

# **QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold**

***(In tube-metode)***

**IFN-gamma-test i fuldblod  
til måling af reaktioner på  
ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4)-peptidantigener**

**INDLÆGS-  
SEDDER**

Til *in vitro*-diagnostisk brug



## INDHOLDSFORTEGNELSE

1. TILSIGTET ANVENDELSE	2
2. OVERSIGT OVER OG FORKLARING TIL TESTEN	2
Principper for analysen	3
Påkrævet tidsforbrug til analysen	3
3. REAGENSER OG OPBEVARING	4
Påkrævede materialer (medfølger ikke)	4
Opbevaring	5
Blodtagningsrør	5
Kit-reagenser	5
Rekonstituerede og ubrugte reagenser	5
4. ADVARSLER OG FORSİGTIGHEDSREGLER	6
Advarsler	6
Forsigtighedsregler	7
5. PRØVETAGNING OG -BEHANDLING	8
6. ANVISNINGER FOR BRUG	9
TRIN 1 – Inkubation af blod og opsamling af plasma	9
TRIN 2 – ELISA for human IFN- $\gamma$	10
7. BEREGNINGER OG TOLKNING AF TESTEN	13
Oprettelse af standardkurve	13
Kvalitetskontrol af testen	14
Tolkning af resultater	15
8. BEGRÆNSNINGER	19
9. YDEEVNE-KARAKTERISTIK	19
10. TEKNISKE OPLYSNINGER	21
Inkonklusive resultater	21
Plasmaprøver med klumper	21
Fejlfinding af ELISA	22
Uspecifik farveudvikling	22
Lave tal for optisk densitet i standardmålinger	22
Høj baggrund	23
Ikke-lineær standardkurve og variabilitet mellem dobbeltbestemmelser	23
11. LITTERATURLISTE	24
12. TEKNISK SERVICE	25
13. OPSUMMERING AF TESTPROCEDURE	26

## 1. TILSIGTET ANVENDELSE

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) er en *in vitro*-diagnostisk test, der anvender en peptid-cocktail, som simulerer ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4)-proteiner, til stimulering af celler i hepariniseret fuldblod. Påvisning af interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) vha. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) anvendes til at identificere *in vitro*-reaktioner på de peptidantigener, der er associeret med *Mycobacterium tuberculosis*-infektion.

QuantiFERON®-TB Gold IT er en indirekte test for *M. tuberculosis*-infektion (inklusive sygdomsudbrud) og er tilsigtet til brug sammen med risikovurdering, radiografi og andre lægelige og diagnostiske vurderinger.

## 2. OVERSIGT OVER OG FORKLARING AF TESTEN

Tuberkulose er en smitsom sygdom, der skyldes infektion med organismer fra *M. tuberculosis*-komplekset (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). De spreder sig typisk til nye værter via luftbårne dråbekerner fra patienter med lungetuberkulose. En nyligt smittet person kan udvikle tuberkuløs sygdom inden for uger til måneder, men de fleste smittede forbliver raske. Latent tuberkuloseinfektion (LTBI), en ikke-smitsom symptomløs tilstand, kan vedvare hos nogle personer, som så kan udvikle tuberkulose måneder eller år senere. Hovedformålet med at diagnosticere LTBI er at overveje medicinsk behandling til forebyggelse af tuberkuløs sygdom. Hidtil har tuberkulin-hudtesten (TST) været den eneste metode til diagnosticering af LTBI. Kutan følsomhed over for tuberkulin udvikles 2 til 10 uger efter smitte. Nogle smittede, herunder personer med en lang række tilstande, der hæmmer immunfunktionen, men også personer uden disse tilstande, reagerer imidlertid ikke på tuberkulin. Omvendt udviser nogle personer, som med stor sandsynlighed ikke er smittet med *M. tuberculosis*, følsomhed over for tuberkulin og har positive TST-resultater efter vaccination med bacillus Calmette-Guérin (BCG), efter smitte med andre mykobakterier end *M. tuberculosis*-komplekset eller pga. andre uvisse faktorer.

Der bør skelnes mellem LTBI og tuberkulose. Sidstnævnte er en anmeldelsespligtig sygdom, der normalt rammer lungerne og de nedre luftveje, men også kan ramme andre organsystemer. Tuberkulose diagnosticeres ud fra anamnetiske, fysiske, radiologiske, histologiske og mykobakteriologiske fund.

QuantiFERON®-TB Gold IT-testen er en test for Cell Mediated Immune (CMI)-reaktioner på peptidantigener, der simulerer mykobakterieproteiner. Disse proteiner - ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4) - forekommer ikke i BCG-stammer eller i de fleste non-tuberkuløse mykobakterier med undtagelse af *M. kansasii*, *M. szulgai* og *M. marinum*.<sup>1</sup> Personer smittet med organismer fra *M. tuberculosis*-komplekset har normalt lymfocytter i blodet, der genkender disse og andre mykobakterie-antigener. Denne genkendelsesproces involverer dannelse og udskillelse af cytokinet IFN- $\gamma$ . Påvisning og efterfølgende kvantificering af IFN- $\gamma$  er grundlaget for denne test.

Antigenerne anvendt i QuantiFERON®-TB Gold IT er en peptid-cocktail, der simulerer proteinerne ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4). Det er påvist i talrige studier, at disse peptidantigener stimulerer IFN- $\gamma$ -reaktioner i T-celler hos personer, der er smittet med *M. tuberculosis*, men generelt ikke hos ikke-smittede eller BCG-vaccinerede personer uden sygdom eller risiko for LTBI.<sup>1-32</sup> Dog kan medicinske behandlinger eller tilstande, der hæmmer immunfunktionen, potentielt reducere IFN- $\gamma$ -reaktioner. Patienter med visse andre mykobakterielle infektioner kan også reagere på ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4), da de gener, der koder for disse proteiner, også findes i *M. kansasii*, *M. szulgai* og *M. marinum*.<sup>1,23</sup> QuantiFERON®-TB Gold IT-testen er både en test for LTBI og et hjælpemiddel til diagnosticering af infektion med *M. tuberculosis*-kompleks hos syge patienter. Et positivt resultat understøtter diagnosen tuberkuløs sygdom. Infektioner med andre mykobakterier (fx *M. kansasii*) kan dog også føre til et positivt resultat. Derfor er andre lægefaglige og diagnostiske vurderinger påkrævet for at bekræfte eller udelukke tuberkuløs sygdom.

## **Principper for analysen**

QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT-systemet anvender særlige blodtagningsrør til udtagning af fuldblod. Blodet inkuberes i rørene i 16 til 24 timer, hvorefter plasma opsamles og testes for tilstedeværelse af IFN- $\gamma$  dannet som reaktion på peptidantigenerne.

QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT-testen foretages i to trin. I første trin udtages fuldblod i hvert af QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold-blodtagningsrørene, som omfatter et Nil-rør (negativ kontrol), et TB-antigen-rør og et mitogen-rør. Sidstnævnte er valgfrit.

Mitogen-røret kan anvendes som positiv kontrol i QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT-testen. Dette kan være særligt berettiget, hvis der er tvivl om personens immunstatus. Mitogen-røret kan også tjene som kontrol for korrekt håndtering og inkubering af blodet.

Rørene skal inkuberes ved 37°C hurtigst muligt og inden for 16 timer efter blodprøvetagning. Efter 16 til 24 timers inkubation centrifugeres rørene, plasma fjernes, og mængden af IFN- $\gamma$  (IU/mL) måles med ELISA.

En test anses for positiv, hvis den har en IFN- $\gamma$ -reaktion på TB-antigen-røret, der ligger signifikant over Nil IFN- $\gamma$  IU/mL-værdien. Hvis den mitogen-stimulerede plasmaprøve anvendes, tjener den som en IFN- $\gamma$ -positiv kontrol for hver testet prøve. En lav reaktion på mitogen (<0,5 IU/mL) indikerer et inkonklusivt resultat, når en blodprøve også har negativ reaktion på TB-antigenerne. Dette mønster kan forekomme ved et utilstrækkeligt antal lymfocytter, nedsat lymfocytaktivitet grundet ukorrekt prøvehåndtering, ukorrekt fyldning/blanding af mitogen-røret eller manglende evne hos patientens lymfocytter til at danne IFN- $\gamma$ . Nil-prøven korrigerer for baggrund, heterofile antistofvirkninger<sup>7</sup> eller non-specifik IFN- $\gamma$  i blodprøver. IFN- $\gamma$ -niveauet i Nil-røret trækkes fra IFN- $\gamma$ -niveauet i TB-antigen-røret og mitogen-røret (hvis et sådant anvendes).

## **Påkrævet tidsforbrug til analysen**

Det påkrævede tidsforbrug til udførelse af QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT-analysen er anslået nedenfor. Tidsforbruget til analyse af flere prøver som batch er ligeledes angivet.

Inkubation af blodtagningsrør ved 37°C:	16 til 24 timer
ELISA:	Ca. 3 timer for én ELISA-plade (28 til 44 personer)
	<ul style="list-style-type: none"><li>• &lt;1 times arbejde</li><li>• Yderligere 10 til 15 minutter for hver ekstra plade</li></ul>

### 3. REAGENSER OG OPBEVARING

#### Blodtagningsrør med tuberkuloseantigen og kontroller

##### Katalognummer 0590 0301

- |                                              |         |
|----------------------------------------------|---------|
| 1. Nil-kontrol (negativ kontrol) (grå hætte) | 100 rør |
| 2. TB-antigen (rød hætte)                    | 100 rør |
| 3. Mitogen-kontrol (lilla hætte)             | 100 rør |

*BEMÆRK: Andre rørkombinationer kan også fås:*

*Kat. nr. 0590-0201: 100 Nil-kontrolrør, 100 TB-antigen-rør*

*Kat. nr. 0593 0201: 100 mitogen-kontrolrør*

**Rør til brug i stor højde (High Altitude) (se afsnit 5)**

*Kat. nr. 0590 0501: (High Altitude) 100 Nil-kontrolrør, 100 TB-antigen-rør*

*Kat. nr. 0590 0505: (High Altitude) 100 Nil-kontrolrør, 100 TB-antigen-rør og 100 mitogen-kontrolrør*

*Kat. nr. T0593 0501 (High Altitude) 100 mitogen-kontrolrør*

#### Komponenter til ELISA

##### Katalognummer 0594 0201

- |                                               |               |
|-----------------------------------------------|---------------|
| 1. Mikroplade-strips                          | 24 x 8 brønde |
| 2. Human IFN- $\gamma$ -standard, frysetørret | 1 x hætteglas |
| 3. Grøn diluent                               | 1 x 30mL      |
| 4. Konjugat 100X-koncentrat, frysetørret      | 1 x 0,3mL     |
| 5. Vaskebuffer 20X-koncentrat                 | 1 x 100mL     |
| 6. Enzym-substratopløsning                    | 1 x 30mL      |
| 7. Enzym-stopopløsning                        | 1 x 15mL      |

#### Påkrævede materialer (medfølger ikke)

- 37°C-varmeskab. CO<sub>2</sub> ikke påkrævet.
- Kalibrerede pipetter med variabel volumen til pipettering af 10 $\mu$ L til 1000 $\mu$ L med engangsspidser.
- Kalibreret flerkanalspipette til pipettering af 50 $\mu$ L og 100 $\mu$ L med engangsspidser.
- Mikropladeryster.
- Demineraliseret eller destilleret vand, 2L.
- Mikropladevaskemaskine (automatisk vaskemaskine anbefales).
- Mikropladelæser monteret med 450nm filter og 620nm til 650nm referencefilter.

## **Opbevaring**

### *Blodtagningsrør*

- Opbevar blodtagningsrørene ved 4°C til 25°C.
- QuantiFERON®-TB Gold-blodtagningsrørene er holdbare i 15 måneder fra fremstillingsdatoen ved opbevaring ved 4°C til 25°C.

### *Kit-reagenser*

- Opbevar kittet ved 2°C til 8°C.
- Enzym-substratopløsningen skal beskyttes mod direkte sollys.
- QuantiFERON®-TB Gold IT-ELISA-kittet er holdbart i 3 år fra fremstillingsdatoen ved opbevaring ved 2°C til 8°C.

### *Rekonstituerede og ubrugte reagenser*

Se afsnit 6 vedrørende anvisninger for rekonstituering af reagenserne (side 11).

- Den rekonstituerede kit-standard kan opbevares i op til 3 måneder ved 2°C til 8°C.
  - *Notér datoen for rekonstituering af kit-standard.*
- Efter rekonstituering skal ubrugt konjugat 100X-koncentrat igen opbevares ved 2°C til 8°C og anvendes inden for 3 måneder.
  - *Notér datoen for rekonstituering af konjugatet.*
- Konjugat af brugsstyrke skal anvendes inden for 6 timer efter tilberedning.
- Vaskebuffer af brugsstyrke kan opbevares ved rumtemperatur i op til 2 uger.

## 4. ADVARSLER OG FORSIGTIGHEDSREGLER

### Advarsler

- Et negativt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat udelukker ikke muligheden for *M. tuberculosis* – infektion eller tuberkulose: falske negative resultater kan skyldes smittestadie (fx blodprøvetagning før udvikling af cellulær immunreaktion), komorbide tilstande, som påvirker immunfunktionerne, ukorrekt håndtering af blodtagningsrørene efter venepunktur, ukorrekt udførelse af analysen eller andre immunologiske variabler.
- Et positivt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat bør ikke udgøre det eneste eller definitive grundlag for konstatering af smitte med *M. tuberculosis*. Ukorrekt udførelse af analysen kan give falske positive resultater.
- Et positivt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat bør følges af yderligere lægelig vurdering og diagnostisk evaluering i forhold til aktiv tuberkulose (fx AFB-udstrygning og -dyrkning, røntgen af thorax).
- Selvom ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4) ikke findes i BCG-stammer eller i de fleste kendte non-tuberkuløse mykobakterier, er det muligt, at et positivt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat kan skyldes smitte med *M. kansasii*, *M. szulgai* eller *M. marinum*. Ved mistanke om sådanne infektioner bør der anvendes alternative test.

## Forsigtighedsregler

- **Til *in vitro*-diagnostisk brug.**
- **Sundhedsskadelig: Enzym-substratopløsning** indeholder 3,3',5,5' tetramethylbenzidin, som er sundhedsskadeligt ved indtagelse, indånding og kontakt med huden. Irriterer huden og øjnene. Mutagen. Benyt øjenværn og handsker. Skal håndteres som et potentielt kræftfremkaldende stof.
- **Sundhedsskadelig: Enzym-stopopløsning** indeholder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, som er sundhedsskadeligt ved indtagelse, indånding og kontakt med øjnene eller huden. Brug øjenværn, handsker og almindelig beskyttelsesbeklædning. Hvis stopopløsningen kommer på huden eller i øjnene, skylles straks med rigelige mængder vand. Søg derefter læge.
- **Sundhedsskadelig: IFN- $\gamma$ -standard og konjugat 100X-koncentrat** kan give ubehag ved indtagelse og kan irritere huden. Brug handsker og almindelige beskyttelsesbeklædning.
- **Humant blod skal håndteres som potentielt smittefarligt.** Overhold alle relevante forskrifter for håndtering af blod.
- **Thimerosal** anvendes som konserveringsmiddel i nogle reagenser. Det kan være giftigt ved indtagelse, indånding eller kontakt med huden.
- **Grøn diluent** indeholder normalt murint serum samt kasein, som kan give allergiske reaktioner. Undgå kontakt med huden.
- Afvigelse fra anvisningerne i indlægssedlen kan give fejlagtige resultater. Læs anvisningerne grundigt før brug.
- Undlad at benytte kittet, hvis en eller flere reagensflasker har tegn på skader eller lækager før brug.
- Undlad at blande eller bruge ELISA-reagenser fra andre batches af QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold-kittet.
- Bortskaf ubrugte reagenser og biologiske prøver iht. lokale og nationale regler.
- Anvend ikke blodtagingsrørene eller ELISA-kittet efter udløbsdatoen.

## 5. PRØVETAGNING OG -BEHANDLING

### Blodprøvetagning

QuantiFERON®-TB Gold IT Test anvender følgende blodtagningsrør:

1. Nil-kontrol (grå hætte med hvid ring) (til højder op til 810 meter over havet)
2. TB-specifikke antigener (rød hætte med hvid ring) (til højder op til 810 meter over havet)
3. Mitogen-kontrol – valgfri (lilla hætte med hvid ring) (til højder op til 810 meter over havet)
4. Nil-kontrol (grå hætte med gul ring) (til højder mellem 1.020 og 1.875 meter over havet)
5. Tb-antigen (rød hætte med gul ring) (til højder mellem 1.020 og 1.875 meter over havet)
6. Mitogen-kontrol – valgfri (lilla hætte med gul ring) (til højder mellem 1.020 og 1.875 meter over havet)

Antigenerne er coatet fast på indersiden af blodtagningsrørene, så det er yderst vigtigt, at indholdet i rørene blandes grundigt med blodet. Rørene overføres til et 37°C-varmeskab hurtigst muligt og inden for 16 timer efter prøvetagning.

Nedenstående procedure bør følges for at sikre optimale resultater:

1. For hver person udtages 1 ml blod vha. venepunktur direkte ned i hvert af QuantiFERON®-TB Gold IT-blodtagningsrørene.

- QuantiFERON® standard-blodtagningsrørene bør benyttes ved højder op til 810 m over havet. De specielle QuantiFERON®-blodtagningsrør bør benyttes ved højder over 1020m over havet.

*Når QuantiFERON®-blodtagningsrør anvendes uden for de nævnte højdeområder eller til små prøvevolumener, kan blodet også udtages med en sprøjte; så fyldes 1 ml blod i hvert af de tre rør. Af sikkerhedsmæssige årsager er det bedst at fjerne nålen; overhold i den forbindelse de almindelige forsigtighedsforanstaltninger. Tag hættene af de tre QFT-Gold IT-rør og kom 1 ml blod i hvert rør (op til den sorte markering på siden af etiketten). Sæt hættene på igen, og bland som beskrevet nedenfor.*

- Da 1 ml-rør udtager blod relativt langsomt, skal røret holdes på nålen i yderligere 2-3 sekunder, efter at røret synes fuldstændig fyldt. Dermed sikres det, at den korrekte mængde blod er blevet udtaget.

*Den sorte markering på siden af røret angiver en påfyldningsvolumen på 1 ml. QuantiFERON®-TB Gold-blodtagningsrørene er blevet valideret til volumener fra 0,8 til 1,2 ml. Hvis niveauet af blod i et rør ikke når op til markeringslinjen, anbefales udtagning af en ny blodprøve.*

- Ved anvendelse af en butterfly-nål til blodprøvetagning bør der først udtages blod i et andet rør for at sikre, at slangen er fyldt med blod, før QuantiFERON®-TB Gold-rørene anvendes.

2. Bland rørene ved at **ryste dem kraftigt i 5 sekunder** (eller 10 gange) for at sikre, at **hele rørets inderside** er blevet belagt med blod.

- Grundig blanding er påkrævet for at sikre komplet sammenblanding af rørets indhold og blodet.
- Skumdannelse kan forventes under rystningen, men dette påvirker ikke analysens ydeevne og bør ikke give anledning til bekymring.

3. Mærk rørene på passende måde.

4. Rørene skal overføres til et 37°C-varmeskab hurtigst muligt og inden for 16 timer efter prøvetagning. Blodprøverne må ikke sættes i køleskab eller fryser.

## 6. ANVISNINGER FOR BRUG

### TRIN 1 – Inkubation af blod og opsamling af plasma

#### Leverede materialer

QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold IT-blodtagningsrør (se afsnit 3)

#### Påkrævede materialer (medfølger ikke)

Se afsnit 3.

#### Procedure

1. Hvis blodet ikke inkuberes umiddelbart efter prøvetagning, **skal blanding af rørene gentages umiddelbart før inkubering**, som beskrevet i afsnit 5.
2. Inkuber rørene **I OPRETSTÅENDE STILLING** ved 37°C i 16 til 24 timer. Varmeskabet kræver ikke CO<sub>2</sub> eller befugtning.
3. Efter inkubation ved 37°C kan blodtagningsrørene opbevares ved 2°C til 27°C i op til 3 dage før centrifugering.
4. Efter inkubation ved 37°C centrifugeres rørene i 15 minutter ved 2000 til 3000 RCF (g). Dette letter opsamlingen af plasma. Gelproppen vil separere blodlegemerne fra plasmaet. Hvis dette ikke sker, bør rørene centrifugeres igen ved højere hastighed.
  - Plasma kan opsamles uden centrifugering. Dog kræver det særlig forsigtighed at fjerne plasmaet uden at forstyrre blodlegemerne.
5. Plasmaprøverne kan overføres direkte fra blodtagningsrørene til QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold ELISA-pladen, især når der anvendes automatiske ELISA-arbejdsstationer.
6. Alternativt kan plasmaprøverne opbevares før ELISA, enten i de centrifugerede rør eller i plasmaopbevaringsbeholdere. Eksempelvis kan >150µL plasma overføres til mikropladebrønde eller mikrorør i et stativ med 96 brønde-format og derefter forsegles for at hindre spild eller fordampning under opbevaring.
  - Plasmaprøverne kan opbevares i op til 4 uger ved 2°C til 8°C. Hvis længere opbevaring ønskes, kan de nedfryses til -20°C (højest -70°C).

## Trin 2 – ELISA af human IFN- $\gamma$

### Leverede materialer

QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold ELISA-kit (se afsnit 3)

### Påkrævede materialer (medfølger ikke)

Se afsnit 3.

### Procedure

1. Alle plasmaprøver og reagenser, undtagen konjugat 100X-koncentrat, skal have rumtemperatur (22°C  $\pm$  5°C) før brug. Vent mindst 60 minutter, til temperaturen er udlignet.
2. Fjern de strips, der ikke er påkrævet, fra rammen, forsegl dem i folieposen, og opbevar dem i køleskab, indtil de skal bruges.

Benyt mindst 1 strip til QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold-standarderne samt et tilstrækkeligt antal strips ift. antallet af personer, der skal testes (se fig. 2A og 2B ang. hhv. 2 rørs- og 3 rørs-formater). Gem ramme og låg efter brug til anvendelse med de resterende strips.

3. Rekonstituer den frysetørrede kit-standard med den volumen demineraliseret eller destilleret vand, der er angivet på etiketten på hætteglasset med standard. Bland forsigtigt for at hindre skumdannelse og sikre komplet opløsning. Rekonstituering af standarden med den angivne mængde vand vil give en opløsning med en koncentration på 8,0 IU/mL.

**Bemærk: Rekonstitueringsvolumen til kit-standarderne varierer fra batch til batch.**

Benyt den rekonstituerede kit-standard til at fremstille en 1 i 4-fortyndingsserie af IFN- $\gamma$  i grøn diluent (GD) – se fig. 1. S1 (Standard 1) indeholder 4 IU/mL, S2 (Standard 2) indeholder 1 IU/mL, S3 (Standard 3) indeholder 0,25 IU/mL og S4 (Standard 4) indeholder 0 IU/mL (GD alene). Standarderne bør som minimum analyseres i dobbeltbestemmelser.

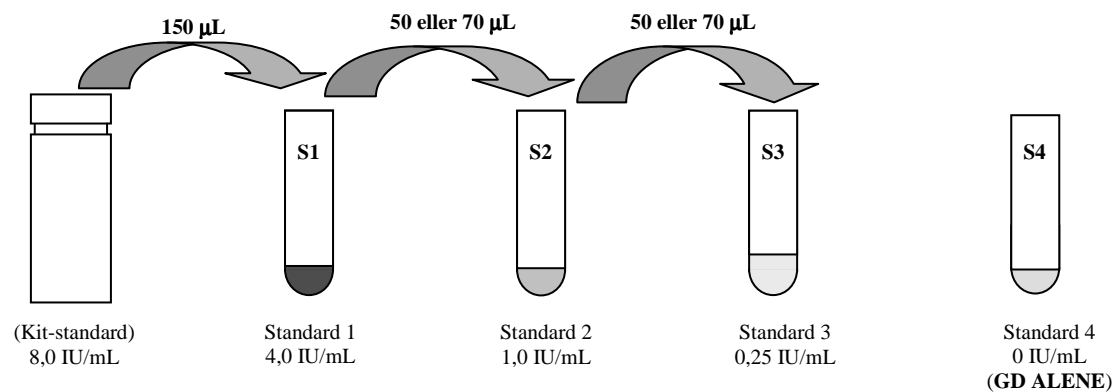
#### ANBEFALET PROCEDURE FOR DOBBELT-STANDARDER

- a. Mærk 4 rør "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Tilføj **150 $\mu$ L** GD til S1, S2, S3, S4.
- c. Tilføj **150 $\mu$ L** af kit-standarderne til S1, og bland grundigt.
- d. Overfør **50 $\mu$ L** fra S1 til S2, og bland grundigt.
- e. Overfør **50 $\mu$ L** fra S2 til S3, og bland grundigt.
- f. **GD alene** fungerer som nul-standard (S4).

#### ANBEFALET PROCEDURE FOR TREDOBBELT-STANDARDER

- a. Mærk 4 rør "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Tilføj **150 $\mu$ L** GD til S1.
- c. Tilføj **150 $\mu$ L** GD til S2, S3, S4.
- d. Tilføj **150 $\mu$ L** af kit-standarderne til S1, og bland grundigt.
- e. Overfør **70 $\mu$ L** fra S1 til S2, og bland grundigt.
- f. Overfør **70 $\mu$ L** fra S2 til S3, og bland grundigt.
- g. **GD alene** fungerer som nul-standard (S4).

**FIGUR 1. Forberedelse af standardkurve**



- Tilbered friske fortyndinger af kit-standarden til hver ELISA-session.
4. Rekonstituer det frysetørrede konjugat 100X-koncentrat med 0,3mL demineraliseret eller destilleret vand. Bland forsigtigt for at hindre skumdannelse og sikre komplet opløsning af konjugatet.

Konjugat af brugsstyrke tilberedes ved at fortynde den påkrævede mængde rekonstitueret konjugat 100X-koncentrat i grøn diluent som angivet i tabel 1 – Tilberedning af konjugat.

**TABEL 1. Tilberedning af konjugat**

ANTAL STRIPS	VOLUMEN AF KONJUGAT 100X-KONCENTRAT	VOLUMEN AF GRØN DILUENT
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

- Bland grundigt men forsigtigt for at hindre skumdannelse.
  - Sæt ubrugt konjugat 100X-koncentrat på køl igen ved 2°C til 8°C umiddelbart efter brug.
  - Benyt kun grøn diluent.
5. Før analysen bør plasmaerne blandes for at sikre, at IFN- $\gamma$  er jævnt fordelt i hele prøven.
  6. Tilføj 50µL frisk tilberedt konjugat af brugsstyrke til de påkrævede ELISA-brønde vha. en flerkanalspipette.
  7. Tilføj 50µL plasmaprøve til de relevante brønde vha. en flerkanalspipette (se den anbefalede prøveopsætning nedenfor – fig. 2A og 2B). Tilføj til slut 50µL af hver af standarderne 1 til 4.

**FIGUR 2A. Anbefalet prøveopsætning for Nil- og TB-antigen-rør  
(44 test pr. plade)**

	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 (Prøve 1. Nil-kontrol-plasma); 1A (Prøve 1. TB-antigen-plasma).

**FIGUR 2B. Anbefalet prøveopsætning for Nil-, TB-antigen- og mitogen-rør  
(28 test pr. plade)**

	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 (Prøve 1. Nil-kontrol-plasma); 1A (Prøve 1. TB-antigen-plasma);  
1M (Prøve 1. Mitogen-kontrol-plasma).

- Bland konjugat og plasmaprøver/standarder grundigt i 1 minut med en mikropladeryster.
- Dæk hver plade med et låg, og inkuber ved rumtemperatur ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) i  $120 \pm 5$  minutter.
  - Pladerne bør ikke udsættes for direkte sollys under inkuberingen.
- Mens inkuberingen foregår, fortyndes 1 del vaskebuffer 20X-koncentrat med 19 dele demineraliseret eller destilleret vand, hvorpå det blandes grundigt. Det leverede vaskebuffer 20X-koncentrat rækker til 2L vaskebuffer af brugsstyrke.

Vask brøndene med **400µL** vaskebuffer af brugsstyrke i mindst 6 cykler. Automatisk pladevaskemaskine anbefales.

  - Grundig vask er meget vigtig for analysens ydeevne. Kontrollér, at alle brønde **fyldes helt op** med vaskebuffer i hver eneste vaskecyklus. En iblødsætningsperiode på mindst 5 sekunder mellem hver cyklus anbefales.
  - Der bør tilsættes gængs laboratoriedesinfektionsmiddel til spildevandsbeholderen, og de faste procedurer for dekontaminering af potentielt smittefarligt materiale bør følges.
- Bank pladerne let med forsiden nedad mod absorberende klæde for at fjerne resterende vaskebuffer. Tilføj 100µL enzym-substratopløsning til hver brønd, og bland grundigt med en mikropladeryster.
- Dæk hver plade med et låg, og inkuber ved rumtemperatur ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) i 30 minutter.

- Pladerne bør ikke udsættes for direkte sollys under inkuberingen.
13. Efter 30 minutters inkubation tilføjes 50µL enzym-stopopløsning til hver brønd, og der blandes.
- Enzym-stopopløsningen bør tilføjes til brøndene i samme rækkefølge og med samme hastighed som substratopløsningen i trin 11.
14. Mål den optiske densitet (OD) for hver brønd inden for 5 minutter, efter at reaktionen er standset. Benyt hertil en mikropladelæser udstyret med et 450nm-filter og et 620nm til 650nm-referencefilter. OD-værdierne bruges til beregning af resultater.

## 7. BEREGNINGER OG TOLKNING AF TESTEN

QuantiFERON®-TB Gold IT-analysesoftware til analyse af rådata og beregning af resultater kan fås fra Cellestis.

Softwaren udfører en kvalitetskontrolvurdering af analysen, opretter en standardkurve og frembringer et testresultat for hver person, som beskrevet i afsnittet om resultattolkning.

Som alternativ til QuantiFERON®-TB Gold IT-analysesoftware kan resultaterne bestemmes med den nedenfor beskrevne metode:

### **Oprettelse af standardkurve**

*(hvis QuantiFERON®-TB Gold IT-analysesoftware ikke benyttes)*

Bestem OD-middelværdierne for kit-standard-replikaterne på hver plade.

Opret en  $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -standardkurve ved at indtegne  $\log_{(e)}$  for middel-OD (y-akse) over for  $\log_{(e)}$  for IFN- $\gamma$ -koncentration i standarderne i IU/mL (x-akse) - udelad nul-standard fra disse beregninger. Beregn best fit-linjen for standardkurven vha. regressionsanalyse.

Benyt standardkurven til at bestemme IFN- $\gamma$ -koncentrationen (IU/mL) for hver plasmaprøve ud fra OD-værdien for hver prøve.

Disse beregninger kan udføres med den software, der følger med mikropladelæsere, samt gængs regneark- eller statistiksoftware (fx Microsoft Excel). Det anbefales, at denne software anvendes til beregning af regressionsanalysen, variationskoefficienten (%CV) for standarderne samt korrelationskoefficienten (r) for standardkurven.

## **Kvalitetskontrol af testen**

Testresultaternes nøjagtighed afhænger af oprettelsen af en nøjagtig standardkurve. Derfor skal resultaterne fra standarderne undersøges, før resultaterne af prøverne kan tolkes.

Følgende kræves, for at ELISA er gyldig:

- **OD-middelværdien for standard 1 skal være  $\geq 0,600$ .**
- **%CV for replikat-OD-værdierne for standard 1 og standard 2 skal være  $\leq 15\%$ .**
- **Replikat-OD-værdierne for standard 3 og standard 4 må ikke variere med mere end 0,040 OD-enheder ift. deres middelværdi.**
- **Korrelationskoefficienten (r) beregnet ud fra standardernes absorbansmiddelværdier skal være  $\geq 0,98$ .**

QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold-analysesoftwaren beregner og rapporterer disse kvalitetskontrolparametre.

Hvis ovenstående kriterier ikke er opfyldt, er kørslen ugyldig og skal gentages.

- **OD-middelværdien for nul-standard (grøn diluent) bør være  $\leq 0,150$ . Hvis OD-middelværdien er  $> 0,150$ , bør pladevaskeproceduren tjekkes.**

## Tolkning af resultater

QuantiFERON®-TB Gold IT-resultaterne tolkes ud fra følgende kriterier:

**BEMÆRK:** Diagnosticering eller udelukkelse af tuberkuløs sygdom samt vurdering af sandsynligheden for LTBI kræver anvendelse af en kombination af epidemiologiske, anamnetiske, medicinske og diagnostiske fund, som bør tages med i betragtning ved tolkning af QuantiFERON®-TB Gold IT-resultaterne.

### VED ANVENDELSE AF NIL- OG TB-ANTIGEN-RØR

Nil [IU/mL]	TB-antigen minus Nil [IU/mL]	QuantiFERON®-TB [IU/mL]	Rapport/tolkning
≤ 8,0	< 0,35	<b>Negativ</b>	<i>M. tuberculosis</i> -infektion IKKE sandsynlig
	≥ 0,35 og < 25% af Nil-værdi		
	≥ 0,35 og ≥ 25% af Nil-værdi	<b>Positiv<sup>1</sup></b>	<i>M. tuberculosis</i> -infektion sandsynlig
> 8,0 <sup>2</sup>	Alle værdier	<b>Inkonklusiv<sup>3</sup></b>	Resultat er inkonklusivt mht. TB-antigen-følsomhed

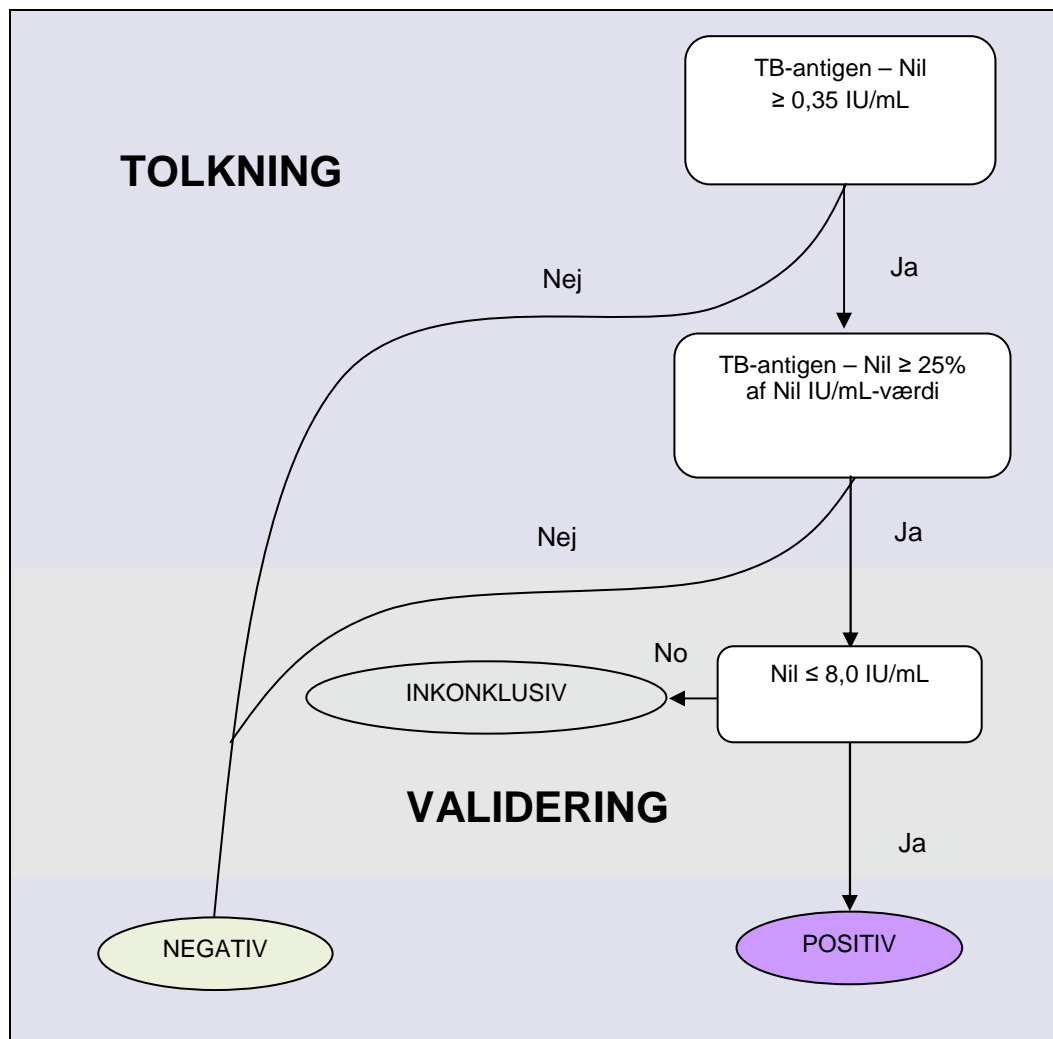
<sup>1</sup> Hvor der ikke er mistanke om *M. tuberculosis*-infektion, kan indledningsvist positive resultater bekræftes ved gentest af de originale plasmaprøver i dobbeltbestemmelser i QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Hvis gentesten af en eller begge replikater er positiv, bør personen anses for testpositiv.

<sup>2</sup> I kliniske studier havde færre end 0,25% af forsøgspersonerne IFN- $\gamma$ -niveauer på > 8,0 IU/mL for Nil-kontrollen.

<sup>3</sup> Se afsnittet om fejlfinding vedrørende mulige årsager.

Størrelsen af det målte IFN- $\gamma$ -niveau kan ikke korreleres til stadiet eller graden af infektion, immunfølsomhedsniveauet eller sandsynligheden for progression til aktiv sygdom.

FIGUR 3. Flowdiagram for tolkning ved anvendelse af NIL- OG TB-ANTIGEN-RØR



## VED ANVENDELSE AF NIL-, TB-ANTIGEN- OG MITOGEN-RØR

Nil [IU/mL]	TB-antigen minus Nil [IU/mL]	Mitogen minus Nil [IU/mL] <sup>1</sup>	QuantiFERON®-TB [IU/mL]	Rapport/tolkning
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	<b>Negativ</b>	<i>M. tuberculosis</i> -infektion IKKE sandsynlig
	≥ 0,35 og < 25% af Nil-værdi	≥ 0,5		
	≥ 0,35 og ≥ 25% af Nil-værdi	Alle værdier	<b>Positiv<sup>2</sup></b>	<i>M. tuberculosis</i> -infektion sandsynlig
	< 0,35	< 0,5	<b>Inkonklusiv<sup>3</sup></b>	Resultat er inkonklusivt mht. TB-antigen-følsomhed
≥ 0,35 og < 25% af Nil-værdi	< 0,5			
> 8,0 <sup>4</sup>	Alle værdier	Alle værdier		

<sup>1</sup> Reaktionen på den mitogen-positive kontrol (og en gang imellem TB-antigen) ligger ofte uden for mikropladelæserens område. Dette påvirker dog ikke testresultaterne.

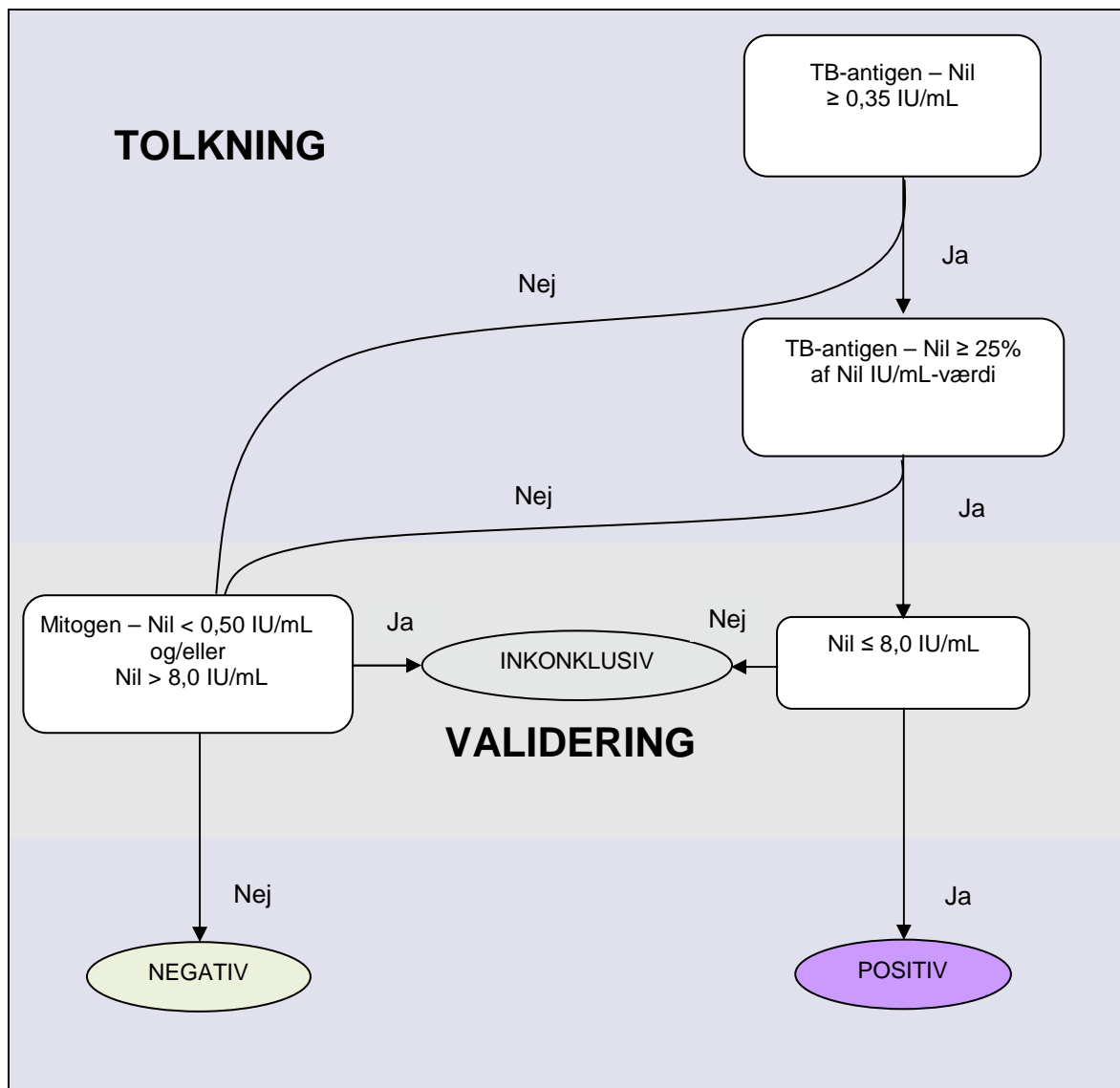
<sup>2</sup> Hvor der ikke er mistanke om *M. tuberculosis*-infektion, kan indledningsvist positive resultater bekræftes ved gentest af de originale plasma prøver i dobbeltbestemmelser i QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Hvis gentesten af en eller begge replikater er positiv, bør personen anses for testpositiv.

<sup>3</sup> Se afsnittet om fejlfinding vedrørende mulige årsager.

<sup>4</sup> I kliniske studier havde færre end 0,25% af forsøgspersonerne IFN- $\gamma$ -niveauer på > 8,0 IU/mL for Nil-kontrollen.

Størrelsen af det målte IFN- $\gamma$ -niveau kan ikke korreleres til stadiet eller graden af infektion, immunfølsomhedsniveauet eller sandsynligheden for progression til aktiv sygdom.

**FIGUR 4. Flowdiagram for tolkning ved anvendelse af NIL-, TB-ANTIGEN- OG MITOGEN-RØR**



## 8. BEGRÆNSNINGER

Resultaterne af QuantiFERON®-TB Gold IT-testen skal anvendes i sammenhæng med hver persons epidemiologiske anamnese, aktuelle helbredstilstand og andre diagnostiske vurderinger.

Personer med Nil-værdier over 8 IU/mL klassificeres som "inkonklusive", da en 25% højere reaktion på TB-antigenerne kan ligge uden for analysens måleområde.

Upålidelige eller inkonklusive resultater kan skyldes:

- Afvigelser fra den procedure, der er beskrevet i indlægssedlen
- For høje niveauer af cirkulerende IFN- $\gamma$  eller tilstedeværelse af heterofile antistoffer
- Mere end 16 timers ophold mellem blodprøvetagning og inkubation ved 37°C.

## 9. YDEEVNE-KARAKTERISTIK

### Kliniske studier

Da der ikke findes en endelig standard for latent tuberkuloseinfektion (LTBI), kan et estimat af sensitiviteten og specificiteten for QuantiFERON®-TB Gold IT ikke vurderes i praksis. Specificiteten for QuantiFERON®-TB Gold IT blev tilnærmet ved at vurdere falsk positiv-raten hos personer med lav risiko for tuberkuloseinfektion (ingen kendte risikofaktorer). Sensitiviteten blev tilnærmet ved at vurdere grupper af patienter med aktiv TB bekræftet vha. dyrkning.

#### Specificitet

I et amerikansk studie med 866 frivillige blev der udtaget blod til QuantiFERON®-TB Gold IT, samtidig med at der blev foretaget en TST. Demografiske oplysninger og risikofaktorer for TB blev fastlagt vha. et standardspørgeskema på testtidspunktet. Ud af 432 frivillige med ingen kendte risikofaktorer for *M. tuberculosis*-infektion forelå der QuantiFERON®-TB Gold IT- og TST-resultater for de 391. Ingen var blevet BCG-vaccineret. Et andet specificitetsstudie med QuantiFERON®-TB Gold IT blev udført i Japan med lavrisiko-personer, hvoraf ca. 90 % var blevet BCG-vaccineret. Resultaterne af begge specificitetsstudier er angivet i tabel 2.

**Table 2. Specificitet for QuantiFERON®-TB Gold IT: Resultater for personer med ingen rapporteret risiko for *M. tuberculosis*-infektion.**

STUDIE	BCG-status % vaccineret	I alt testet	Antal QFT-G inkonklusive	Antal QFT-G positive / antal gyldige test	QFT-G specificitet (95% CI)	Antal TST positive / antal testede	TST* specificitet (95% CI)
USA (ikke offentliggjort)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (97,6-99,8)	6 / 391	98,5% (96,5-99,4)
Japan (ikke offentliggjort)	~90%	190	4	3 / 186	98,4% (95-99,6)	-	-
<b>I ALT</b>		<b>581</b>	<b>5/584 (0,9%)</b>	<b>6 / 576</b>	<b>99,0%</b>	-	-

\*Ved brug af en 10mm TST-cutoff. Estimatet for TST-specificitet er 99,1% ved brug af en 15mm cutoff.

#### Sensitivitet i forhold til aktiv TB

Personer med mistænkt TB fra hhv. Australien og Japan, som efterfølgende blev bekræftet smittet med *M. tuberculosis* vha. dyrkning, blev testet mhp. vurdering af sensitiviteten for QuantiFERON®-TB Gold IT. Da der ikke findes en endelig standardtest for latent tuberkuloseinfektion (LTBI), er en egnet erstatning en mikrobiologisk dyrkning af *M. tuberculosis*, da patienter med tuberkulose pr. definition er smittede. Patienterne havde modtaget behandling i mindre end 8 dage før blodprøvetagning til QuantiFERON®-TB Gold IT-testen.

Tabel 3 opsummerer resultaterne for de to grupper af patienter med positiv *M. tuberculosis*-dyrkning. Den samlede sensitivitet for QuantiFERON®-TB Gold IT i forhold til aktiv TB var 89% (48/54).

**Tabel 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Personer med *M. tuberculosis*-infektion bekræftet ved dyrkning**

STUDIE		Sygdom bekræftet ved	Antal QFT-Gold positive / antal gyldige test	QFT-Gold-sensitivitet (95% CI)
Valideringsstudie med japanske TB-patienter		Dyrkning	24 / 27	89% (72-96%)
Valideringsstudie med australske TB-patienter	Pulmonal	Dyrkning	7 / 10	70% (40-89%)
	Extrapulmonal		17 / 17	100% (82-100%)
<b>I ALT</b>			<b>48 / 54</b>	<b>89%</b> <b>(78-95%)</b>

### Diagnose af LTBI

Der er offentliggjort flere studier, som påviser ydeevnen af QuantiFERON®-TB Gold IT i forskellige populationer med risiko for LTBI. Hovedresultaterne af nogle udvalgte studier vises i table 4.

**Tabel 4. Udvalgte offentliggjorte studier af QuantiFERON®-TB Gold IT i populationer med risiko for LTBI**

STUDIE	Antal testede	Resultater og fund
Ansatte i sundhedssektoren, Indien (Pai <i>et al</i> 2005) <sup>27</sup>	726	Miljø med meget høje TB-forekomster. 40% QFT-Gold IT-positive sml. 41% TST-positive ved 10mm. Høj konkordans med TST, ingen effekt af BCG på nogen af siderne. Begge test knyttet til risikofaktorerne alder og arbejdsanciennitet i sundhedssektoren.
HIV-positive, Danmark (Brock <i>et al</i> 2006) <sup>5</sup>	590	Samlet prævalens af LTBI ved brug af QFT-Gold IT var 4,6% (27/590) hos HIV-positive. Positive resultater var associeret med TB-risiko. To QFT-Gold IT-positive forsøgspersoner udviklede aktiv TB inden for 1 år. Inkonklusive reaktioner (n=20. 3,4%) var signifikant associeret med en CD4-tælling <100 / µL.
Indlagte børn (Dogra <i>et al</i> 2006) <sup>12</sup>	105	Børn med mistænkt TB eller anamnese med TB-kontakt blev testet med QFT-Gold IT og TST. 10,5% QFT-Gold IT-positive sml. 9,5% TST-positive ved 10mm. Overensstemmelsen mellem de to test var 95,2% samlet og 100% hos ikke-BCG-vaccinerede.
Personer med kontakt til TB-smittede, Tyskland (Diel <i>et al</i> 2006) <sup>11</sup>	309	Personer med tæt kontakt til 15 forskellig indeks-tilfælde blev testet. 51% var BCG-vaccinerede, 27% stammede fra andre lande. 70% af de BCG-vaccinerede og 18% af de ikke-vaccinerede var TST-positive (5mm), mens hhv. 9% og 11% var QFT-Gold IT-positive. QFT-Gold IT var associeret med TB-risiko. TST var kun associeret med BCG-vaccination.

Der findes mange flere publikationer, der beskriver ydeevnen af den mindre følsomme version af QuantiFERON®-TB Gold-testen, der anvender flydende antigen (forgængeren til QuantiFERON®-TB Gold IT) samt af QuantiFERON®-TB Gold IT-testen. Disse studier omfatter brug af testen/testene hos personer med kontakt til TB-syge<sup>9,11, 19, 25</sup>, hos børn<sup>6-10, 25, 28</sup>, hos HIV-positive<sup>2, 5, 20</sup>, hos ansatte i sundhedssektoren<sup>13, 26, 32</sup>, hos immunsupprimerede<sup>3, 4, 22, 23, 27, 30, 31</sup>, samt hos personer med mistænkt TB<sup>7, 8, 10, 18</sup> og hos personer med lav risiko<sup>15</sup>.

### Reperterbarhed og effekt af TST ved efterfølgende QuantiFERON®-TB Gold-test

Som del af det amerikanske specificitetsstudie blev en undergruppe af frivillige testet igen 4-5 uger efter den oprindelige QuantiFERON®-TB Gold IT-test og TST. Der var QuantiFERON®-TB Gold IT-resultater for 260 frivillige til rådighed på begge tidspunkter, og overensstemmelsesgraden var 99,6% (259/260). En tidligere TST forårsagede ingen positive QuantiFERON®-TB Gold IT-reaktioner.

## 10. TEKNISKE OPLYSNINGER

### Inkonklusive resultater

Inkonklusive resultater bør ikke være almindeligt forekommende og kan skyldes immunstatus hos testpersonen. De kan dog også skyldes et antal tekniske faktorer:

- Mere end 16 timers ophold mellem blodprøvetagning og inkubation ved 37°C
- Opbevaring af blodet ved en temperatur uden for det anbefalede område (22°C ± 5°C)
- Utilstrækkelig blanding af blodtagningsrør
- Ufuldstændig vask af ELISA-pladen.

Hvis der er mistanke om tekniske problemer i forhold til blodprøvetagningen og –håndteringen, gentages hele QuantiFERON®-TB Gold IT-testen med en ny blodprøve. Gentagelse af ELISA af stimulerede plasmaer kan udføres, hvis der er mistanke om utilstrækkelig vask eller anden proceduremæssig afvigelse i forbindelse med ELISA. Inkonklusive test som resultat af lave mitogen-værdier eller høje nil-værdier forventes ikke at ændre sig ved gentagelse, med mindre der skete en fejl ved ELISA. Inkonklusive resultater bør rapporteres som sådanne. Lægen kan så efter eget skøn vælge at udtage en ny blodprøve eller foretage en anden procedure.

### Plasmaprøver med klumper

Hvis der dannes fibrinklumper ved langvarig opbevaring af plasmaprøver, kan prøverne centrifugeres, så det klumpede materiale bundfælder sig og pipetteringen af plasmaet dermed bliver lettere.

## Fejlfinding af ELISA

### Uspecifik farveudvikling

MULIG ÅRSAG	LØSNING
Ufuldstændig vask af pladen	Vask pladen mindst 6 gange med 400µL vaskebuffer pr. brønd. Alt efter den anvendte vaskemaskine kan mere end 6 vaskecykler være påkrævet. Der bør være mindst 5 sekunders iblødsætning mellem hver cyklus.
Krydskontaminering af ELISA-brønde	Vær forsigtig ved pipettering og blanding af prøver for at minimere risikoen.
Kittets / komponenternes udløbsdato er overskredet	Kontrollér, at kittet anvendes inden udløbsdatoen. Kontrollér, at rekonstitueret standard og konjugat 100X-koncentrat anvendes inden for 3 måneder fra rekonstitueringsdatoen.
Enzym-substratopløsningen er kontamineret	Bortskaf substratet, hvis der er blåfarvning. Kontrollér, at der anvendes rene reagensbeholdere.

### Lave tal for optisk densitet i standardmålinger

MULIG ÅRSAG	LØSNING
Fejl ved fortynding af standard	Kontrollér, at fortyndingerne af kit-standard tilberedes korrekt iht. anvisningerne i indlægssedlen.
Pipetteringsfejl	Kontrollér, at pipetterne kalibreres og anvendes iht. producentens anvisninger.
For lav inkubationstemperatur	Inkubation af ELISA bør ske ved rumtemperatur (17°C til 27°C).
For kort inkubationstid	Inkubation af pladen med konjugat, standard og prøve skal ske i 120 ± 5 minutter. Enzym-substratopløsningen skal inkuberes på pladen i 30 minutter.
Ukorrekt pladelæserfilter anvendt	Pladen bør læses ved 450nm med et referencefilter på mellem 620 og 650nm.
For kolde reagenser	Alle reagenser, undtagen konjugat 100X-koncentratet, skal have rumtemperatur, før analysen påbegyndes. Dette tager ca. 1 time.
Kittets / komponenternes udløbsdato er overskredet	Kontrollér, at kittet anvendes inden udløbsdatoen. Kontrollér, at rekonstitueret standard og konjugat 100X-koncentrat anvendes inden for 3 måneder fra rekonstitueringsdatoen.

Høj baggrund

MULIG ÅRSAG	LØSNING
Ufuldstændig vask af pladen	Vask pladen mindst 6 gange med 400 $\mu$ L vaskebuffer pr. brønd. Alt efter den anvendte vaskemaskine kan mere end 6 vaskecykler være påkrævet. Der bør være mindst 5 sekunders iblødsætning mellem hver cyklus.
For høj inkubationstemperatur	Inkubation af ELISA bør ske ved rumtemperatur (17°C til 27°C).
Kittets / komponenternes udløbsdato er overskredet	Kontrollér, at kittet anvendes inden udløbsdatoen. Kontrollér, at rekonstitueret standard og konjugat 100X-koncentrat anvendes inden for 3 måneder fra rekonstitueringsdatoen.
Enzym-substratopløsningen er kontamineret	Bortskaf substratet, hvis der er blåfarvning. Kontrollér, at der anvendes rene reagensbeholdere.

Ikke-lineær standardkurve og variabilitet mellem dobbeltbestemmelser

MULIG ÅRSAG	<u>LØSNING</u>
Ufuldstændig vask af pladen	Vask pladen mindst 6 gange med 400 $\mu$ L vaskebuffer pr. brønd. Alt efter den anvendte vaskemaskine kan mere end 6 vaskecykler være påkrævet. Der bør være mindst 5 sekunders iblødsætning mellem hver cyklus.
Fejl ved fortynding af standard	Kontrollér, at fortyndingerne af standarden tilberedes korrekt iht. anvisningerne i indlægssedlen.
Dårlig blanding	Bland reagenserne grundigt ved at vende dem på hovedet eller ved blid vortexblanding, før de tilføjes til pladen.
Inkonsistent pipetteringsteknik eller afbrydelse ved analyseopsætning	Tilføjelsen af prøve og standard bør ske uden afbrydelser. Alle reagenser bør tilberedes, før analysen påbegyndes.

En video af analyseproceduren og løsninger på de fleste tekniske problemer findes på cd-rommen med produktoplysninger og tekniske anvisninger. Denne cd-rom kan fås gratis fra Cellestis eller den lokale forhandler.

## 11. LITTERATURLISTE

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. OPSUMMERING AF TESTPROCEDURE

### TRIN 1 – INKUBATION AF BLOD

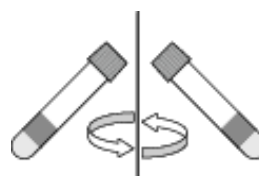
1. Udtag patientblod i blodtagingsrørene, og bland ved at **ryste rørene kraftigt i 5 sekunder (eller 10 gange)** for at sikre, at **hele rørets inderside** er blevet belagt med blod.



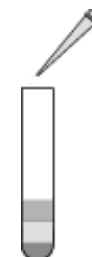
2. Inkuber rørene i **opretstående stilling** ved 37°C i 16 til 24 timer.



3. Centrifuger rørene i 5 til 15 minutter ved 2000 til 3000g RCF (g) efter inkubation for at separere plasma og røde blodlegemer.

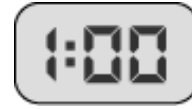


4. Opsaml plasma prøven fra hvert rør efter centrifugering mhp. IFN- $\gamma$ -kvantificering.



## TRIN 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

1. Lad alle ELISA-komponenter, undtagen konjugat 100X-koncentrat, få rumtemperatur. Det tager mindst 60 minutter.

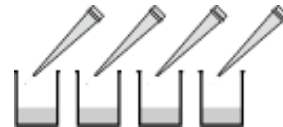


2. Rekonstituer kit-standarden til 8,0 IU/mL med destilleret eller demineraliseret vand. Tilbered 4 standardfortyndinger.

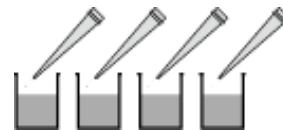


3. Rekonstituer det frysetørrede konjugat 100X-koncentrat med destilleret eller demineraliseret vand.

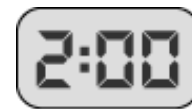
4. Tilbered konjugat af brugsstyrke i grøn diluent, og tilføj 50 $\mu$ L til alle brønde.



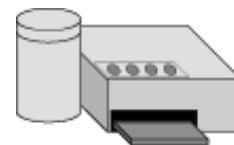
5. Tilføj 50 $\mu$ L plasmaprøve og 50 $\mu$ L standard til de relevante brønde. Bland vha. mikropladeryster.



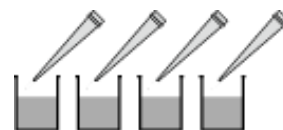
6. Inkuber i 120 minutter ved rumtemperatur.



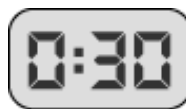
7. Vask brøndene grundigt mindst 6 gange med 400 $\mu$ L vaskebuffer pr. brønd.



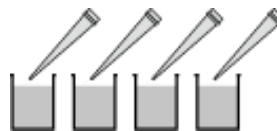
8. Tilføj 100 $\mu$ L enzym-substratopløsning til brøndene. Bland vha. mikropladeryster.



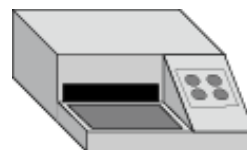
9. Inkuber i 30 minutter ved rumtemperatur.



10. Tilføj 50 $\mu$ L enzym-stopopløsning til alle brønde.  
Bland vha. mikropladeryster.



11. Aflæs resultater ved 450nm med et 620 til 650nm referencefilter.



12. Analysér resultaterne.





Fremstillet for:

Cellestis Limited (Australien) og Cellestis GmbH (Europa)  
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia

Tlf.: (Aust) +61 3 9571 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0

E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)

Hjemmeside: [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com)

Dokumentnr. 05990301C

Marts 2008

