

QuantiFERON[®]-TB Gold

(“In-Tube”-methode = in het buisje)

**IFN-gamma-test voor volbloedmonsters
voor het meten van reacties op de peptide-antigenen
ESAT-6, CFP-10 en TB7.7(p.4)**

BIJSLUITER

In Vitro diagnosticum



INHOUDSOPGAVE

1. GEBRUIKSDOEL	2
2. SAMENVATTING EN UITLEG VAN DE TEST	2
Testprincipe	3
Voor de test benodigde tijd	3
3. REAGENTIA EN OPSLAG	4
Benodigde materialen (niet meegeleverd)	5
Opslag	5
Bloedafnamebuisjes	5
Kit-reagentia	5
Gereconstitueerde en niet benodigde reagentia	5
4. VOORZORGSMaatregelen EN WAARSCHUWINGSaanwijzingen	6
Voorzorgsmaatregelen	6
Waarschuwingaanwijzingen	6
5. HET NEMEN VAN EN HET OMGAAN MET MONSTERS	7
6. GEBRUIKSAANWIJZING	9
Stap 1: Incubatie van het bloedmonster en afnemen van plasma	9
Stap 2: Human-IFN- γ -ELISA	10
7. BEREKENINGEN EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN	13
Standaardcurve maken	13
Kwaliteitscontrole	14
Interpretatie van de resultaten	15
8. BEPERKINGEN VAN DE METHODE	19
9. PRESTATIEKENMERKEN	20
10. TECHNISCHE INFORMATIE	21
Onduidelijke resultaten	21
Gestolde plasmamonsters	21
ELISA-probleemoplossing	22
Niet-specifieke kleurreactie	22
Lage OD-waarde van de standaarden	22
Sterke achtergrondkleuring	23
Niet-lineaire standaardcurve en afwijkingen tussen de twee dubbelmonsters	23
11. BIBLIOGRAFIE	24
12. TECHNISCHE KLANTENSERVICE	25
13. TESTMETHODE (VERKORTE VORM)	26

1. GEBRUIKSDOEL

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) is een voor de *in-vitro* diagnostiek bestemde test die een peptidecocktail bevat die de proteïnen ESAT-6, CFP-10 en TB7.7(p4) simuleert en cellen in gehepariniseerd volbloed stimuleert. Het aantonen van interferon- γ (IFN- γ) door de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-methode dient ter herkenning van *in-vitro* reacties op deze peptide-antigenen, waarvan sprake is bij een *Mycobacterium tuberculosis*-infectie.

QuantiFERON®-TB Gold IT is een indirecte test voor het aantonen van een *M. tuberculosis*-infectie (inclusief de actieve aandoening). De testresultaten zijn bedoeld om te worden gebruikt voor risicobeoordeling, röntgenonderzoeken en overige medische en diagnostische onderzoeken.

2. SAMENVATTING EN UITLEG VAN DE TEST

Tuberculose (tbc) is een besmettelijke ziekte die wordt veroorzaakt door een infectie met organismen van het *M. tuberculosis*-complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*). De besmetting van personen die leiden aan tb van de luchtwegen, wordt doorgaans overgebracht via druppelinfectie. Bij nieuw geïnfekteerde patiënten kan de ziekte tb binnen weken of maanden optreden, maar bij de meeste geïnfekteerden treden geen klachten op. Bij sommigen is sprake van een latente tbc-infectie (LTBI) op, een niet-besmettelijke, asymptomatische aandoening die pas na maanden of jaren kan uitbreken. Het hoofddoel van het diagnosticeren van LTBI is erin gelegen een behandeling ter preventie van het uitbreken van de tb-ziekte in overweging te nemen. Tot voor kort was de tuberculine-huidtest (tuberculin skin test, TST) de enige beschikbare methode voor de diagnose van LTBI. De gevoeligheid van de huid voor tuberculine ontstaat 2 tot 10 weken na de infectie. Sommige geïnfekteerde personen reageren echter niet op tuberculine, waaronder bijv. patiënten met een ontregelde immuunreactie als gevolg van andere aandoeningen, maar ook patiënten zonder zulke storingen. Omgekeerd vertonen echter sommige personen die met grote waarschijnlijkheid niet aan een *M. tuberculosis*-infectie lijden, na vaccinatie met de bacillus Calmette-Guérin (BCG), na infectie met andere mycobacteriën als het *M. tuberculosis*-complex of i.v.m. onbekende andere factoren een tuberculinegevoeligheid en behalen een positief testresultaat in de tuberculinehuidtest.

LTBI moet worden onderscheiden van tb, waarvoor een meldplicht bestaat en dat doorgaans de longen en de onderste luchtwegen aantast; maar er kunnen ook andere orgaansystemen worden aangedaan. De tb-ziekte wordt gediagnosticeerd op grond van historische, fysieke, radiologische, histologische en mycobacteriologische onderzoeksresultaten.

De QuantiFERON®-TB Gold IT-test meet de celgemedieerde immuun(CMI)-reacties op peptide-antigenen die mycobacteriële proteïnen simuleren. Deze proteïnen (ESAT-6, CFP-10 en TB7.7(p4)) ontbreken in alle BCG-stammen en in de meeste niet-tuberculeuze mycobacteriën met uitzondering van *M. kansasii*, *M. szulgai* en *M. marinum*.¹ In het bloed van personen die zijn geïnfecteerd met organismen van het *M. tuberculosis*-complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), bevinden zich in het algemeen lymfocyten die deze en andere mycobacteriële antigenen signaleren. Bij dit herkenningsproces wordt het cytokine IFN- γ geproduceerd en afgescheiden. Het aantonen en de aansluitende kwantificering van IFN- γ vormt de basis van deze test.

De in de QuantiFERON®-TB Gold IT-test gebruikte antigenen zijn een peptidecocktail die de proteïnen ESAT-6, CFP-10 en TB7.7(p4) simuleert. Talrijke studies hebben getoond dat deze peptide-antigenen de IFN- γ -reactie in de T-cellen van *M. tuberculosis*-geïnfekteerden stimuleren, maar niet de T-cellen van niet-geïnfekteerden of BCG-gevaccineerden zonder tb of LTBI-risico.¹⁻³² Wel kan de IFN- γ -reactie potentieel worden beperkt door medische behandelingen of aandoeningen die een nadelige invloed op de immuunfunctie hebben. Patiënten met bepaalde andere mycobacteriële infecties kunnen eveneens reageren op ESAT-6, CFP-10 en TB7.7(p4), omdat de genen waarop deze proteïnen zich bevinden ook aanwezig zijn in *M. kansasii*, *M. szulgai* en *M. marinum*.^{1,23} De QuantiFERON®-TB Gold IT-test is daarom een waardevolle hulp bij de diagnose van een infectie met het *M. tuberculosis*-complex bij ziek geworden patiënten. Een positief testresultaat ondersteunt de diagnose van tbc, maar kan ook zijn opgeroepen door andere mycobacteriën (bijv. *M. kansasii*). Voor het vaststellen resp. uitsluiten van tbc zijn verdere medische en diagnostische onderzoeken vereist.

Testprincipe

Het QuantiFERON®-TB Gold IT-systeem omvat speciale bloedafnamebuisjes, waarin de volbloedmonsters worden genomen. De aansluitende incubatie van de bloedmonsters in het buisje duurt 16 tot 24 uur. Daarna wordt het plasma geëxtraheerd en getest op de aanwezigheid van IFN- γ dat is gevormd in reactie op de peptide-antigenen.

De QuantiFERON®-TB Gold IT-test bestaat uit twee stappen. In een eerste stap wordt het volbloedmonster in de verschillende QuantiFERON®-TB Gold bloedafnamebuisjes verzameld. Hiertoe behoren een nulcontrolebuisje, een tb-antigenbuisje en een optioneel mitogenbuisje.

Het mitogenbuisje kan bij de QuantiFERON®-TB Gold IT-test worden gebruikt als positieve controle. Het gebruik hiervan is vooral geïndiceerd als de immuunstatus van de patiënt onzeker is. Het mitogenbuisje kan ook dienen ter controle van de correcte omgang met het bloedmonster en voor de juiste incubatie.

De buisjes moeten zo snel mogelijk, maar beslist binnen 16 uur na de bloedafname, bei 37°C worden geïncubeerd. Na de 16 tot 24 uur durende incubatietijd worden de buisjes gecentrifugeerd. Vervolgens wordt het plasma verwijderd en de IFN- γ -hoeveelheid (in IE/ml) met behulp van de ELISA-methode bepaald.

Het testresultaat wordt beschouwd als positief voor de IFN- γ -reactie op het tb-antigenbuisje als deze waarde aanmerkelijk boven de waarde van de nulcontrole (IFN- γ in IE/ml) ligt. Bij gebruik van het mitogenbuisje dient het mitogen-geactiveerde plasmamonster als IFN- γ -positieve controle voor elk getest monster. Een geringe reactie op mitogen (< 0,5 IE/ml) geldt als een onduidelijk resultaat als het bloedmonster ook een negatieve reactie op de tb-antigenen vertoont. Een dergelijk patroon kan ontstaan bij een onvoldoende aantal lymfocyten, bij een verminderde lymfocytenactiviteit als gevolg van ondeskundige behandeling van het monster, het ondeskundig vullen of mengen van het mitogenbuisje, of wanneer de lymfocyten van de patiënt niet in staat zijn IFN- γ te produceren. Het nulmonster omvat een correctie voor niet-specifieke achtergrondreacties, heterofiele antilichaam-effecten⁷ en niet-specifiek IFN- γ in het bloedmonster. De IFN- γ -waarde van het nulbuisje wordt afgetrokken van de IFN- γ -waarde van het tb-antigenbuisje en van het mitogenbuisje (indien gebruikt).

Voor de test benodigde tijd

Hieronder vindt u gegevens over de geschatte duur van de QuantiFERON®-TB Gold IT-test en over de benodigde tijd voor het testen van meerdere monsters als batch.

Incubatie van de monsterbuisjes bij 37°C: 16 - 24 uur

ELISA: ca. 3 uur per ELISA-plaat

- < 1 uur arbeidstijd
- plus 10 – 15 min. per extra plaat

3. REAGENTIA EN OPSLAG

Bloedafnamebuisjes voor tb- en controle-antigenen

Best.-nr. 0590 0301

- | | |
|--|-------------|
| 1. Nulcontrolebuisjes (grijze sluiting) | 100 buisjes |
| 2. Tb-antigenbuisjes (rode sluiting) | 100 buisjes |
| 3. Mitogen-controlebuisjes (lila sluiting) | 100 buisjes |

AANWIJZING: De buisjes zijn ook als volgt verkrijgbaar:

100 nulcontrolebuisjes + 100 tb-antigenbuisjes (best.-nr. 0590 0201)

100 mitogen-controlebuisjes (best.-nr. 0593 0201)

Buisjes voor gebruik op grote hoogte (zie hoofdstuk 5):

Best.-nr. 05900210: 100 nulcontrolebuisjes, 100 tb-antigenbuisjes

Best.-nr. 05900505: 100 nulcontrolebuisjes, 100 tb-antigen- en 100 mitogen-controlebuisjes

Best.-nr. T0593 0502: 100 mitogen-controlebuisjes

ELISA-bestanddelen

Best.-nr. 0594 0201

- | | |
|---|--------------|
| 1. Microtiterplaten | 24 x 8 wells |
| 2. Human-IFN- γ -standaard, gevriesdroogd | 1 flesje |
| 3. Groene verdunningsoplossing | 1 x 30 ml |
| 4. Conjugaat-concentraat (100-voudig geconcentreerd), gevriesdroogd | 1 x 0,3 ml |
| 5. Wasbufferconcentraat (20-voudig geconcentreerd) | 1 x 100 ml |
| 6. Enzym-substraatoplossing | 1 x 30 ml |
| 7. Enzym-stopoplossing | 1 x 15 ml |

Benodigde materialen (niet meegeleverd)

- 37°C incubator; geen CO₂ vereist.
- Gekalibreerde pipetten van variabel volume (10µl tot 1000µl) met pipetpunten voor eenmalig gebruik
- Gekalibreerde meerkanaalspipet met een capaciteit van 50 µl en 100 µl met pipetpunten voor eenmalig gebruik
- Schudder voor microtiterplaten
- Gedeïoniseerd of gedistilleerd water (2 liter)
- Wasinstallatie voor microtiterplaten (bij voorkeur geautomatiseerd)
- Leesapparaat voor microtiterplaten met 450-nm-filter en 620 tot 650 nm-referentiefilter

Opslag

Bloedafnamebuisjes

- Bewaar de bloedafnamebuisjes bij 4 – 25°C.
- De houdbaarheid van de QuantiFERON[®]-TB Gold bloedafnamebuisjes bedraagt 15 maanden vanaf de productiedatum (opslag bij 4–25°C).

Kitonderdelen

- Bewaar de kit bij 2–8°C.
- Bescherm de enzym-substraatoplossing steeds tegen direct invallend zonlicht.
- De houdbaarheid van de QuantiFERON[®]-TB Gold IT ELISA-kit bedraagt 3 jaar vanaf de productiedatum (opslag bij 2–8°C).

Gereconstitueerde en niet benodigde reagentia

Aanwijzingen voor reconstitutie van de kitreagentia vindt u in hoofdstuk 6 onder “Vorbereiding van de reagentia”.

- De gereconstitueerde kit-standaard is bij opslag tussen 2 en 8°C drie maanden lang houdbaar.
 - *Noteer de datum van de reconstitutie van de kit-standaard.*
- Na reconstitutie moet niet benodigd concentraat (100x) weer bij 2-8°C worden opgeslagen en eveneens binnen drie maanden worden gebruikt.
 - *Noteer de datum van de reconstitutie van het conjugaat.*
- Het kant-en-klare conjugaat moet binnen 6 uur na toebereiding worden gebruikt.
- De kant-en-klare wasbuffer is bij kamertemperatuur max. twee weken lang houdbaar.

4. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGSAANWIJZINGEN

Voorzorgsmaatregelen

- Een negatief resultaat in de QuantiFERON®-TB Gold IT test sluit de mogelijkheid van een *M. tuberculosis*-infectie of van de ziekte tb niet uit; fout-negatieve resultaten kunnen worden veroorzaakt door de infectiefase (bijv. als het bloedmonster is genomen vóór de ontwikkeling van een cellulaire immuunreactie), storingen van de immuunfunctie door andere aandoeningen, een ondeskundige manier van omgaan met de buisjes na de bloedafname, een verkeerde uitvoering van de test of overige immunologische variabelen.
- Een positief resultaat in de QuantiFERON®-TB Gold IT-test mag niet als enige basis voor de identificatie van een infectie met *M. tuberculosis* fungeren; door een verkeerde uitvoering van de test is er een kans op een fout-positieve testuitslag.
- Een positief resultaat in de QuantiFERON®-TB Gold IT-test dient te worden gevolgd door verder medisch en diagnostisch onderzoek; alleen zo kan worden vastgesteld of er sprake is van actieve tbc (bijv. door een AFB-uitstrijkje en -cultuur alsmede een thorax-röntgenonderzoek).
- Weliswaar bevatten BCG-stammen en de meeste bekende niet-tuberculeuze mycobacteriën geen ESAT-6, CFP-10 en TB7.7(p4), maar een positief resultaat in de QuantiFERON®-TB Gold IT-test kan ook worden toegeschreven aan een infectie met *M. kansasii*, *M. szulgai* of *M. marinum*. Bij het vermoeden van zulke infecties moeten alternatieve testmethoden worden gebruikt.

Waarschuwingsaanwijzingen

- **Uitsluitend voor diagnostisch gebruik *in vitro*.**
- **Voorzichtig:** de **enzym-substraatoplossing** bevat 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dat bij inslikken, inademen of huidcontact gevaarlijk is. Irriterend voor huid en ogen. Mutagene werking. Draag een veiligheidsbril en laboratoriumhandschoenen en behandel deze oplossing als potentieel carcinogeen.
- **Voorzichtig:** de **enzym-stopoplossing** bevat H₂SO₄, dat bij inslikken, inademen, oog- of huidcontact gevaarlijk is. Draag een veiligheidsbril, laboratoriumhandschoenen en geschikte beschermende laboratoriumkleding. Bij huid- of oogcontact met de stopoplossing: spoel met grote hoeveelheden water en raadpleeg een arts.
- **Voorzichtig:** de **IFN- γ standaard en het 100-voudig geconcentreerde conjugaatconcentraat** kunnen bij inslikken klachten veroorzaken en bij huidcontact irritaties veroorzaken. Draag laboratoriumhandschoenen en geschikte beschermende laboratoriumkleding.
- **Beschouw menselijke bloedmonsters altijd als potentieel besmettelijk!** Neem de desbetreffende richtlijnen over de omgang met bloed in acht.
- Sommige reagentia bevatten **Thimerosal** als conserveringsmiddel. Thimerosal kan bij inslikken, inademen of huidcontact een toxische werking hebben.
- **De groene verdunningsoplossing** bevat een normaal muissersum en caseïne; deze stoffen kunnen allergische reacties veroorzaken. Voorkom daarom huidcontact!
- Afwijkingen van de in de bijsluiter beschreven procedures en instructies kunnen leiden tot foutieve resultaten. Lees de testinstructies vóór gebruik zorgvuldig door a.u.b.
- Gebruik de kit niet als een of meerdere reagentiaflessen vóór gebruik beschadigd of lek zijn.
- Gebruik in combinatie met de onderdelen van deze verpakking geen ELISA-reagentia van andere QuantiFERON®-TB Gold IT kit-partijen.
- Zorg ervoor dat niet benodigde reagentia en biologische monsters worden verwerkt in overeenstemming met de plaatselijke en nationale voorschriften.
- Na de vervaldatum mogen de bloedafnamebuisjes en ELISA-kitonderdelen niet meer worden gebruikt.

5. HET NEMEN VAN EN HET OMGAAN MET MONSTERS

Bloedafname

De QuantiFERON®-TB Gold IT-test omvat de volgende bloedafnamebuisjes:

1. Nulcontrole (grijze sluiting met witte ring) (voor hoogtes tot max. 810 m boven zeeniveau)
2. Tb-specifieke antigenen (rode sluiting met witte ring) (voor hoogtes tot max. 810 m boven zeeniveau)
3. Mitogen-controle – optioneel (lila sluiting met witte ring) (voor hoogtes tot max. 810 m boven zeeniveau)

4. Nulcontrole (grijze sluiting met gele ring) (voor hoogtes tussen 1020 en 1875 m)
5. Tb-antigen (rode sluiting met gele ring) (voor hoogtes tussen 1020 en 1875 m)
6. Mitogen-controle – optioneel (lila sluiting met gele ring) (voor hoogtes tussen 1020 en 1875 m)

De antigenen bevinden zich in gedroogde vorm in de coating van de binnenwand van de bloedafnamebuisjes. Daarom moeten de bloedmonsters zorgvuldig worden vermengd met de inhoud van het buisje. De buisjes worden vervolgens zo spoedig mogelijk, uiterlijk 16 uur na de bloedafname, overgebracht naar een incubator (37°C).

Voor optimale resultaten moeten de volgende instructies worden opgevolgd:

1. Verzamel van elke patiënt 1 ml veneus bloed in elk van de QuantiFERON®-TB Gold IT bloedafnamebuisjes.

- Tot op een hoogte van 810 m moet gebruik worden gemaakt van de QuantiFERON® standaard-bloedafnamebuisjes. Op hoogten van meer dan 1020 m moet gebruik worden gemaakt van de speciale QuantiFERON® bloedafnamebuisjes voor grote hoogten.

Bij gebruik van de QuantiFERON® bloedafnamebuisjes buiten de genoemde hoogtebereiken of bij lage testvolumes kan het bloed ook worden afgetapt met een spuit; in dat geval wordt in elk van de drie buisjes 1 ml bloed gedaan.

Uit veiligheidsoverwegingen kan men hiervoor het best de naald van de spuit verwijderen; neem hierbij a.u.b. de gebruikelijke voorzorgsmaatregelen in acht. Verwijder de sluiting van de drie QFT-Gold IT buisjes en doe in elk buisje 1 ml bloed (tot aan de zwarte markering aan de zijkant van het etiket). Breng vervolgens de sluiting weer aan en meng zoals hieronder beschreven.

- Aangezien de 1-ml-buisjes het bloed relatief langzaam opnemen, dient u het buisje nog 2 à 3 seconden lang op de naald te houden nadat het lijkt alsof het gewenste niveau is bereikt. Dit garandeert dat de benodigde hoeveelheid bloed wordt afgetapt.

De zwarte markering aan de zijkant van het buisje is de 1-ml-markering. De QuantiFERON®-TB Gold bloedafnamebuisjes zijn gevalideerd voor volumes van 0,8 tot 1,2 ml. Als deze markering bij bloedafname niet wordt bereikt, is het raadzaam een nieuw bloedmonster te nemen.

- Bij gebruik van een vliedernaald voor de bloedafname moet met behulp van een leeg buisje worden gewaarborgd dat de slangverbinding is gevuld voordat het QuantiFERON®-TB Gold buisjes erop worden geplaatst.

2. Meng de inhoud van de buisjes door **5 seconden lang krachtig te schudden** (of 10x schudden). Vergewis u ervan dat de **gehele binnenwand van het buisje** met bloed is bedekt.

- Zorgvuldig mengen is belangrijk om de inhoud van het buisje volledig met het bloedmonster te vermengen.
- Bij het schudden is een zekere mate van schuimvorming te verwachten. Dit heeft geen nadelige invloed op de testprestatie en is geen reden tot ongerustheid.

3. Etiketdeer de buisjes.
4. De buisjes moeten zo spoedig mogelijk, maar uiterlijk 16 uur na de bloedafname, worden overgebracht naar een incubator (37°C). Bewaar de bloedmonsters niet in een koelkast of diepvrieskast!

6. GEBRUIKSAANWIJZING

Stap 1: Incubatie van het bloedmonster en afnemen van plasma

Meegeleverde materialen

QuantiFERON[®]-TB Gold IT bloedafnamebuisjes (zie hoofdstuk 3).

Benodigde materialen (niet meegeleverd)

zie hoofdstuk 3.

Procedure

1. Als de bloedmonsters niet onmiddellijk na de bloedafname worden geïncubeerd, moeten de **buisjes vlak voor de incubatie opnieuw worden gemengd resp. geschud**, zoals beschreven in hoofdstuk 5.
2. Incubeer de buisjes **RECHTOPSTAAND** gedurende 16 tot 24 uur bij 37°C. CO₂ of bevochtiging is hierbij niet vereist.
3. De bloedafnamebuisjes kunnen vóór het centrifugeren max. 3 dagen lang bij 2–27°C bewaard worden.
4. Na de incubatie van de buisjes bij 37°C worden deze voor het eenvoudiger extraheren van het plasma gedurende 5–15 minuten bij 1500–2200g (RCF) gecentrifugeerd. Door propvorming scheiden de cellen zich van het plasma af. Als dit niet gebeurt moeten de buisjes bij een hogere snelheid opnieuw worden gecentrifugeerd.
 - Het plasma kan ook zonder centrifugeren worden geëxtraheerd; hierbij moet echter heel voorzichtig te werk worden gegaan om bij de plasmascheiding niet de cellen te laten opwarrelen.
5. De plasmamonsters kunnen rechtstreeks van de bloedafnamebuisjes naar de QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA-plaat worden overgebracht, vooral bij gebruik van een ELISA-automaat.
6. Als alternatief kunnen de plasmamonsters voor de ELISA worden opgeslagen, ofwel rechtstreeks in de gecentrifugeerde buisje of ze worden verzameld in plasma-opslagreservoirs (bijv. >150 µl in de wells of in microbuisjes in een rek in 96-well-formaat). Bij de opslag van de monsters moeten de platen worden afgedekt om verlies door morsen of verdamping te voorkomen.
 - De plasmamonsters kunnen bij 2–8°C gedurende max. 4 weken worden bewaard; bij een opslagtemperatuur onder de –20°C (bij voorkeur minder dan –70°C) kunnen ze nog langer worden bewaard.

Stap 2: Human-IFN- γ ELISA

Meegeleverde materialen

QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA-kit (zie hoofdstuk 3).

Benodigde materialen (niet meegeleverd)

zie hoofdstuk 3.

Procedure

1. Alle plasmamonsters en reagentia met uitzondering van het 100x conjugaatconcentraat moeten voor gebruik op kamertemperatuur worden gebracht ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$). Plan hiervoor minstens 60 minuten in.
2. Neem niet-benodigde platen uit het frame, doe deze terug in de folieverpakking en bewaar ze in de koelkast totdat ze nodig zijn.
Neem minstens één plaat voor de QuantiFERON[®]-TB Gold standaarden en een voldoende aantal platen voor de te testen patiënten (zie afbeeldingen 2A en 2B voor het gebruik van 2 resp. 3 buisjes). Bewaar na gebruik het frame en het deksel voor de resterende platen.
3. Reconstitueer de gevriesdroogde kit-standaard met de op het etiket van het standaardflesje aangegeven hoeveelheid gedeïoniseerd of gedistilleerd water. Meng het flesje voorzichtig (om schuimvorming tegen te gaan) en vergewis u ervan dat de inhoud volledig is opgelost. Door reconstitutie van de standaard tot het aangegeven volume ontstaat een oplossing met een concentratie van 8,0 IE/ml.

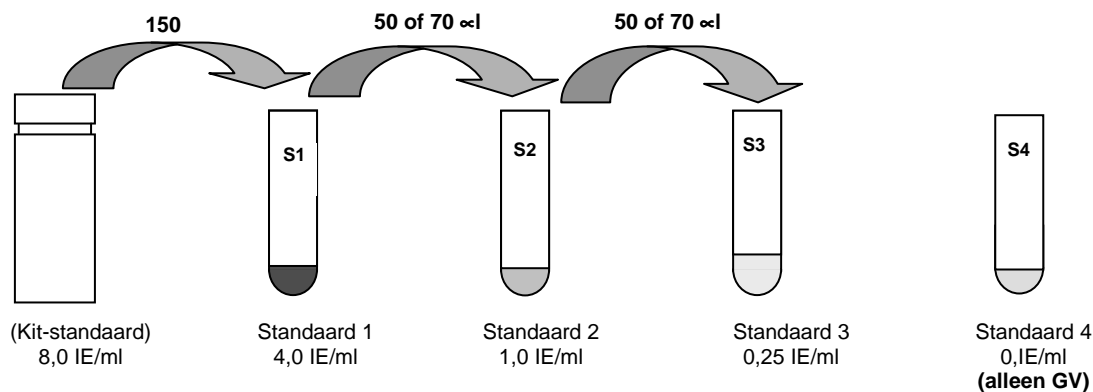
Aanwijzing: Het reconstitutievolume van de kit-standaard verschilt afhankelijk van de partij!

Gebruik de gereconstitueerde kit-standaard voor de productie van een 1:4-verdunningsserie van IFN- γ in een groene verdunningsoplossing (GV) – zie afbeelding 1. S1 (standaard 1) bevat 4 IE/ml, S2 (standaard 2) bevat 1 IE/ml, S3 (standaard 3) bevat 0,25 IE/ml en S4 (standaard 4) bevat 0 IE/ml (slechts GV). **De standaarden moeten minstens dubbel worden getest.**

AANBEVOLEN METHODE VOOR DUBBELE STANDAARDEN
a. Etiket 4 buisjes met “S1”, “S2”, “S3” en “S4”.
b. Voeg 150 μl GV toe aan S1, S2, S3, S4.
c. Voeg 150 μl kit-standaard toe aan S1 en meng zorgvuldig.
d. Breng 50 μl van S1 over naar S2 en meng zorgvuldig.
e. Breng 50 μl van S2 over naar S3 en meng zorgvuldig.
f. “Alleen GV” dient als nulstandaard (S4).

AANBEVOLEN METHODE VOOR DRIEVOUDIGE STANDAARDEN
a. Etiket 4 buisjes met “S1”, “S2”, “S3” en “S4”.
b. Voeg 150 μl GV toe aan S1.
c. Voeg 210 μl GV toe aan S2, S3, S4.
d. Voeg 150 μl kit-standaard toe aan S1 en meng zorgvuldig.
e. Breng 70 μl van S1 over naar S2 en meng zorgvuldig.
f. Breng 70 μl van S2 over naar S3 en meng zorgvuldig.
g. “Alleen GV” dient als nulstandaard (S4).

Afbeelding 1. Standaardcurve maken



- Maak voor elke ELISA-bewerking nieuwe verdunningen van de kit-standaard.
4. Reconstitueer het gevriesdroogde 100x conjugaatconcentraat met 0,3 ml gedeïoniseerd of gedistilleerd water. Meng het flesje voorzichtig (om schuimvorming tegen te gaan) en vergewis u ervan dat de inhoud volledig is opgelost.

Het kant-en-klare conjugaat wordt gemaakt door de benodigde hoeveelheid gereconstitueerd 100x conjugaatconcentraat in een groene verdunningsoplossing te verdunnen, zoals vermeld in tabel 1 (voorbereiding van het conjugaat).

TABEL 1. Voorbereiding van het conjugaat

AANTAL PLATEN	HOEVEELHEID 100x CONJUGAAT- CONCENTRAAT	HOEVEELHEID GROENE VERDUNNINGS- OPLOSSING
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

- Meng grondig, maar voorzichtig; voorkom daarbij schuimvorming.
 - Sla niet-benodigd 100x conjugaatconcentraat onmiddellijk na gebruik weer op bij 2-8°C.
 - Gebruik ter verdunning slechts de groene verdunningsoplossing.
5. Meng het plasma vóór de test opdat het IFN- γ gelijkmatig in het monster wordt verdeeld.
 6. Voeg met behulp van een meerkanaalspipet 50 μ l van het vers bereide kant-en-klare conjugaat toe aan de desbetreffende ELISA-wells.
 7. Voeg met een meerkanaalspipet 50 μ l van de plasmamonsters toe aan de desbetreffende wells (zie aanbevolen vulschema, onderstaande afbeeldingen 2A en 2B). Voeg ten slotte elk 50 μ l toe aan de standaarden 1 tot 4.

Afbeelding 2A. Aanbevolen plaat-vulschema voor nulcontrole- en tb-antigenbuisjes (44 tests per plaat)

Rij	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 (standaard 1), S2 (standaard 2), S3 (standaard 3), S4 (standaard 4).
- 1N (monster 1, nulcontroleplasma); 1A (monster 1, tb-antigenplasma).

Afbeelding 2B. Aanbevolen plaat-vulschema voor nulcontrole-, tb-antigen- en mitogen-buisjes (28 tests per plaat)

Rij	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 (standaard 1), S2 (standaard 2), S3 (standaard 3), S4 (standaard 4).
- 1N (monster 1, nulcontroleplasma); 1A (monster 1, tb-antigenplasma); 1M (monster 1, mitogencontroleplasma).

- Meng conjugaat en plasmamonsters/standaarden zorgvuldig gedurende 1 minuut in de schudder voor microtiterplaten.
- Dek iedere plaat af met een deksel en incubeer de platen gedurende 120 ± 5 minuten bij kamertemperatuur ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Bescherm de platen tijdens de incubatie tegen direct invallend zonlicht.
- Verdun tijdens de incubatie één deel 20x wasbufferconcentraat met 19 delen gedeïoniseerd of gedistilleerd water en meng dit zorgvuldig. Het standaardpakket bevat voldoende 20x wasbufferconcentraat voor de aanmaak van 2 liter kant-en-klare wasbuffer.

Was de wells minstens 6 keer met 400 µl kant-en-klare wasbuffer. Wij adviseren gebruik te maken van een wasautomaat voor microtiterplaten.

- Zorgvuldig wassen is van groot belang voor de testprestatie. Vergewis u er bij elke wascyclus van dat alle wells **volledig** tot boven met wasbuffer zijn **gevuld**. Het is raadzaam tussen de wascycli telkens een inweektijd van minstens 5 seconden aan te houden.
- Voeg een in laboratoria gebruikelijk desinfecterend middel toe aan de opvangbak voor afvalvloeistoffen. Neem daarnaast de in uw laboratorium geldende aanwijzingen voor de ontsmetting van potentieel besmettelijk materiaal in acht.

11. Verwijder de resterende wasbuffer door met de platen – met de wells naar beneden – op een tissue te tikken. Doe vervolgens 100 µl enzym-substraatoplossing in elke well en meng de platen in een schudder.
12. Dek iedere plaat af met een deksel en incubeer ze gedurende 30 ± 5 minuten bij kamertemperatuur ($22 \pm 5^\circ\text{C}$).
 - Bescherm de platen tijdens de incubatie tegen direct invallend zonlicht.
13. Voeg na de 30 minuten durende incubatie 50 µl enzym-stopoplossing toe aan elke well en meng dit.
 - De enzym-stopoplossing moet in dezelfde volgorde en ongeveer in het zelfde tempo in de wells worden aangebracht als het substraat in stap 11.
14. Meet – m.b.v. een 450-nm-filter en een 620 tot 650 nm-referentiefilter – de optische dichtheid (OD) van elke well binnen 5 minuten na toevoeging van de stopoplossing met behulp van een leesapparaat voor microtiterplaten. De OD-waarden zijn nodig voor de berekening van de resultaten.

7. BEREKENINGEN EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Cellestis stelt QuantiFERON[®]-TB Gold IT-analysesoftware aan u beschikbaar voor het analyseren van de oorspronkelijke gegevens en het berekenen van de resultaten.

De software bepaalt de kwaliteitscontrole van de test, maakt de standaardcurve en levert voor elke geteste patiënt een resultaat op basis van de onderstaande interpretatiemethode.

Als alternatief voor het gebruik van de QuantiFERON[®]-TB Gold IT-analysesoftware kunnen de resultaten ook worden berekend met de onderstaande methode:

Standaardcurve maken

(indien geen gebruik wordt gemaakt van de QuantiFERON[®]-TB Gold IT software)

Bereken de gemiddelde OD-waarden van de kit-standaard-herhalingen op elke plaat.

Maak een $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standaardcurve door de grafische weergave van de $\log_{(e)}$ van de gemiddelde OD-waarde (y-as) t.o.v. de $\log_{(e)}$ van de IFN- γ -concentratie van de standaard in IE/ml (x-as), waarbij de nulstandaard bij deze berekening wordt weggelaten. Bereken de lijn met de beste pasvorm voor de standaardcurve via regressie-analyse.

Gebruik de standaardcurve voor de berekening van de IFN- γ -concentratie (IE/ml) voor iedere getest plasmamonster met gebruikmaking van de OD-waarde van elk monster.

Voor deze berekeningen kan gebruik worden gemaakt van softwarepakketten die geschikt zijn voor microtiterplaat-leesapparaten, alsmede van standaard-spreadsheet- of -statistiekprogramma's (zoals Microsoft Excel). Wij adviseren gebruik te maken van zulke softwarepakketten voor het berekenen van de regressieanalyse, van de variatiecoëfficiënt (%VC) van de standaarden en van de correlatiecoëfficiënt (r) voor de standaardcurve.

Kwaliteitscontrole

De juistheid van de testresultaten hangt af van het maken van een correcte standaardcurve. Daarom moeten de van de standaarden afgeleide resultaten worden gekeurd voordat de testresultaten mogen worden geïnterpreteerd.

De ELISA is geldig als is voldaan aan alle onderstaande criteria:

- **De gemiddelde OD-waarde van standaard 1 moet $\geq 0,600$ liggen.**
- **De VC in % van de gerepliceerde OD-waarden van standaard 1 en standaard 2 moet $\leq 15\%$ bedragen.**
- **De gerepliceerde OD-waarden van standaard 3 en standaard 4 mogen niet meer dan 0,040 OD-eenheden afwijken van de desbetreffende gemiddelde waarde.**
- **De uit de gemiddelde absorptiewaarden van de standaarden berekende correlatiecoëfficiënt (r) moet $\geq 0,98$ bedragen.**

De QuantiFERON®-TB Gold IT-analysesoftware berekent deze parameter voor kwaliteitscontrole.

Als niet wordt voldaan aan deze criteria, is de test ongeldig en moet deze worden herhaald.

- **De gemiddelde OD-waarde van de nulstandaard (groene verdunningsoplossing) moet $\leq 0,150$ bedragen. Als de gemiddelde OD-waarde $> 0,150$ ligt, is het raadzaam de methode voor het wassen van de platen te controleren.**

Interpretatie van de resultaten

De QuantiFERON®-TB Gold IT testresultaten worden geïnterpreteerd volgens de volgende criteria:

AANWIJZING: het diagnosticeren resp. uitsluiten van tbc en de het beoordelen van de waarschijnlijkheid van een LTBI vereist een combinatie van epidemiologische, historische, medische en diagnostische bevindingen waarmee bij de interpretatie van de QuantiFERON®-TB Gold IT testresultaten rekening moet worden gehouden.

BIJ GEBRUIK VAN NULCONTROLE- EN TB-ANTIGENBUISJES

Nul [IE/ml]	Tb-antigen minus nul [IE/ml]	QuantiFERON®-TB Gold IT resultaat	Rapport/interpretatie
≤ 8,0	< 0,35	negatief	<i>M. tuberculosis</i> -infectie NIET waarschijnlijk
	≥ 0,35 en < 25% van de nulcontrole-waarde		
	≥ 0,35 en ≥ 25% van de nulcontrole-waarde	positief ¹	<i>M. tuberculosis</i> -infectie waarschijnlijk
> 8,0 ²	willekeurig	onduidelijk ³	resultaten voor tb-antigenreactie onduidelijk

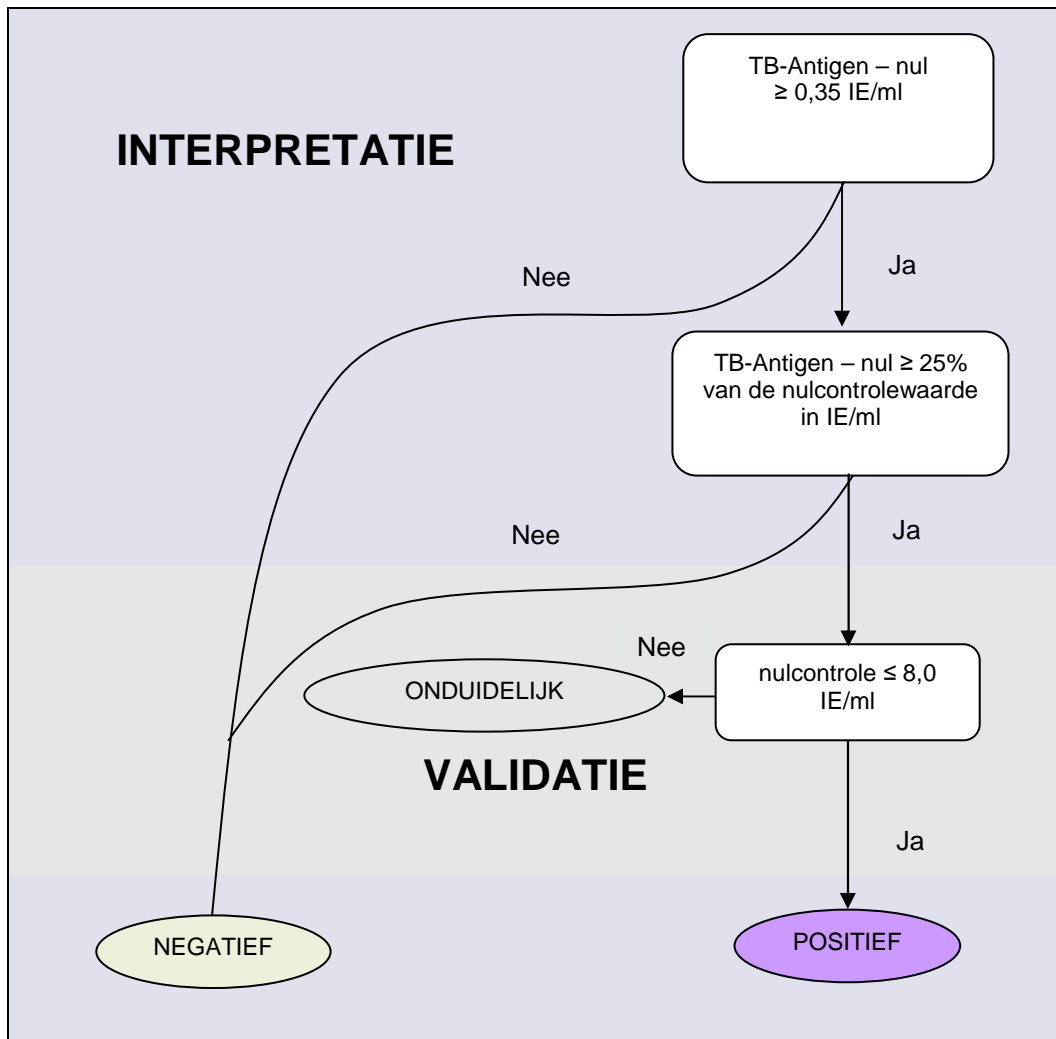
¹ Als er geen vermoeden van een *M. tuberculosis*-infectie bestaat, kunnen aanvankelijk positieve resultaten worden bevestigd door de originele plasmamonsters in de QuantiFERON®-TB Gold ELISA opnieuw dubbel te testen. Als de herhaalde test bij het eerste of tweede monster een positief resultaat oplevert, moet het testresultaat als positief worden beoordeeld.

² In klinisch onderzoek vertoonde minder dan 0,25% van de deelnemers bij de nulcontrole een IFN- γ -concentratie van > 8,0 IE/ml.

³ Voor mogelijke oorzaken zie hoofdstuk probleemoplossing.

Op grond van de hoogte van de gemeten IFN- γ -concentratie kunnen geen conclusies worden getrokken over het stadium of de mate van infectie, de omvang van de immuunreactiviteit of de waarschijnlijkheid van een progressie bij actieve tbc.

**Afbeelding 3. STROOMDIAGRAM VOOR DE INTERPRETATIE
(BIJ GEBRUIK VAN DE NULCONTROLE- en TB-ANTIGEN-BUISJES)**



BIJ GEBRUIK VAN NULCONTROLE-, TB-ANTIGEN- EN MITOGENBUISJES:

Nul [IE/ ml]	Tb-antigen minus nul [IE/ml]	Mitogen min nul [IE/ ml] ¹	QuantiFERON®-Tb Gold IT resultaat	Rapport/interpretatie
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	negatief	<i>M. tuberculosis</i> -infectie NIET waarschijnlijk
	≥ 0,35 en < 25% van de nulcontrole-waarde	≥ 0,5		
	≥ 0,35 en ≥ 25% van de nulcontrole-waarde	willekeurig	positief ²	<i>M. tuberculosis</i> -infectie waarschijnlijk
	< 0,35	< 0,5	onduidelijk ³	resultaten voor tb-antigenreactie onduidelijk
	≥ 0,35 en < 25% van de nulcontrole-waarde	< 0,5		
> 8,0 ⁴	willekeurig	willekeurig		

¹ De reactie van de positieve mitogencontrole (en af en toe ook van het tb-antigen) valt vaak buiten het meetbereik van het leesapparaat voor microtiterplaten. Dit heeft echter geen invloed op de testresultaten.

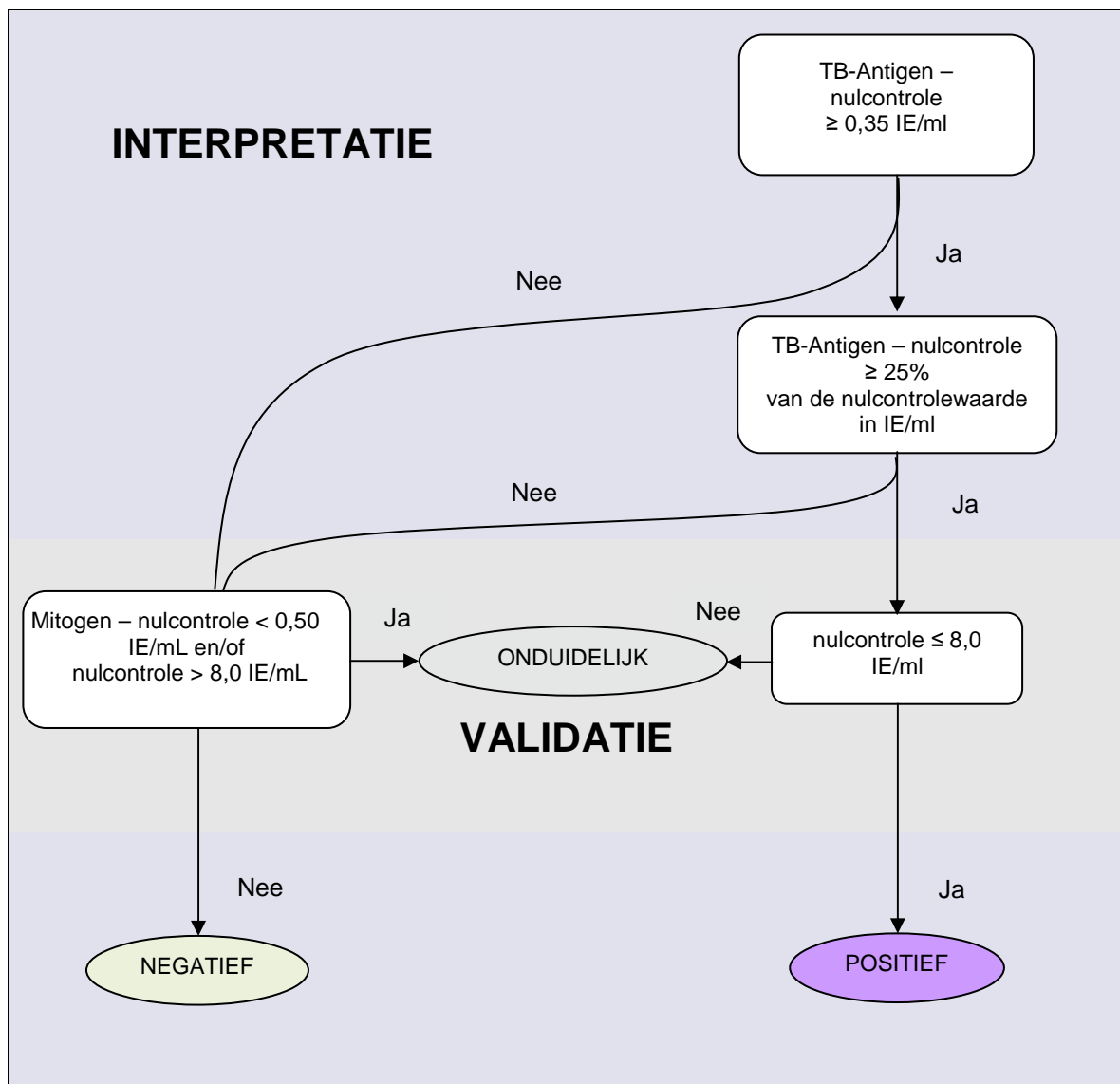
² Als er geen vermoeden van een *M. tuberculosis*-infectie bestaat, kunnen aanvankelijk positieve resultaten worden bevestigd door de originele plasmamonsters in de QuantiFERON®-TB Gold ELISA opnieuw dubbel te testen. Als de herhaalde test bij het eerste of tweede monster een positief resultaat oplevert, moet het testresultaat als positief worden beoordeeld.

³ Voor mogelijke oorzaken zie hoofdstuk probleemoplossing.

⁴ In klinisch onderzoek vertoonde minder dan 0,25% van de deelnemers bij de nulcontrole een IFN- γ -concentratie van > 8,0 IE/ml.

Op grond van de hoogte van de gemeten IFN- γ -concentratie kunnen geen conclusies worden getrokken over het stadium of de mate van infectie, de omvang van de immuunreactiviteit of de waarschijnlijkheid van een progressie bij actieve tbc.

Afbeelding 4: STROOMDIAGRAM VOOR DE INTERPRETATIE (BIJ GEBRUIK VAN NULCONTROLE-, TB-ANTIGEN- EN MITOGENBUISJES)



8. BEPERKINGEN VAN DE METHODE

De resultaten van de QuantiFERON®-TB Gold IT-test moeten worden beschouwd in combinatie met de epidemiologische achtergrond van elke afzonderlijke patiënt, zijn huidige gezondheidstoestand en overige diagnostische onderzoeken.

Resultaten met een nulwaarde boven de 8 IE/ml moeten worden beoordeeld als “onduidelijke uitslag”, omdat een 25% verhoogde tb-antigen-reactie buiten het meetbereik van de test kan liggen.

Onbetrouwbare of onduidelijke resultaten kunnen de volgende oorzaken hebben:

- afwijkingen van de in de bijsluiters beschreven procedures
- uiterst hoge concentraties circulerend IFN- γ of de aanwezigheid van heterofiele antilichamen
- overschrijding van de termijn van 16 uur tussen bloedafname en incubatie bij 37°C

9. PRESTATIEKENMERKEN

Klinisch onderzoek

Daar er voor de latente tuberculose-infectie (LTBI) geen definitieve standaard bestaat, kan een schatting van de gevoeligheid en specificiteit van de QuantiFERON®-TB Gold IT-test niet praktisch worden geëvalueerd. De specificiteit van QuantiFERON® TB Gold IT is bij benadering vastgesteld door evaluatie van het percentage fout-positieve resultaten bij personen met gering risico van (d.w.z. zonder bekende risicofactoren voor) een tuberculose-infectie. De gevoeligheid is bij benadering vastgesteld door evaluatie van patiëntengroepen met actieve tbc die was bevestigd door een cultuur.

Specificiteit

In een VS-Amerikaans onderzoek met 866 deelnemers is bij de uitvoering van de TST een bloedmonster genomen voor de QuantiFERON®-TB Gold IT-test. De demografische gegevens en tb-risicofactoren zijn vastgesteld met behulp van een standaardenquête uitgevoerd tijdens de test. Van de 432 deelnemers zonder bekende risicofactoren voor een *M. tuberculosis*-infectie waren QuantiFERON®-TB Gold IT- en TST-resultaten voor 391 personen beschikbaar. Geen van deze personen was gevaccineerd met BCG. Een tweede specificiteitsonderzoek met de QuantiFERON®-TB Gold IT-test is uitgevoerd in Japan onder deelnemers met gering risico; ongeveer 90% van deze personen was gevaccineerd met BCG. De resultaten van beide specificiteitsonderzoeken zijn weergegeven in tabel 2.

TABEL 2. Specificiteit van de QuantiFERON®-TB Gold IT-test: resultaten van deelnemers zonder bekende risicofactoren voor een *M. tuberculosis*-infectie.

ONDERZOEK	BCG status: % gevaccineerd	Aantal geteste personen	Aantal onduidelijke resultaten in de QFT-G	Aantal QFT- G- positieve / aantal geldige tests	Specificiteit van het QFT-G (95% CI**)	Aantal TST- positieve / aantal tests	Specificiteit van het TST* (95% CI**)
VS (ongepubliceerd)	0%	391	1	3/390	99,2% (97,6-99,8)	6/391	98,5% (96,5-99,4)
Japan (ongepubliceerd)	~90%	190	4	3/186	98,4% (95-99,6)	--	--
TOTAAL		581	5/584 (0,9%)	6/576	99,0%	--	--

* op basis van een TST-grenswaarde van 10 mm. Bij gebruik van een grenswaarde van 15 mm bedraagt de geschatte TST-specificiteit 99,1%.

** CI = confidentie-interval

Gevoeligheid voor actieve tbc

Ter berekening van de gevoeligheid van de QuantiFERON®-TB Gold IT-test zijn personen getest uit Australië en Japan van wie werd vermoed dat ze tbc hadden en van wie naderhand door een cultuur is bevestigd dat zij inderdaad een *M. tuberculosis*-infectie hadden. Er bestaat weliswaar voor de latente tuberculose-infectie (LTBI) geen definitieve standaard, maar een microbiologische cultuur van *M. tuberculosis* is een adequate vervanging, omdat zieke personen per definitie geïnfecteerd zijn. De patiënten zijn vóór de bloedafname voor de QuantiFERON®-TB Gold IT-test minder dan 8 dagen behandeld.

In tabel 3 zijn de resultaten van de twee groepen van de voor de *M. tuberculosis*-cultuur positieve patiënten weergegeven. De totale gevoeligheid van de QuantiFERON®-TB Gold IT-test voor een actieve tuberculose bedroeg 89% (48/54).

TABEL 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: personen met een op basis van een cultuur bevestigde *M. tuberculosis*-infectie.

ONDERZOEK		Ziekte bevestigd door	Aantal QFT-Gold-positieve / aantal geldige tests	Gevoeligheid van QFT-Gold (95% CI*)
Japanse tbc-patiënten/ Validatieonderzoek		Cultuur	24/27	89% (72-96%)
Australische tbc-patiënten /validatie- onderzoek	pulmonaal	Cultuur	7/10	70% (40-89%)
	extra-pulmonaal		17/17	100% (82-100%)
TOTAAL			48/54	89% (78-95%)

*CI = confidentie-interval

Diagnose van de LTBI

Er is een aantal onderzoeken gepubliceerd die de prestatie van de QuantiFERON®-TB Gold IT bij verschillende LTBI-risicopopulaties aantonen. De belangrijkste gegevens van een aantal onderzoeken zijn weergegeven in tabel 4.

TABEL 4. Een aantal gepubliceerde onderzoeken over het gebruik van QuantiFERON®-TB Gold IT bij LTBI-risicopopulaties

ONDERZOEK	Totaal aantal geteste personen	Resultaten
Med. personeel in India (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁷	726	Omgeving met zeer hoog tbc-percentages. 40% QFT-Gold IT-positief resp. 41% TST-positief bij grenswaarde 10 mm. Hoge overeenstemming met TST, geen effect van BCG op de tests. Beide tests hielden verband met de risicofactoren "leeftijd" en "duur van het arbeidsverleden in de gezondheidszorg".
HIV-positieven in Denemarken (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	Het vóórkomen van de LTBI bedroeg in de QFT-Gold IT 4,6% (27/590) bij HIV-positieven. De positieve resultaten stonden in verband met tbc-risico's. Twee QFT-Gold IT-positieve patiënten ontwikkelden binnen één jaar een actieve tbc. Onduidelijke resultaten (n=20, 3,4%) waren nauw verbonden met van een CD4-aantal van <100 / µL.
Stationair behandelde kinderen (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Kinderen met tbc-verdenking of voorafgaand tbc-contact werden getest met QFT-Gold IT en TST. 10,5% QFT-Gold IT-positief resp. 9,5% TST-positief bij grenswaarde 10mm. Overeenstemming tussen de tests in totaal 95,2% resp. 100% bij niet-BCG-gevaccineerden.
Duitsers met tbc-contact (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	De naaste contactpersonen van 15 verschillende indexgevallen werden getest. 51% was BCG-gevaccineerd, 27% in het buitenland geboren. 70% van de BCG-gevaccineerden en 18% van de niet-gevaccineerden was TST-positief (5 mm) en 9% resp. 11% was QFT-Gold IT-positief. QFT-Gold IT stond in verband met het tbc-risico. TST stond slechts in verband met de BCG-vaccinatie.

De prestatie van de minder gevoelige vloeibare antigen-versie van QuantiFERON®-TB Gold (de voorloper van QuantiFERON®-TB Gold IT) en van de QuantiFERON®-TB Gold IT-test zijn beschreven in veel publicaties. Deze onderzoeken omvatten eveneens het gebruik van de test bij contactpersonen van patiënten met actieve tbc^{9,11,19,25}, kinderen^{6-10,25,28}, HIV-positieven^{2,5,20}, medisch personeel^{13,26,32}, immunodeficiënte personen^{3,4,22,23,27,30,31} en personen met tbc-verdenking^{7,8,10,18} en zulke met een gering risico¹⁵.

Herhaalbaarheid en effect van de TST op latere QuantiFERON®-TB Gold IT-tests

In het kader van het VS-specificiteitsonderzoek werd een subgroep van de deelnemers 4 tot 5 weken na de oorspronkelijke test onderzocht. Voor 260 deelnemers waren dus resultaten van beide testtijdstippen uit de QuantiFERON®-TB Gold IT-test en de TST-test beschikbaar; de overeenstemming bedroeg 99,6% (259/260). Een voorafgaande TST leidde niet tot toegenomen positieve resultaten in de QuantiFERON®-TB Gold IT.

10. TECHNISCHE INFORMATIE

Onduidelijke resultaten

Onduidelijke resultaten mogen slechts zelden optreden en kunnen worden veroorzaakt door de volgende technische factoren:

- overschrijding van de termijn van 16 uur tussen bloedafname en incubatie bij 37°C
- opslag van de bloedmonsters buiten de aanbevolen temperatuurbereik ($22 \pm 5^\circ\text{C}$)
- onvolledig mengen van de bloedafnamebuisjes
- onvolledig wassen van de ELISA-plaat

Als er een vermoeden bestaat van technische problemen bij de bloedafname of in de omgang met de bloedmonsters, moet de gehele QuantiFERON®-TB Gold IT-test worden herhaald met een nieuw bloedmonster. De ELISA-test van de gestimuleerde plasmamonsters kan worden herhaald als het vermoeden bestaat van onvolledig wassen of een overige afwijking van de eerder beschreven ELISA-testmethode. Onduidelijke resultaten die zijn toe te schrijven aan lage mitogen- of hoge nulwaarden, zouden bij de herhaalde test niet mogen afwijken, tenzij er bij de ELISA-test een fout is opgetreden. Onduidelijke resultaten moeten als zodanig worden doorgegeven. De arts kan vervolgens zo nodig een nieuw bloedmonster nemen of zo nodig andere onderzoeken in overweging nemen.

Gestolde plasmamonsters

Indien bij een langduriger opslag van de plasmamonsters fibrinestolsels optreden, moeten de monsters worden gecentrifugeerd totdat sedimentatie heeft plaatsgevonden; dit vereenvoudigt het pipetteren van de plasma's.

ELISA-probleemoplossing

Niet-specifieke kleurreactie

MOGELIJKE OORZAAK	OPLOSSING
Onvolledig wassen van de platen	Plaat minstens 6x met 400 µl wasbuffer per well wassen. Afhankelijk van de gebruikte wasinstallatie kunnen ook meer dan 6 wascycli nodig zijn. Het is raadzaam tussen de wascycli telkens een inweektijd van 5 seconden aan te houden.
Kruisbesmetting van de ELISA-wells	Zorgvuldig pipetteren en mengen van de monsters minimaliseert het risico.
Kit/kitonderdelen verlopen	Controleer of de vervaldatum van de kit nog niet is verlopen. Vergewis u ervan dat de standaard en het 100x conjugaatconcentraat worden gebruikt binnen 3 maanden na reconstitutie.
Enzym-substraatoplossing is besmet	Zorg ervoor dat het substraat als afval wordt verwerkt zodra dit blauwachtig is verkleurd. Vergewis u ervan dat er schone reagensreservoirs worden gebruikt.

Lage OD-waarden bij de standaards

MOGELIJKE OORZAAK	OPLOSSING
Fout bij de standaardverduunning	Maak de verduunningen van de kit-standaard precies volgens de aanwijzingen in de bijsluiters.
Pipetteerfout	Controleer of de pipetten precies volgens de aanwijzingen van de producent worden gekalibreerd en gebruikt.
Incubatietemperatuur te laag	De incubatie voor de ELISA moet plaatsvinden bij kamertemperatuur (17-27°C).
Incubatietijd te kort	De incubatietijd van de plaat met conjugaat, standaards en monsters moet 120 ± 5 minuten bedragen. De enzym-substraatoplossing wordt gedurende 30 minuten op de plaat geïncubeerd.
Verkeerd platenfilter gebruikt	De plaat moet bij 450 nm worden afgelezen met een referentiefilter van 620-650 nm.
Reagentia te koud	Alle reagentia (met uitzondering van het 100x conjugaatconcentraat) moeten voor het begin van de test op kamertemperatuur worden gebracht. Dit duurt ca. 60 minuten.
Kit/kitonderdelen zijn verlopen	Controleer of de vervaldatum van de kit nog niet is verlopen. Vergewis u ervan dat de standaard en het 100x conjugaatconcentraat worden gebruikt binnen 3 maanden na reconstitutie.

Sterke achtergrondkleuring

MOGELIJKE OORZAAK	OPLOSSING
Onvolledig wassen van de platen	Plaat minstens 6x met 400 µl wasbuffer per well wassen. Afhankelijk van de gebruikte wasinstallatie kunnen ook meer dan 6 wascycli nodig zijn. Het is raadzaam tussen de wascycli telkens een inweektijd van 5 seconden aan te houden.
Incubatietemperatuur te hoog	De incubatie voor de ELISA moet plaatsvinden bij kamertemperatuur (17-27°C).
Kit/kitonderdelen verlopen	Controleer of de vervaldatum van de kit nog niet is verlopen. Vergewis u ervan dat de standaard en het 100x conjugaatconcentraat worden gebruikt binnen 3 maanden na reconstitutie.
Enzym-substraatoplossing is besmet	Zorg ervoor dat het substraat als afval wordt verwerkt zodra dit blauwachtig is verkleurd. Vergewis u ervan dat er schone reagensreservoirs worden gebruikt.

Niet-lineaire standaardcurve en afwijkingen tussen de twee dubbelmonsters

MOGELIJKE OORZAAK	<u>OPLOSSING</u>
Onvolledig wassen van de platen	Plaat minstens 6x met 400 µl wasbuffer per well wassen. Afhankelijk van de gebruikte wasinstallatie kunnen ook meer dan 6 wascycli nodig zijn. Het is raadzaam tussen de wascycli telkens een inweektijd van 5 seconden aan te houden.
Fout bij de standaardverduunning	Maak de verdunningen van de kit-standaard precies volgens de aanwijzingen in de bijsluiters.
Onvolledig mengen	Meng de reagentia zorgvuldig door meermaals omkeren of licht wervelen alvorens deze in de wells worden gedaan.
Ongelijkmatige pipetteertechniek of onderbreking bij de testopbouw	De toevoeging van de monsters en de standaards moet op continue wijze gebeuren. Alle reagentia moeten voor het begin van de test kant-en-klaar worden toebereid.

Een video met een demonstratie van de testmethode alsmede een oplossing voor de meeste technische problemen vindt u op de cd-rom met productinformatie en technische handleidingen. Deze gratis cd-rom is rechtstreeks verkrijgbaar bij Cellestis of bij uw leverancier.

11. BIBLIOGRAFIE

A comprehensive list of QuantiFERON[®]-TB Gold references is located on the Cellestis website (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- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, 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. TESTMETHODE (VERKORTE VORM)

STAP 1: BLOEDMONSTER INCUBEREN

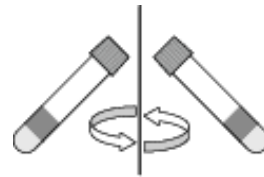
1. Neem het bloedmonster van de patiënt met behulp van de bloedafnamebuisjes en meng dit grondig door de buisjes **5 seconden lang krachtig te schudden** (of 10x schudden). De **volledige binnenwand van het buisje** moet met bloed bedekt zijn.



2. Incubeer de buisjes **staande** gedurende 16 – 24 uur bij 37°C.



3. Centrifugeer de buisjes na incubatie gedurende 5 – 15 minuten bij 1500 – 2200g (RCF) om het plasma van de rode bloedcellen te scheiden.

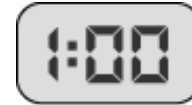


4. Verwijder na het centrifugeren uit elk buisje het plasmamonster voor de IFN- γ -kwantificering.



STAP 2: IFN- γ -ELISA

1. Laat de ELISA-bestanddelen (behalve het 100-voudig geconcentreerde conjugaatconcentraat) gedurende minstens 60 minuten bij kamertemperatuur stabiliseren.

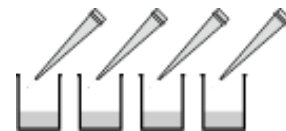


2. Reconstitueer de recombinante Human-IFN- γ -standaard met gedistilleerd of gedeïoniseerd water op 8,0 IE/ml. Bereid 4 standaardverduunningen.

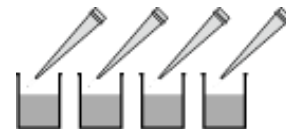


3. Reconstitueer het gevriesdroogde, 100-voudig geconcentreerde conjugaatconcentraat met gedistilleerd of gedeïoniseerd water.

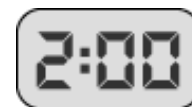
4. Bereid het conjugaat met groene verdunningsoplossing en doe 50 μ l in elke well.



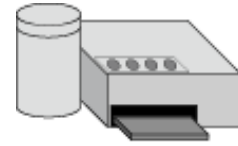
5. Vul elk 50 μ l van de plasmamonsters en 50 μ l van de standaards in de desbetreffende wells. Meng dit met behulp van de schudder.



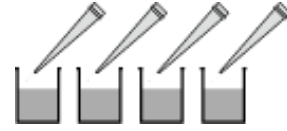
6. Laat dit gedurende 120 minuten bij kamertemperatuur incuberen.



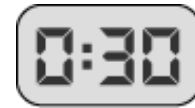
7. Was de wells minstens 6 maal met 400 μ l wasbuffer per well.



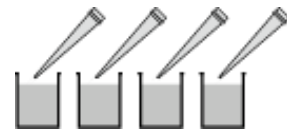
8. Doe 100 μ l enzym-substraatoplossing in elke well.



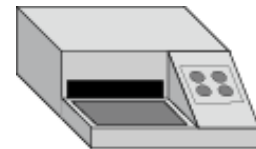
9. Laat dit gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur incuberen.



10. Doe 50 μ l stopoplossing in elke well. Meng dit met behulp van de schudder.



11. Meet de resultaten bij 450 nm met een 620-650 nm-referentiefilter.



12. Analyseer de resultaten.





Geproduceerd voor:
Cellestis Limited (Australië) en Cellestis GmbH (Europa)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australië
Tel. (Australië) +61 3 9571 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Website: www.cellestis.com

Doc.-nr. 05990301C
August 2009

EC	REP
----	-----

Bevoegd vertegenwoordiger:
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Germany

