | Die Gesamtprävalenz der LTBI betrug im QFT-Gold IT 4,6% (27/590) bei HIV-Positiven. Die positiven Ergebnisse standen im Zusammenhang mit Tb-Risiken. Zwei QFT-Gold IT-positive Patienten entwickelten innerhalb eines Jahres eine aktive Tb. Unschlüssige Ergebnisse (n=20, 3,4 %) waren eng mit einer CD4-Zahl von <100 / µL verbunden.                |
| Stationär betreute Kinder (Dogra <i>et al</i> 2006) <sup>12</sup> | 105                 | Kinder mit Tb-Verdacht oder vorausgegangenem Tb-Kontakt wurden mit QFT-Gold IT und TST getestet. 10,5% QFT-Gold IT-Positive bzw. 9,5% TST-Positive bei Grenzwert 10mm. Übereinstimmung zwischen den Tests insgesamt 95,2% bzw. 100% bei Nicht-BCG-Geimpften.  |
| Deutsche mit Tb-Kontakt (Diel <i>et al</i> 2006) <sup>11</sup>    | 309                 | Die nahen Kontaktpersonen von 15 verschiedenen Indexfällen wurden getestet. 51% waren BCG-geimpft, 27 % im Ausland geboren. 70% der BCG-Geimpften und 18% der Nicht-Geimpften waren TST-positiv (5 mm) und 9% bzw. 11% waren QFT-Gold IT-positiv. QFT-Gold IT stand in Verbindung mit dem Tb-Risiko. TST stand nur im Zusammenhang mit der BCG-Impfung. |

Die Leistung der weniger empfindlichen Flüssigantigen-Version von QuantiFERON®-TB Gold (Vorläufertest von QuantiFERON®-TB Gold IT) und des QuantiFERON®-TB Gold IT-Tests sind in vielen weiteren Veröffentlichungen beschrieben. Diese Studien umfassen auch den Einsatz des Tests bei Kontaktpersonen von Patienten mit aktiver Tb<sup>9,11,19,25</sup>, Kindern<sup>6-10,23,25,28</sup>, HIV-Positiven<sup>2,5,20</sup>, medizinischem Personal<sup>13,26,32</sup>, Immunsupprimierten<sup>3,4,22,23,27,30,31</sup> sowie Personen mit Tb-Verdacht<sup>7,8,10,18</sup> und solche mit geringem Risiko<sup>15</sup>.

### **Wiederholbarkeit und Effekt des TST auf spätere QuantiFERON®-TB Gold IT Tests**

Im Rahmen der US-Spezifitätsstudie wurde eine Untergruppe der Teilnehmer 4 bis 5 Wochen nach dem ursprünglichen Test untersucht. Für 260 Teilnehmer lagen somit Ergebnisse aus dem QuantiFERON®-TB Gold IT Test und TST-Test von zwei Testzeitpunkten vor; die Übereinstimmung betrug 99,6% (259/260). Ein vorausgegangener TST führte nicht zu vermehrten positiven Ergebnissen im QuantiFERON®-TB Gold IT.

## **10. TECHNISCHE INFORMATIONEN**

### **Unschlüssige Ergebnisse**

Unschlüssige Ergebnisse sollten selten auftreten und können durch folgende technische Faktoren verursacht werden:

- Überschreitung der Frist von 16 Stunden zwischen Blutentnahme und Inkubation bei 37 °C
- Lagerung der Blutproben außerhalb des empfohlenen Temperaturbereichs ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ )
- ungenügendes Mischen der Blutentnahmeröhrchen
- ungenügendes Waschen der ELISA-Platte

Werden technische Probleme bei der Blutentnahme oder im Umgang mit den Blutproben vermutet, sollte der gesamte QuantiFERON®-TB Gold IT Test mit einer neuen Blutprobe wiederholt werden. Der ELISA-Test der stimulierten Plasmaproben kann wiederholt werden, wenn ungenügendes Waschen oder eine sonstige Abweichung von der vorgeschriebenen ELISA-Testmethode vermutet wird. Unschlüssige Ergebnisse, die auf niedrige Mitogen- oder hohe Nullwerte zurückzuführen sind, dürften sich bei der Testwiederholung nicht verändern, es sei denn, es kam beim ELISA-Test zu einem Fehler. Unschlüssige Ergebnisse sollten als solche weitergegeben werden. Der Arzt kann dann gegebenenfalls eine neue Blutprobe entnehmen oder je nach Bedarf sonstige Untersuchungen in Betracht ziehen.

### **Geronnene Plasmaproben**

Falls bei längerer Lagerung der Plasmaproben Fibringerinnsel auftreten, sind die Proben bis zur Sedimentbildung zu zentrifugieren; dies erleichtert das Pipettieren des Plasmas.

## ELISA-Problembhebung

### Unspezifische Farbreaktion

| MÖGLICHE URSACHE                          | LÖSUNG   |
|---|--|
| Ungenügendes Waschen der Platten          | Platte mindestens 6x mit 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen. Je nach verwendetem Waschgerät können auch mehr als 6 Waschzyklen nötig sein. Es empfiehlt sich, zwischen den Waschzyklen jeweils 5 Sekunden Einweichzeit einzuhalten. |
| Kreuzkontamination der ELISA-Vertiefungen | Sorgfältiges Pipettieren und Mischen der Proben minimiert das Risiko.  |
| Kit/Kitbestandteile abgelaufen            | Prüfen Sie, dass das Verfallsdatum des Kits noch nicht abgelaufen ist. Vergewissern Sie sich, dass der Standard und das 100x Konjugatkonzentrat innerhalb von 3 Monaten nach Rekonstitution verwendet werden.                              |
| Enzymsubstratlösung ist kontaminiert      | Entsorgen Sie das Substrat bei bläulicher Verfärbung. Vergewissern Sie sich, dass saubere Reagenzienreservoirs verwendet werden.   |

### Niedriger OD-Wert bei den Standards

| MÖGLICHE URSACHE                  | LÖSUNG  |
|-----------------------------------|---|
| Fehler bei der Standardverdünnung | Stellen Sie die Verdünnungen des Kitstandards genau nach Anweisungen in der Packungsbeilage her.  |
| Pipettierfehler                   | Prüfen Sie, dass die Pipetten genau nach Herstelleranweisung kalibriert und verwendet werden.   |
| Inkubationstemperatur zu niedrig  | Die Inkubation für den ELISA sollte bei Zimmertemperatur (17-27°C) erfolgen.  |
| Inkubationszeit zu kurz           | Die Inkubationszeit der Platte mit Konjugat, Standards und Proben sollte 120 ± 5 Minuten betragen. Die Enzymsubstratlösung wird auf der Platte 30 Minuten lang inkubiert.                                     |
| Falscher Plattenfilter            | Die Platte sollte bei 450 nm mit einem Referenzfilter von 620-650 nm abgelesen werden.  |
| Reagenzien zu kalt                | Alle Reagenzien (mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats) müssen vor Testbeginn Zimmertemperatur erreicht haben. Dies dauert ca. 60 Minuten.  |
| Kit/Kitbestandteile abgelaufen    | Prüfen Sie, dass das Verfallsdatum des Kits noch nicht abgelaufen ist. Vergewissern Sie sich, dass der Standard und das 100x Konjugatkonzentrat innerhalb von 3 Monaten nach Rekonstitution verwendet werden. |

Starke Hintergrundfärbung

| <b>MÖGLICHE URSACHE</b>              | <b>LÖSUNG</b>  |
|--------------------------------------|--|
| Ungenügendes Waschen der Platten     | Platte mindestens 6x mit 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen. Je nach verwendetem Waschgerät können auch mehr als 6 Waschzyklen nötig sein. Es empfiehlt sich, zwischen den Waschzyklen jeweils 5 Sekunden Einweichzeit einzuhalten. |
| Inkubationstemperatur zu hoch        | Die Inkubation für den ELISA sollte bei Zimmertemperatur (17-27°C) erfolgen.   |
| Kit/Kitbestandteile abgelaufen       | Prüfen Sie, dass das Verfallsdatum des Kits noch nicht abgelaufen ist. Vergewissern Sie sich, dass der Standard und das 100x Konjugatkonzentrat innerhalb von 3 Monaten nach Rekonstitution verwendet werden.                              |
| Enzymsubstratlösung ist kontaminiert | Entsorgen Sie das Substrat bei bläulicher Verfärbung. Vergewissern Sie sich, dass saubere Reagenzienreservoirs verwendet werden.   |

Nicht-lineare Standardkurve und Abweichungen zwischen den beiden Doppelproben

| <b>MÖGLICHE URSACHE</b>  | <b>LÖSUNG</b>  |
|--|--|
| Ungenügendes Waschen der Platten                                   | Platte mindestens 6x mit 400 µl Waschpuffer pro Vertiefung waschen. Je nach verwendetem Waschgerät können auch mehr als 6 Waschzyklen nötig sein. Es empfiehlt sich, zwischen den Waschzyklen jeweils 5 Sekunden Einweichzeit einzuhalten. |
| Fehler bei der Standardverdünnung                                  | Stellen Sie die Verdünnungen des Kitstandards genau nach Anweisungen in der Packungsbeilage her.   |
| Ungenügendes Mischen   | Mischen Sie die Reagenzien sorgfältig durch mehrmaliges Umkehren oder leichtes Vortexen, bevor Sie sie in die Vertiefungen dispensieren.   |
| Ungleichmäßige Pipettiertechnik oder Unterbrechung beim Testaufbau | Das Dispensieren der Proben und der Standards sollte kontinuierlich erfolgen. Alle Reagenzien müssen vor Testbeginn gebrauchsfertig zubereitet werden.   |

Ein Video, das das Testverfahren demonstriert, sowie die Lösung der meisten technischen Probleme finden Sie auf der CD-ROM mit den Produktinformationen und technischen Anleitungen. Sie erhalten die CD-ROM direkt bei Cellestis oder durch Ihren Lieferanten.

## 11. BIBLIOGRAPHIE

A comprehensive list of QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold references is located on the Cellestis website ([www.cellestis.com](http://www.cellestis.com))

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.* 2008. [Epub ahead of print].
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. [Epub ahead of print].
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; 322-8.
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.* 2008. [Epub ahead of print].
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- $\gamma$  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, I., 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.* 2008. [Epub ahead of print].
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 army 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.



### 13. TESTVERFAHREN (KURZFORM)

#### 1. SCHRITT: BLUTPROBE INKUBIEREN

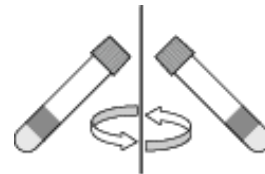
1. Die Patientenblutprobe mit Hilfe der Blutentnahmeröhrchen entnehmen und durch **5 Sekunden langes kräftiges Schütteln** (oder 10x Schütteln) gründlich mischen. Die **gesamte Innenwand des Röhrchens** muss mit Blut bedeckt sein.



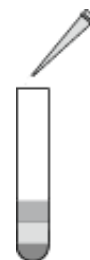
2. Die Röhrchen **stehend** 16 - 24 Stunden bei 37°C inkubieren.



3. Nach der Inkubation die Röhrchen 5 - 15 Minuten bei 1500 - 2200g (RCF) zentrifugieren, um das Plasma von den roten Blutzellen zu trennen.

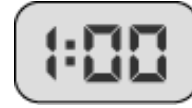


4. Nach dem Zentrifugieren aus jedem Röhrchen die Plasmaprobe zur IFN- $\gamma$ -Quantifizierung entnehmen.



## 2. SCHRITT: DER IFN- $\gamma$ -ELISA

1. Die ELISA-Bestandteile (außer dem 100fach konzentrierten Konjugatkonzentrat) mindestens 60 Minuten lang bei Zimmertemperatur stabilisieren lassen.

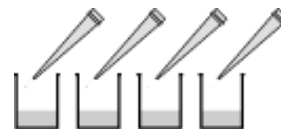


2. Den rekombinanten Human-IFN- $\gamma$ -Standard mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf 8,0 IE/ ml rekonstituieren. 4 Standardverdünnungen herstellen.

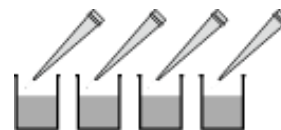


3. Das lyophilisierte 100fach konzentrierte Konjugatkonzentrat mit destilliertem oder entionisiertem Wasser rekonstituieren.

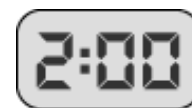
4. Das Konjugat mit grüner Verdünnungslösung herstellen und je 50  $\mu$ l in alle Vertiefungen geben.



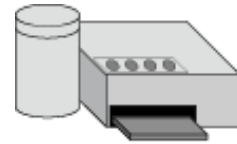
5. Je 50  $\mu$ l der Plasmaproben und 50  $\mu$ l der Standards in die entsprechenden Vertiefungen geben. Im Schüttler mischen.



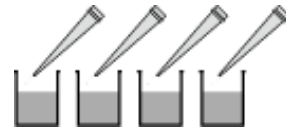
6. 120 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren.



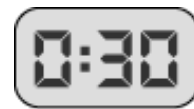
7. Die Vertiefungen mindestens 6 x 400  $\mu$ l Waschpuffer pro Vertiefung waschen.



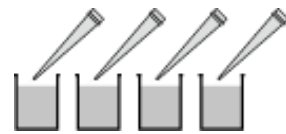
8. Je 100  $\mu$ l Enzymsubstratlösung in alle Vertiefungen geben.



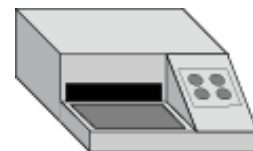
9. 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren.



10. Je 50  $\mu$ l Stopplösung in alle Vertiefungen geben. Mit Hilfe des Schüttlers mischen.



11. Ergebnisse bei 450 nm mit einem 620-650 nm-Referenzfilter messen.



12. Ergebnisse analysieren.





Hergestellt für:

Cellestis Limited (Australien) und Cellestis GmbH (Europa)  
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australien  
Tel. (Australien) +61 3 9571 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0  
E-Mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)  
Website: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Dok.-Nr. 05990301C  
August 2009

|    |     |
|----|-----|
| EC | REP |
|----|-----|

Autorisierter Vertreter:  
MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover  
Germany

