

QuantiFERON[®]-TB Gold

(i rör)

Helblodstest för IFN-gamma
Mäter responser på
ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4) peptidantigen

BIPACK-
SEDEL

För *In Vitro*-diagnostiskt bruk



INDEX

1. AVSEDD ANVÄNDNING	2
2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET	2
Principer för analysen	3
Tidsåtgång för analysen	3
3. REAGENSER OCH FÖRVARING	4
Erforderliga material (som ej medföljer)	4
Anvisningar för förvaring	5
Provtagningsrör	5
Kitreagenser	5
Rekonstituerade och oanvända reagenser	5
4. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER	6
Varningar	6
Försiktighetsåtgärder	7
5. INSAMLING OCH HANTERING AV PROVER	8
6. ANVISNINGAR FÖR ANVÄNDNING	9
STEG ETT – Inkubation av blod och insamling av plasma	9
STEG TVÅ - Human IFN- γ ELISA	10
7. BERÄKNINGAR OCH TOLKNINGAR AV TESTET	13
Generering av standardkurva	13
Kvalitetskontroll av testet	14
Tolkning av resultaten	14
8. BEGRÄNSNINGAR	18
9. PRESTANDAKARAKTERISTIKA	18
10. TEKNISK INFORMATION	20
Indeterminanta resultat	20
Koagulerade plasmaprover	20
Felsökning av ELISA	21
Icke-specifik färgutveckling	21
Låga avläsningar av optisk densitet i standarder	21
Hög bakgrund	22
Icke-linjär standardkurva och variabilitet mellan duplikat	22
11. BIBLIOGRAFI	23
12. TEKNISK SERVICE	24
13. FÖRKORTAD TESTRUTIN	25

1. AVSEDD ANVÄNDNING

QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (IT) är ett *in vitro*-diagnostiskt test som använder en peptidblandning som simulerar ESAT-6, CFP-10 och TB7.7(p4)-proteiner i syfte att stimulera celler i hepariniserat helblod. Detektion av interferon- γ (IFN- γ) genom enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) används för identifiering av *in vitro*-responser på dessa peptidantigen som är associerade med *Mycobacterium tuberculosis*-infektion.

QuantiFERON[®]-TB Gold IT är ett indirekt test för *M. tuberculosis*-infektion (inkl. sjukdom) och är avsett att användas tillsammans med riskbedömning, radiografi och andra medicinska och diagnostiska utvärderingsmetoder.

2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Tuberkulos är en smittsam sjukdom som orsakas av infektion med organismer av *M. tuberculosis*-komplexet (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), som normalt sprids till nya smittbärare via luftburna droppar från personer med tuberkulos i luftvägarna. En nyligen infekterad person kan insjukna i tuberkulos inom några veckor till månader, men de flesta infekterade personer insjuknar inte. Somliga får en latent tuberkulosinfektion (LTBI), ett icke-smittsamt asymtomatiskt tillstånd, som inom månader eller år kan utvecklas till tuberkulossjukdom. Huvudsyftet med diagnosticering av LTBI är att kunna göra en bedömning av vilken medicinsk behandling som behövs för att LTBI:n inte ska utvecklas till tuberkulossjukdom. Till helt nyligen var tuberkulintestet (TST) den enda tillgängliga metoden för diagnosticering av LTBI. Kutan känslighet mot tuberkulin utvecklas inom 2 till 10 veckor efter infektion. Vissa infekterade individer, inkl. personer med många olika typer sjukdomstillstånd som förhindrar immunfunktioner, men även andra som inte har dessa sjukdomstillstånd, svarar inte på tuberkulin. Omvänt uppvisar vissar individer som sannolikt inte är infekterade med *M. tuberculosis* känslighet mot tuberkulin och får positiva TST-resultat efter vaccination med bacillen Calmette-Guérin (BCG), infektion med andra mykobakterier än *M. tuberculosis*-komplexet eller andra obestämda faktorer.

Åtskillnad måste göras mellan LTBI och tuberkulossjukdom, ett rapporterbart tillstånd som vanligtvis omfattar lungorna och nedre luftvägarna, men som även kan påverka andra organ. Tuberkulossjukdom diagnosticeras på basis av historiska, fysiska, radiologiska, histologiska och mykobakteriologiska resultat.

QuantiFERON[®]-TB Gold IT-testet testar cellmedierad immunitet (CMI-respons) på peptidantigen som simulerar mykobakteriella proteiner. Dessa proteiner, ESAT-6, CFP-10 och TB7.7(p4), saknas i alla BCG-stammar och i de flesta icke-tuberculosis mykobakterier, med undantag för *M. kansasii*, *M. szulgai* och *M. marinum*.¹ Individer som är infekterad med organismer ur *M. tuberculosis*-komplexet har vanligtvis lymfocyter i blodet som känner igen de här och andra mykobakteriella antigenen. Denna identifieringsprocess innefattar generering och sekretion av cytokinet IFN- γ . Detekteringen och den efterföljande kvantifieringen av IFN- γ är grundvalen för detta test.

De antigener som används i QuantiFERON[®]-TB Gold IT är peptidblandning som simulerar proteinerna ESAT-6, CFP-10 och TB7.7(p4). Flera studier har visat att dessa peptidantigen stimulerar IFN- γ -responser i T-celler från individer som har infekterats med *M. tuberculosis*, men i allmänhet inte från infekterade eller BCG-vaccinerade personer utan sjukdom eller risk för LTBI.¹⁻³² Emellertid kan medicinsk behandling eller sjukdomstillstånd som skadar immunsystemets funktioner potentiellt minska IFN- γ -responserna. Patienter med vissa andra mykobakteriella infektioner kan också svara på ESAT-6, CFP-10 och TB7.7(p4), eftersom de gener som avkodar dessa proteiner förekommer i *M. kansasii*, *M. szulgai* och *M. marinum*.^{1,23} QuantiFERON[®]-TB Gold IT-testet är både ett test för LTBI och ett hjälpmedel vid diagnosticering av infektioner av *M. tuberculosis*-komplexet hos sjuka patienter. Ett positivt resultat ger stöd för diagnosticering av tuberkulossjukdom. Emellertid kan även infektioner av andra mykobakterier (t.ex. *M. kansasii*) ge positiva resultat. Andra medicinska och diagnostiska bedömningar krävs för att tuberkulossjukdom ska kunna bekräftas eller uteslutas.

Principer för analysen

QuantiFERON®-TB Gold IT-systemet använder specifika provtagningsrör för insamling av helblod. I rören inkuberas blodet i mellan 16 och 24 timmar, varefter plasma samlas in. Härfter testas om provet innehåller IFN- γ som skapats som en respons på peptidantigenerna.

QuantiFERON®-TB Gold IT-testet utförs i två steg. Först samlas helblod in i vart och ett av QuantiFERON®-TB Gold-provtagningsrören, som innehåller ett Nil-kontrollrör, ett TB-antigenrör och ett mitogen-rör (tillval).

Mitogen-röret kan användas med QuantiFERON®-TB Gold IT-testet som en positiv kontroll. Detta kan vara en särskilt lämplig säkerhetsåtgärd om det finns tveksamhet om individens immunstatus. Mitogen-röret kan även användas som en kontroll för att blodet har hanterats och inkuberats på korrekt sätt.

Rören ska inkuberas vid 37°C så snart som möjligt och inom 16 timmar efter insamling. Efter en inkubering på 16 till 24 timmar centrifugeras rören. Härfter avlägsnas plasman och mängden IFN- γ (IU/ml) mäts med ELISA.

Ett test betraktas som positivt om en IFN- γ -respons på TB-antigenröret ligger långt högre än Nil IFN- γ IU/ml-värdet. Det mitogenstimulerade plasmaprovet (i förekommande fall) används som en IFN- γ -positiv kontroll för varje prov som testas. En låg respons på mitogen (< 0,5 IU/ml) indikerar ett indeterminant resultat, om blodprovet även ger en negativ respons på TB-antigen. Detta mönster kan uppträda om lymfocyterna är för få, vid reducerad lymfocytaktivitet till följd av att provet har hanterats på felaktigt sätt, felaktig fyllning/blandning av mitogenröret eller att patientens lymfocyter inte kan generera IFN- γ . Nil-provet justerar bakgrunden, effekterna av heterofila antikroppar⁷ eller för icke-specifik IFN- γ i blodprover. IFN- γ -nivån i Nil-röret subtraheras från IFN- γ -nivån i röret med TB-antigen och mitogenröret (i förekommande fall).

Tidsåtgång för analysen

Nedan finns uppskattningar för hur lång tid det tar att utföra QuantiFERON®-TB Gold IT-analysen. Tidsåtgången för att utföra testserier av flera prover visas även:

37°C inkubering av provtagningsrör:

16 till 24 timmar

ELISA:

Ca 3 timmar för en ELISA-platta
(28 till 44 individer)

- < 1 timmes arbete
- Lägg till 10 till 15 minuter för varje ytterligare platta

3. REAGENSER OCH FÖRVARING

Provtagningsrör för tuberkulos och kontrollantigen

Katalognummer 0590 0301

- | | |
|---------------------------------|-----------|
| 1. Nil-kontroll (grå kork) | 100 x rör |
| 2. TB-antigen (röd kork) | 100 x rör |
| 3. Mitogen-kontroll (lila kork) | 100 x rör |

OBSERVERA: Rören finns även i andra konfigurationer:

Kat.nr. 0590-0201: 100 x Nil-kontroll, 100 x TB-antigen-rör.

Kat. nr. 0593 0201: 100 x mitogenkontrollrör.

Hög höjdsrör (se avsnitt 5)

Kat.nr. 590 0501: (Höghöjds) 100 x Nil-kontroll, 100 x TB-antigenrör.

Kat.nr. 0590 0505: (Hög höjds) 100 x Nil-kontroll, 100 x TB-antigen & 100 x mitogen-rör.

Kat.nr. T0593 0501 (hög höjds) 100 x mitogenkontrollrör.

ELISA-komponenter

Katalognummer 0594 0201

- | | |
|---|----------------|
| 1. Mikroplattor | 24 x 8 brunnar |
| 2. Human IFN- γ standard, lyofiliserad | 1 x vial |
| 3. Grön diluent | 1 x 30 ml |
| 4. Konjugatkoncentrat (100X), lyofiliserat | 1 x 0,3 ml |
| 5. Tvättbuffertkoncentrat (20X) | 1 x 100 ml |
| 6. Enzymsubstratlösning | 1 x 30 ml |
| 7. Enzymstopplösning | 1 x 15 ml |

Erforderliga material (som ej medföljer)

- 37°C inkubator. CO₂ behövs ej.
- Kalibrerade pipetter med variabel volym för transport av mellan 10 μ l och 1 000 μ l med avtagbara spetsar.
- Kalibrerade multikanalspipetter som kan transportera 50 μ l och 100 μ l med avtagbara spetsar.
- Skakare för mikroplattor.
- Avjoniserat eller destillerat vatten – 2 l.
- Tvätt för mikroplattor (en automatisk tvätt rekommenderas).
- Läsare för mikroplattor med 450 nm filter och 620 nm till 650 nm referensfilter.

Anvisningar för förvaring

Provtagningsrör

- Förvara provtagningsrör vid 4°C till 25°C.
- QuantiFERON®-TB Gold-provtagningsrör kan förvaras i 15 månader från tillverkningsdatumet vid en temperatur på 4°C till 25°C.

Reagenskit

- Förvara kitet vid 2°C till 8°C.
- Utsätt aldrig enzymsubstratlösning för direkt solljus.
- QuantiFERON®-TB Gold IT ELISA-kitet kan förvaras i 3 år från tillverkningsdatumet vid en temperatur på 2°C till 8°C.

Rekonstituerade och oanvända reagenser

Se avsnitt 6 (sida 11) för anvisningar om hur reagenserna ska rekonstitueras.

- Den rekonstituerade kitstandarden kan förvaras i 3 månader vid en temperatur på 2°C till 8°C.
 - *Anteckna datumet när **kitsstandarden** rekonstituerades.*
- När kitet har rekonstituerats måste oanvänt konjugatkoncentrat (100X) återföras till förvaring vid en temperatur av 2°C till 8°C och användas inom 3 månader.
 - *Anteckna datumet när konjugatet rekonstituerades.*
- Working strength-konjugat måste användas inom 6 timmar efter beredning.
- Working strength-tvättbuffert kan förvaras vid rumstemperatur i upp till 2 veckor.

4. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Varningar

- Ett negativt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat utesluter inte möjligheten av *M. tuberculosis*-infektion eller tuberkulossjukdom: ett felaktigt negativt resultat kan bero på infektionens stadium (t.ex. om prover tas innan cellerna har hunnit utveckla immunresponser), komorbida tillstånd som påverkar immunfunktionerna, felaktig hantering av provtagningsrören efter venpunktur, felaktigt utförd analys eller immunologiska variabler.
- Ett positivt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat bör ej vara det enda eller det definitiva underlaget för att diagnosticering av *M. tuberculosis*-infektion. En felaktigt utförd analys kan leda till felaktigt positiva responser.
- Ett positivt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat ska följas av ytterligare medicinsk bedömning och diagnostik för aktiv tuberkulossjukdom (t.ex. AFB-utstrykningsprov- och odling, bröstkorgröntgen).
- Även om ESAT-6, CFP-10 och TB7.7(p4) inte förekommer i någon BCG-stam eller i de flesta kända icke-tuberkulösa mykobakterier kan ett positivt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat orsakas av en infektion av *M. kansasii*, *M. szulgai* eller *M. marinum*. Om det finns misstanke om dylika infektioner ska alternativa testmetoder utvärderas.

Försiktighetsåtgärder

- **För In Vitro–diagnostisk användning.**
- **Skadligt: Enzymsubstratlösning innehåller 3,3',5,5'** tetrametylbensidin som är skadligt vid förtäring, inhalering, och hudkontakt. Irriterande för hud och ögon. Mutagen. Använd ögonskydd, handskar och hantera lösningen som potentiellt cancerframkallande.
- **Skadligt: Enzymstopplösning** innehåller H₂SO₄ som är skadlig vid förtäring, kontakt med ögon och hud, samt inhalering. Använd ögonskydd, handskar och normala skyddskläder för laboratoriebruk. Om stopplösningen kommer i kontakt med huden eller ögonen ska området sköljas med stora mängder vatten. Därefter ska läkare uppsökas.
- **Skadligt: IFN-γ standard och konjugatkoncentrat (100X)** kan vara obehagligt att förtära och kan orsaka hudirritationer. Använd handskar och normala skyddskläder för laboratoriebruk.
- **Hantera humant blod som potentiellt infektiöst.** Följ relevanta riktlinjer för hantering av blod.
- **Tiomersal** används som konserveringsmedel i vissa reagenser. Det kan vara giftigt vid förtäring, inhalering eller hudkontakt.
- **Grön diluent** innehåller i regel musserum och kasein, vilket kan framkalla allergiska reaktioner. Undvik hudkontakt.
- Avvikelser i förhållande till bipacksedeln kan leda till felaktiga resultat. Läs anvisningarna noggrant före användning.
- Använd inte satsen om någon reagensflaska uppvisar skador eller läckage.
- Blanda eller använd inte ELISA-reagenser från andra QuantiFERON[®]-TB Gold-satser.
- Kassera oanvända reagenser eller biologiska prover i enlighet med lokala, regionala och nationella föreskrifter.
- Provtagningsrören eller ELISA-satsen får inte användas efter utgångsdatumet.

5. INSAMLING OCH HANTERING AV PROVER

QuantiFERON®-TB Gold IT använder följande provtagningsrör:

1. Nil-kontroll (grå kork med vit ring). (För höjder upp till 810 m över havet.)
2. TB-antigen (röd kork med vit ring). (För höjder upp till 810 m över havet.)
3. Mitogen-kontroll – tillval (lila kork med vit ring) (För höjder upp till 810 m över havet.)
4. Nil-kontroll (grå kork med gul ring). (För höjder mellan 1 020 m till 1 875 m över havet.)
5. TB-antigen (röd kork med gul ring). (För höjder mellan 1 020 m till 1 875 m över havet.)
6. Mitogen-kontroll – tillval (lila kork med gul ring). (För höjder mellan 1 020 m till 1 875 m över havet.)

Antigen torkar på innerväggarna i provtagningsrören. Det är därför viktigt att innehållet i rören omsorgsfullt blandas med blodet. Rören ska transporteras till en 37°C inkubator så snart som möjligt och inom 16 timmar efter insamling.

För att få ett optimalt resultat ska nedanstående rutiner tillämpas:

1. Samla upp 1 ml blod genom venpunktur i vart och ett av QuantiFERON®-TB Gold IT-blodprovtagningrören.

- Upp till 810 meters höjd skall QuantiFERON® Standard blodprovtagningrör användas. På höjder över 1 020 meter skall QuantiFERON®-blodprovtagningrör för höghöjdsbruk (HA) ska användas på höjder över 1 020 meter över havet.

Vid användning av QuantiFERON® blodprovtagningrör utanför höjdområdet eller med mindre prov-volymer kan en spruta användas för att tappa blodet; då fylls alla tre provrör med 1 ml blod. Av säkerhetsskäl skall nålen avlägsnas; vidta vanliga säkerhetsåtgärder. Ta av korkarna på de tre QFT-Gold IT-rören och fyll med 1 ml blod i varje (upp till den svarta markeringen på sidan). Sätt åter på korken och blanda enligt nedan beskrivning.

- Eftersom 1 ml rören drar ut blod relativt långsamt, ska röret hållas kvar mot nålen i 2-3 sekunder när röret verkar vara helt fyllt, för att korrekt volym blod ska ha runnit ut.

Det svarta märket på sidan av rören indikerar volymen 1 ml. QuantiFERON®-TB Gold-blodprovtagningrör är godkända för volymer mellan 0,8 och 1,2 ml. Om blodnivån i ett rör inte ligger i närheten av markeringen bör blodprovet tas om.

- Om en s.k. fjärilsnål används för blodprovet bör ett s.k. spolrör användas för att säkerställa att rören fylls med blod innan QuantiFERON®-TB Gold-rör används.

2. Blanda tuberna genom att **skaka rören kraftigt i 5 sekunder** (eller 10 gånger) för att **hela insidan av röret** ska täckas med blod.

- Blanda omsorgsfullt för att innehållet i röret ska blandas helt med blodet.
- Att blodet skummas under skakningen är att förvänta. Detta påverkar inte analysens resultat och bör inte innebära några problem för den som tar blodprovet.

3. Förse rören med lämpliga etiketter.
4. Rören ska snarast möjligt sättas i en 37°C inkubator och senast inom 16 timmar efter provtagning. Blodproverna får inte kylas eller frysas ned.

6. ANVISNINGAR FÖR ANVÄNDNING

Steg ett – Inkubation av blod och insamling av plasma

Material som medföljer

QuantiFERON[®]-TB Gold IT-blodprovtagningsrör (se avsnitt 3).

Erforderliga material (som ej medföljer)

Se avsnitt 3.

Procedur

1. Om blodet inte inkuberas direkt efter insamling **måste rören blandas igen omedelbart före inkubation** enligt beskrivningen i avsnitt 5.
2. Rören ska inkuberas **STÅENDE** vid 37°C i 16 till 24 timmar. Inkubatorn behöver inte CO₂ eller fuktas.
3. Efter inkubation vid 37°C kan blodprovtagningsrören förvaras mellan 2°C och 27°C i upp till 3 dagar före centrifugering.
4. Efter att rören har inkuberats vid 37°C samlas plasma in genom att rören centrifugeras i 15 minuter med 2 000 till 3 000 RCF (g). Gelpluggen separerar cellerna från plasman. Om separering uteblir, ska rören centrifugeras igen vid högre hastighet.
 - Plasma kan också samlas in utan centrifugering. Emellertid måste du vara extra försiktig för att inte cellerna ska skadas.
5. Plasmaproverna kan laddas direkt från blodprovtagningsrören till QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA-plattan, i synnerhet om automatiska ELISA-terminaler används.
6. Alternativt kan plasmaprover lagras före ELISA, antingen i centrifugerade rör eller insamlade i plasmabehållare. Samla t.ex. in > 150 µl plasma i brunnarna på mikroplattan eller mikrorör i ställningar i 96-brunnsformat och försegla dem för att förhindra att proverna spills ut eller förångas vid lagring.
 - Plasmaprover kan lagras i upp till 4 veckor vid 2°C till 8°C eller under –20°C (helst under –70°C) under ytterligare tid.

Steg två - Human IFN- γ ELISA

Material som medföljer

QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA-kit (se avsnitt3).

Erforderliga material (som ej medföljer)

Se avsnitt 3.

Procedur

1. Alla plasmaprover och reagenser, med undantag för konjugatkoncentrat (100X), måste ha rumstemperatur (22°C \pm 5°C) innan de används. Låt provet balanseras i minst 60 minuter.
2. Ta bort remsor som inte används från ramen. Lägg tillbaka i foliebehållaren, återförslut och lägg tillbaka i kylskåpet tills de behövs.

Minst en remsa behövs för QuantiFERON[®]-TB Gold-standarder och tillräckligt många remsor för de patienter som ska testas (se Figur 2A & 2B för 2-rörs- resp. 3-rörsformat). Ramen och locket ska sparas efter analys och användas tillsammans med de oanvända remsorna.

3. Rekonstituera den frystorkade kitstandarderna med den volym avjoniserat eller destillerat vatten som anges på standardvialens etikett. Blanda försiktigt för att minimera skumbildning och ge en fullständig solubilisering. Rekonstituering av standarderna ger en lösning med en koncentration av 8,0 IU/ml.

Observera: Rekonstitutionsvolymen för kitstandarderna varierar mellan olika serier.

Använd den rekonstituerade kitstandarderna för att skapa en 1 till 4 spädningsserie med IFN- γ i grön diluent (GD) – se Figur 1. S1 (standard 1) innehåller 4 IU/ml, S2 (standard 2) innehåller 1 IU/ml, S3 (standard 3) innehåller 0,25 IU/ml och S4 (standard 4) innehåller 0 IU/ml (bara GD). Standarderna måste minst analyseras som duplikat.

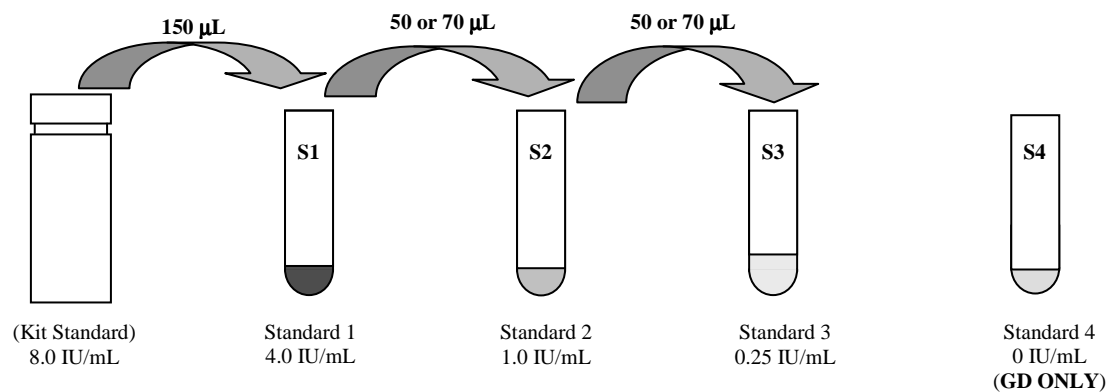
REKOMMENDERAD RUTIN FÖR DUPLIKATA STANDARDER

- a. Märk 4 rör med etiketterna "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Tillsätt **150 μ l** GD i S1, S2, S3, S4.
- c. Tillsätt **150 μ l** kitstandard i S1 och blanda väl.
- d. Häll **50 μ l** från S1 till S2 och blanda väl.
- e. Häll **50 μ l** från S2 till S3 och blanda väl.
- f. **Bara GD används som en nollstandard (S4).**

REKOMMENDERAD RUTIN FÖR TRIPLIKATA STANDARDER

- a. Märk 4 rör med etiketterna "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Tillsätt **150 μ l** GD i S1.
- c. Tillsätt **210 μ l** GD till S2, S3, S4.
- d. Tillsätt **150 μ l** kitstandard i S1 och blanda väl.
- e. Häll **70 μ l** från S1 till S2 och blanda väl.
- f. Häll **70 μ l** från S2 till S3 och blanda väl.
- g. **Bara GD används som en nollstandard (S4).**

FIGUR 1. Preparering av standardkurva



- Förbered nya spädningar av kitstandarder för varje ELISA-procedur.

4. Rekonstituera frystorkat konjugatkoncentrat (100X) med 0,3 ml avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda försiktigt för att minimera skumbildning och ge konjugatet en fullständig solubilisering.

Working Strength-konjugat prepareras genom att erforderad mängd rekonstituerat konjugatkoncentrat 100X späds i grön diluent enligt Tabell 1 – Preparering av konjugat.

TABELL 1. Preparering av konjugat

ANTAL REMSOR	VOLYM KONJUGAT KONCENTRAT (100X)	VOLYM GRÖN 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

- Blanda väl, men försiktigt för att undvika skumbildning.
- Oanvänt konjugatkoncentrat (100X) ska omedelbart efter användning återföras till förvaring vid 2°C till 8°C.
- Använd endast grön diluent.

5. Före analys ska plasman blandas för att säkerställa att IFN- γ fördelas jämnt i hela provet.
6. Tillsätt 50 µl av det Working Strength-konjugat som just har preparerats till de ELISA-brunnar som behövs för analysen med en multikanalspipett.
7. Tillsätt 50 µl av testplasmaproverna till brunnarna med multikanalspipett (se rekommenderad plattlayout nedan – Diagram 2A och 2B). Tillsätt slutligen vardera 50 µl av standarderna 1 till 4.

**DIAGRAM 2A. Rekommenderad provlayout för Nil- och TB-antigenrör
(44 tester per platta)**

	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 (prov 1. Nil-kontrollplasma); 1A (sample 1. TB-antigenplasma).

**DIAGRAM 2B. Rekommenderad provlayout för Nil-rör, TB-antigenrör och mitogenrör
(28 tester per platta)**

	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 (prov 1. Nil-kontrollplasma); 1A (sample 1. TB-antigenplasma).
1M (prov 1. mitogenkontrollplasma).

- Blanda konjugatet och plasmaproverna/standarderna väl med en skakare för mikroplattor i 1 minut.
- Täck varje platta med lock och inkubera vid rumstemperatur ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) i 120 ± 5 minuter.
 - Plattor bör inte utsättas för direkt solljus under inkubation.
- Vid inkubation ska en del tvättbuffertkoncentrat (20X) spädas med 19 delar avjoniserat eller destillerat vatten. Blanda noggrant. Tillräckligt med tvättbuffertkoncentrat (20X) medföljer för att preparera 2 l Working Strength-tvättbuffert.

Tvätta brunnarna med **400 µl** Working Strength-tvättbuffert i minst 6 cykler. En automatisk platttvättmaskin bör användas.

 - För att analysen ska bli korrekt måste brunnarna tvättas noggrant. Kontrollera att varje brunn **är fylld** med tvättbuffert **ända upp till överkanten** av brunnen under varje tvättcykel. Låt tvättbufferten verka i minst 5 sekunder mellan varje cykel.
 - Standarddesinfektionsmedel för laboratoriebruk ska tillsättas i avloppsbehållaren. Följ vedertagna rutiner för sanering av potentiellt infektiöst material.
- Vänd plattorna med ovansidan nedåt på en absorberande handduk för att avlägsna rester av tvättbuffert. Tillsätt 100 µl enzymsubstratlösning i varje brunn och blanda noggrant i en skakare för mikroplattor.
- Täck varje platta med lock och inkubera vid rumstemperatur ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) i 30 minuter.

- Plattor bör inte utsättas för direkt solljus under inkubation.
13. Efter en inkubation på 30 minuter ska 50 µl enzymstopplösning tillsättas i varje brunn och blandas ut.
- Enzymstopplösning ska tillsättas i varje brunn i samma ordning och vid ungefär samma hastighet som substratet tillsattes i steg 11.
14. Mät den optiska densiteten (OD) för varje brunn i en läsare för mikroplattor inom 5 minuter efter att reaktionen har stoppats. Läsaren ska ha ett 450 nm filter och med ett 620 nm till 650 nm referensfilter. OD-värden används för att beräkna resultaten.

7. BERÄKNINGAR OCH TOLKNINGAR AV TESTET

QuantiFERON[®]-TB Gold IT-analysprogram kan inhandlas från Cellestis och används för att analysera rådata och beräkna resultaten.

Programmet gör en kvalitetsbedömning av analysen, genererar en standardkurva och ger ett testresultat för varje ämne (läs mer i avsnittet Tolkning av resultaten).

Istället för att använda QuantiFERON[®]-TB Gold IT-analysprogram kan resultaten bestämmas enligt nedanstående metod:

Generering av standardkurva

(om QuantiFERON[®]-TB Gold IT-analysprogram inte används)

Beräkna OD-medelvärdet för kitstandardreplikaten på varje platta.

Skapa en $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standardkurva genom att rita ut loggen_(e) för den genomsnittliga OD:en (y-axeln) mot $\log_{(e)}$ för IFN- γ -koncentrationen av standarderna i IU/ml (x-axeln). Noll-standarden tas ej med i beräkningen. Beräkna standardkurvas trendlinje med regressionsanalys.

Använd standardkurvan för att bestämma IFN- γ -koncentrationen (IU/ml) för vart och ett av plasmaproverna i testet genom att använda OD-värdet för vart och ett av proverna.

Beräkningarna kan göras med hjälp av den programvara som är tillgänglig för läsare för mikroplattor och vanliga kalkyl- och statistikprogram (t.ex. Microsoft Excel). Sådan programvara ska användas för att beräkna regressionsanalysen, variationskoefficienten (%CV) för standarderna och standardkurvas korrelationskoefficient (r).

Kvalitetskontroll av testet

Hur exakt testresultatet blir beror på hur exakt standardkurvan är. Av denna anledning måste de resultat som har beräknats från standarder utvärderas innan provresultaten från testet kan tolkas.

För att ELISA ska vara giltig:

- Det genomsnittliga OD-värdet för standard 1 måste vara $\geq 0,600$.
- % CV för standard 1:s och standard 2:s replikata OD-värden måste vara ≤ 15 %.
- Replikata OD-värden för standard 3 och standard 4 får inte variera mer än 0,040 OD-enheter från medelvärdet.
- Korrelationskoefficienten (r) som beräknas från de genomsnittliga absorbansvärdena för standarderna måste vara $\geq 0,98$.

QuantiFERON[®]-TB Gold Analysis Software används för att beräkna och rapportera dessa parametrar från kvalitetskontrollen.

Om testet inte motsvarar ovanstående kriterier är det ogiltigt och måste göras om.

- Det genomsnittliga OD-värdet för nollstandard (grön diluent) bör vara $\leq 0,150$. Om det genomsnittliga OD-värdet är $> 0,150$ bör plattrengöringsproceduren ses över.

Tolkning av resultaten

QuantiFERON[®]-TB Gold IT-resultat ska tolkas med hjälp av följande kriterier:

OBSERVERA: Att diagnosticera eller utesluta tuberkulosjukdom och bedöma sannolikheten för LTBI kräver att en kombination av epidemiologiska, historiska, medicinska och diagnostiska resultat tas med i bedömningen när QuantiFERON[®]-TB Gold IT-resultaten tolkas.

OM ENDAST NIL- OCH TB-ANTIGENRÖR ANVÄNDS

Nil [IU/ml]	TB Antigen minus Nil [IU/ml]	QuantiFERON [®] -TB [IU/ml]	Rapport/tolkning
$\leq 8,0$	$< 0,35$	Negativt	<i>M. tuberculosis</i> -infektion EJ sannolik
	$\geq 0,35$ och < 25 % av Nil-värde		
	$\geq 0,35$ och ≥ 25 % av Nil-värde	Positivt ¹	<i>M. tuberculosis</i> -infektion sannolik
$> 8,0$ ²	Alla	Indeterminant ³	Resultaten är indeterminanta för TB-antigen-responsivitet

¹ Om *M. tuberculosis*-infektion inte misstänks kan initialt positiva resultat verifieras genom att ett nytt test utförs med de ursprungliga

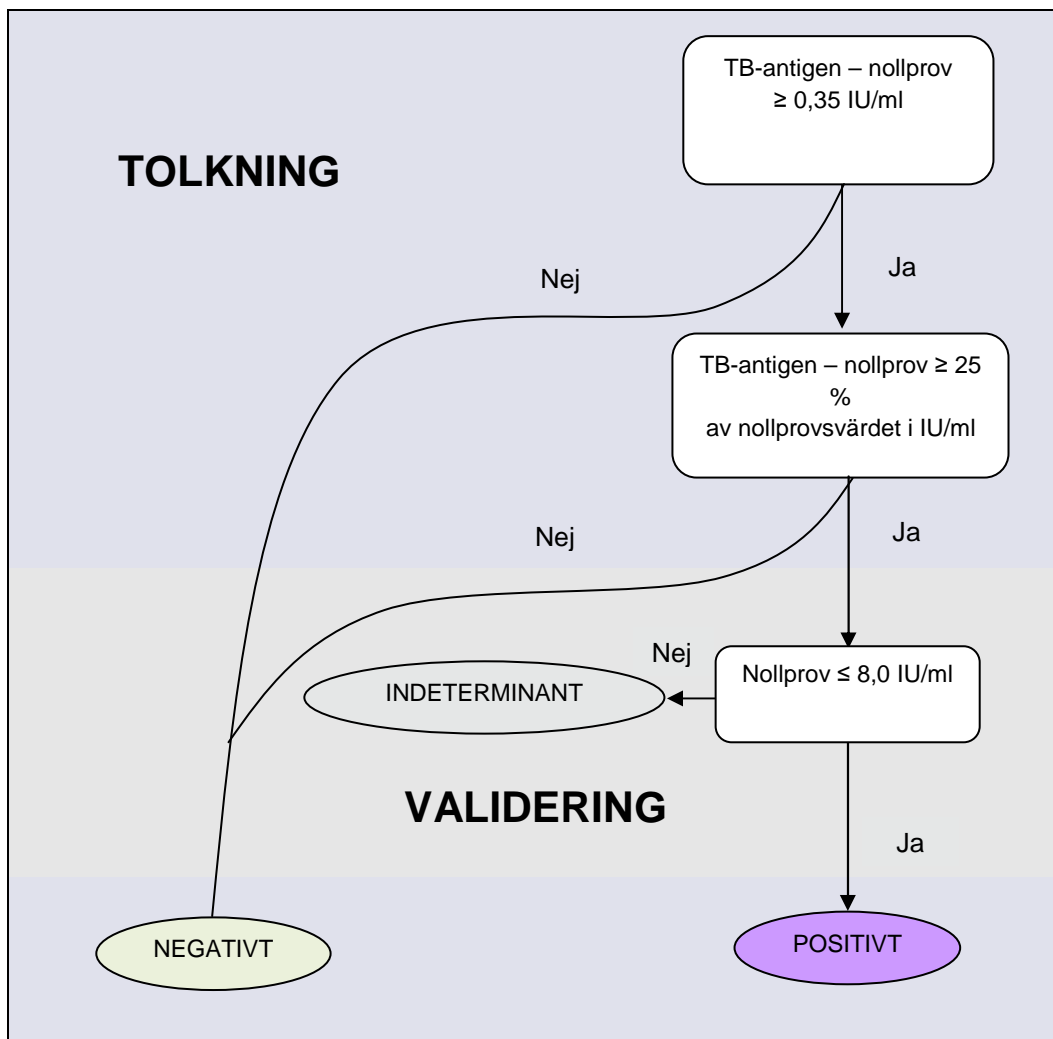
duplikata plasmaproverna med QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA. Om det nya testet av ett eller båda replikaten är positivt ska testet bedömas som positivt.

² Kliniska studier har visat att mindre än 0,25 % av ämnena hade IFN- γ -nivåer på $> 8,0$ IU/ml för Nil-kontrollen.

³ Se avsnittet Felsökning för sannolika orsaker.

Hur hög den uppmätta IFN- γ -nivån är har inget samband med infektionsstadiet eller hur omfattande infektionen är, nivån på immunresponser eller sannolikheten för att tillståndet ska utvecklas till aktiv sjukdom.

DIAGRAM 3. Flödesschema för tolkning OM NIL- OCH TB-ANTIGEN-rör används



OM NIL-, TB-ANTIGEN- OCH MITOGEN-RÖR ANVÄNDS

Nil [IU/ml]	TB Antigen minus Nil [IU/ml]	Mitogen minus Nil [IU/mL] ¹	QuantiFERON®-TB [IU/ml]	Rapport/tolkning
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativt	<i>M. tuberculosis</i> -infektion EJ sannolik
	≥ 0,35 och < 25 % av Nil-värde	≥ 0,5		
	≥ 0,35 och ≥ 25 % av Nil-värde	Alla	Positivt²	<i>M. tuberculosis</i> -infektion sannolik
	< 0,35	< 0,5	Indeterminant³	Resultaten är indeterminanta för TB-antigen-responsivitet
	≥ 0,35 och < 25 % av Nil-värde	< 0,5		
> 8,0 ⁴	Alla	Alla		

¹ Responserna på Mitogen positiv kontroll (och ibland TB-antigen) kan ligga utanför mikroplattläsarens mätområde. Detta påverkar inte testresultaten.

² Om *M. tuberculosis*-infektion inte misstänks kan initialt positiva resultat verifieras genom att ett nytt test utförs med de ursprungliga duplikata plasmaproverna med QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Om det nya testet av ett eller båda replikaten

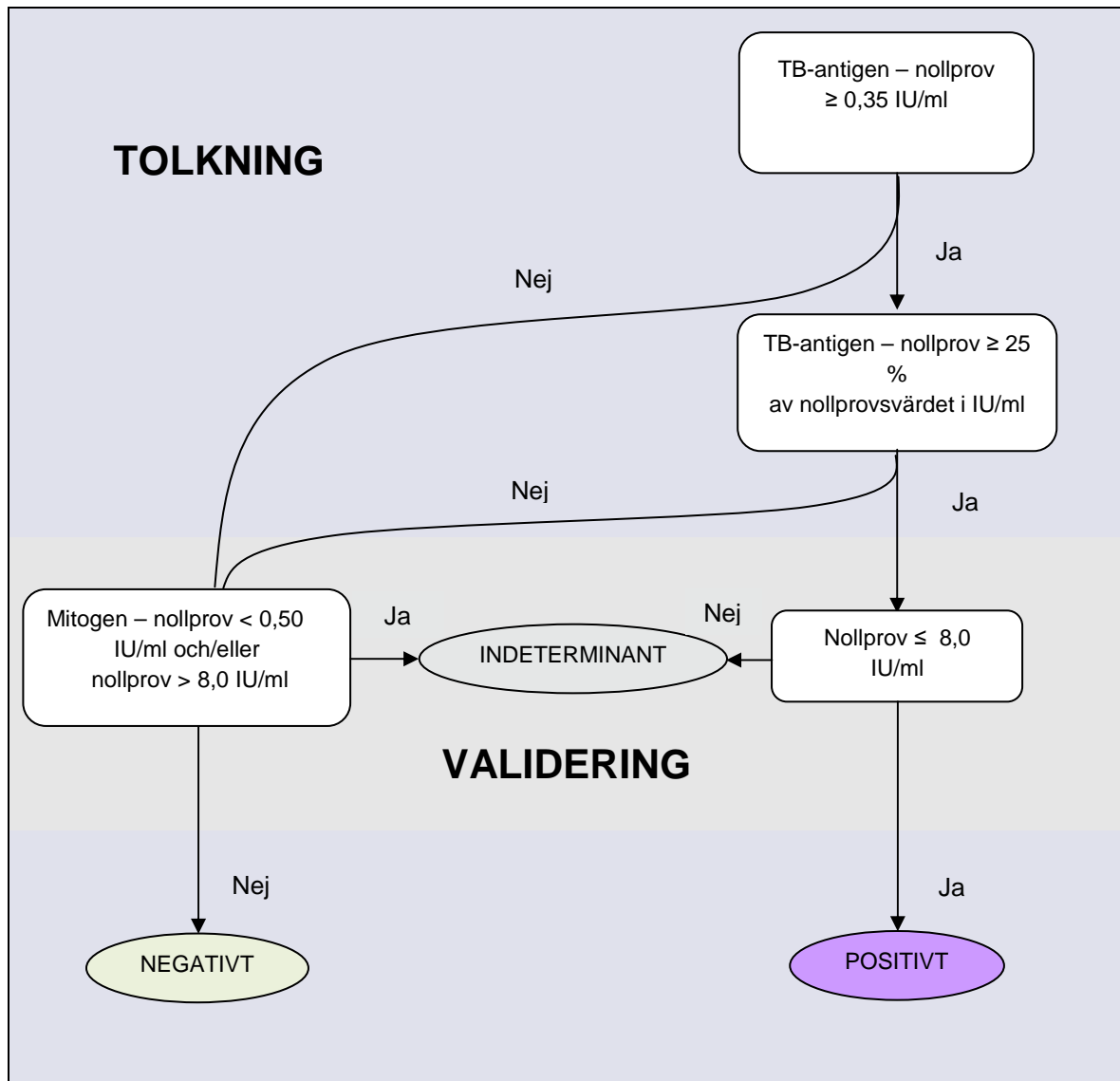
är positivt ska testet bedömas som positivt.

³ Se avsnittet Felsökning för sannolika orsaker.

⁴ Kliniska studier har visat att mindre än 0,25 % av ämnena hade IFN- γ -nivåer på > 8,0 IU/ml för Nil-kontrollen.

Hur hög den uppmätta IFN- γ -nivån är har inget samband med infektionsstadiet eller hur omfattande infektionen är, nivån på immunresponsen eller sannolikheten för att tillståndet ska utvecklas till aktiv sjukdom.

DIAGRAM 4. Flödesschema för tolkning om NIL-, TB-ANTIGEN- OCH MITOGEN-rör används



8. BEGRÄNSNINGAR

Resultaten av QuantiFERON®-TB Gold IT-testerna måste användas tillsammans med den enskilda patientens epidemiologiska historik, aktuella medicinska status och andra diagnostiska bedömningar.

Patienter med högre Nil-värden än 8 IU/ml klassificeras som "indeterminanta", eftersom en 25 % högre respons på TB-antigener kan ligga utanför analysens mätområde.

Ej tillförlitliga eller indeterminanta resultat kan bero på:

- Den rutin som beskrivs i bipacksedeln har ej följts,
- Onormalt höga nivåer IFN- γ eller förekomst av heterofila antikroppar,
- Det tog mer än 16 timmar från det att blodprovet togs tills det inkuberades vid 37°C.

9. PRESTANDAKARAKTERISTIKA

Kliniska studier

Eftersom det inte finns en bestämd standard för latent tuberkulosinfektion (LTBI), kan uppskattningar av sensitivitet och specificitet för QuantiFERON®-TB Gold IT inte utvärderas praktiskt. Specificitet för QuantiFERON®-TB Gold IT har uppskattats genom att utvärdera felaktigt positiva svar för personer med låg risk (inga kända riskfaktorer) för tuberkulosinfektion. Sensitivitet har uppskattats genom att utvärdera patientgrupper med odlingsverifierad aktiv TB-sjukdom.

Specificitet

I en amerikansk studie som omfattade 866 frivilliga togs blodprover för QuantiFERON®-TB Gold IT i samband med tuberkulintest. Demografisk information och riskfaktorer för TB bestämdes med hjälp av en standardenkät som fylldes i samband med att testerna togs. Av 432 testpersoner som inte hade några kända riskfaktorer för *M. tuberculosis*-infektion var QuantiFERON®-TB Gold IT- och tuberkulintestresultat tillgängliga för 391. Ingen var BCG-vaccinerad. En annan specificitetsstudie har gjorts med QuantiFERON®-TB Gold IT med låg risk-patienter i Japan, av vilka ca 90 % var BCG-vaccinerade. Resultaten från bägge specificitetsstudierna redovisas i Tabell 2.

Tabell 2. Specificitet för QuantiFERON®-TB Gold IT: Resultat för personer som inte har någon rapporterad risk för *M. tuberculosis*-infektion.

STUDIE	BCG-status % vaccinerade	Totalt antal testade	Antal QFT-G indeterminanta	Antal QFT-G positiva / antal giltiga tester	QFT-G specificitet (95 % CI)	Antal TST-positiva/antal testade	TST*-specificitet (95 % CI)
USA (opublicerad)	0%	391	1	3 / 390	99.2% (97.6-99.8)	6 / 391	98.5% (96.5-99.4)
Japan (opublicerad)	~90%	190	4	3 / 186	98.4% (95-99.6)	-	-
TOTALT		581	5/584 (0.9%)	6 / 576	99.0%	-	-

* Med 10 mm TST cut-off. TST-testets specificitet är 99,1 % om en 15 mm cut-off används.

Sensitivitet för aktiv TB

Misstänkta TB-fall i Australien och Japan som även har en odlingsbekräftad *M. tuberculosis*-infektion har testats för att bedöma sensitiviteten för QuantiFERON®-TB Gold IT. Då det inte finns ett definitivt standardtest för latent tuberkulosinfektion (LTBI), är en mikrobiologisk odling av *M. tuberculosis* ett lämplig substitut, eftersom patienter med denna sjukdom per definition är infekterad. Patienterna har fått mindre än 8 dagars behandling innan blodprover har tagits för QuantiFERON®-TB Gold IT-testet.

Tabell 3 sammanfattar resultaten från de två grupperna av patienter med positiva svar på *M. tuberculosis*-odlingen. Den allmänna sensitiviteten för QuantiFERON®-TB Gold IT för aktiv TB-sjukdom var 89 % (48/54).

Tabell 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Testpersoner med odlingsbekräftad *M. tuberculosis*-infektion.

STUDIE		Sjukdom bekräftad genom	Antal QFT-Gold positiva/antal giltiga tester	QFT-Gold specificitet (95 % CI)
Japanska TB-patienter valideringsstudie		Odling	24 / 27	89% (72-96%)
Australiensiska TB-patienter valideringsstudie	Pulmonell	Odling	7 / 10	70% (40-89%)
	Extrapulmonell		17 / 17	100% (82-100%)
TOTALT			48 / 54	89% (78-95%)

Diagnos av LTBI

Ett antal studier har publicerats som demonstrerar hur effektivt QuantiFERON®-TB Gold IT är i olika populationer med risk för LTBI. De principiella resultaten för vissa utvalda studier visas i tabell 4.

Tabell 4. Utvalda publicerade studier om QuantiFERON®-TB Gold IT i populationer med risk för LTBI.

STUDIE	Totalt antal testade	Resultat
Indisk HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Undersökning med mycket höga TB-andelar. 40 % QFT-Gold IT-positiva cf 41 % TST-positiva vid 10 mm. Hög konkordans med TST, ingen effekt av BCG åt något håll. Vid båda testerna har hänsyn tagits till riskfaktorer som ålder och arbete inom sjukvård.
Danska HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	Den allmänna förekomsten av LTBI med QFT-Gold IT var 4,6 % (27/590) bland HIV ⁺ -smittade. Positiva resultat sattes i samband med TB-risker. Två patienter med positiva QFT-Gold IT-svar utvecklade aktiv TB inom ett år. Indeterminanta svar (n=20. 3,4 %) hade ett starkt samband med ett CD4-värde < 100 / µl
Hospitaliserade barn (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Barn med misstänkt TB eller som har kommit i kontakt med TB testades med QFT-Gold IT och TST. 10,5 % QFT-Gold IT-positiva cf 9,5 % TST-positiva vid 10 mm. Den generella överensstämmelsen mellan testerna var 95,2 % och 100 % bland de som inte var BCG-vaccinerade.
Tyska närkontakter (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Närkontakter i 15 olika indexfall testades. 51 % var BCG-vaccinerade, 27 % utlandsfödda. 70 % av de BCG-vaccinerade och 18 % av de icke-vaccinerade var TST-positiva (5 mm), medan 9 % respektive 11 % var QFT-Gold IT-positiva. QFT-Gold IT relaterades till TB-risken. TST relaterades endast till BCG-vaccination.

Många andra publikationer beskriver hur effektiva den mindre känsliga, flytande antigenversionen QuantiFERON®-TB Gold (föregångaren till QuantiFERON®-TB Gold IT) och QuantiFERON®-TB Gold IT-testet är. Dessa studier innefattade kontakttester med aktiva TB-fall^{9,11, 19, 25}, barn^{6-10, 25, 28}, HIV-positiva^{2, 5, 20}, sjukvårdspersonal^{13, 26, 32}, immunosuppressiva^{4, 22, 23, 27, 30, 31}, samt misstänkta fall av TB^{7, 8, 10, 18} och lågriskpersoner¹⁵.

TST-testningens repeterbarhet och effekter vid samtidig QuantiFERON®-TB Gold-tester

Som del i en USA-specifik studie testades en del av försökspersonerna igen inom 4 till 5 veckor efter det första QuantiFERON®-TB Gold IT-testet och TST-testet. Resultaten från QuantiFERON®-TB Gold IT-testerna för 260 försökspersoner var tillgängliga vid båda tillfällena och gav en överensstämmelse på 99,6 % (259/260). Ett tidigare tuberkulintest gav inga positiva QuantiFERON®-TB Gold IT-svar.

10. TEKNISK INFORMATION

Indeterminanta resultat

Indeterminanta resultat bör vara sällsynta och kan vara ett immunt tillstånd för den enskilda försökspersonen, men kan även sättas i samband med ett antal tekniska faktorer;

- Det tog mer än 16 timmar från det att blodprovet togs tills det inkuberades vid 37°C.
- Blodprovet har förvarats över eller under det rekommenderade temperaturområdet (22°C ± 5°C)
- Provtagningsrören har inte blandats tillräckligt
- ELISA-plattan har inte blivit tillräckligt rengjord

Om det finns misstanke om tekniska problem i samband med provtagning eller hantering av blodprover ska hela QuantiFERON®-TB Gold IT-testet göras om med ett nytt blodprov. ELISA-testet för stimulerad plasma kan göras om om det finns misstankar om att utrustningen är brisfälligt rengjord eller att vissa steg i testningen inte har följts. Indeterminanta tester till följd av låga mitogen-värden eller höga Nil-värden förväntas inte ge andra resultat om testet görs om, såvida inte ett fel uppstod under ELISA-testet. Indeterminanta resultat ska rapporteras som sådana. Läkaren kan välja att ta ett nytt prov eller vidta andra åtgärder.

Koagulerade plasmaprover

Om fibrin bildas under långvarig lagring av plasmaprover ska proverna centrifugeras för att det sammanklumpade materialet ska sedimenteras och för att underlätta pipettering av plasman.

Felsökning av ELISA

Icke-specifik färgutveckling

MÖJLIG ORSAK	LÖSNING
Bristfällig rengöring av plattan.	Tvätta plattan minst 6 gånger med 400 µl tvättbuffert per brunn. Det kan krävas mer än 6 tvättcykler beroende på vilken tvättmaskin som används. Låt tvättbufferten verka i minst 5 sekunder mellan varje cykel.
Korskontaminering av ELISA-brunnarna.	Var försiktig när du pipetterar och blandar proverna för att minimera riskerna.
Kitet/komponenternas utgångsdatum har passerats.	Kontrollera att kitet används före utgångsdatumet. Se till att rekonstituerad standard och konjugatkoncentrat (100X) används inom 3 månader efter rekonstituering.
Enzymsubstratlösningen är kontaminerad.	Kassera substratet om det är blåfärgat. Säkerställ att reagenserna endast förvaras i rena behållare.

Låga avläsningar av optisk densitet i standarder

MÖJLIG ORSAK	LÖSNING
Spädningsfel i standard.	Säkerställ att spädningslösningar av kitstandarderna prepareras enligt bipacksedeln.
Pipetteringsfel.	Kontrollera att pipetter kalibreras och används i enlighet med tillverkarens anvisningar.
För låg inkubationstemperatur.	ELISA-inkubation ska utföras vid rumstemperatur (17°C till 27°C).
För kort inkubationstid.	Plattan ska inkuberas med konjugat, standarder och prover vid 120 ± 5 minuter. Enzymsubstratlösningen inkuberas på plattan i 30 minuter.
Ett felaktigt filter används i plattläsaren.	Plattan ska läsas vid 450 nm med ett referensfilter på mellan 620 och 650 nm.
Reagenserna är för kalla.	Alla reagenser, med undantag för konjugatkoncentrat (100X), måste vara vid rumstemperatur innan analysen påbörjas. Detta tar ungefär en timme.
Kitet/komponenternas utgångsdatum har passerats.	Kontrollera att kitet används före utgångsdatumet. Se till att rekonstituerad standard och konjugatkoncentrat (100X) används inom 3 månader efter rekonstituering.

Hög bakgrund

MÖJLIG ORSAK	LÖSNING
Bristfällig rengöring av plattan.	Tvätta plattan minst 6 gånger med 400 µl tvättbuffert per brunn. Det kan krävas mer än 6 tvättcykler beroende på vilken tvättmaskin som används. Låt tvättbufferten verka i minst 5 sekunder mellan varje cykel.
För hög inkubationstemperatur.	ELISA-inkubation ska utföras vid rumstemperatur (17°C till 27°C).
Kitet/komponenternas utgångsdatum har passerats.	Kontrollera att kitet används före utgångsdatumet. Se till att rekonstituerad standard och konjugatkoncentrat (100X) används inom 3 månader efter rekonstituering.
Enzymsubstratlösningen är kontaminerad.	Kassera substratet om det är blåfärgat. Säkerställ att reagenserna endast förvaras i rena behållare.

Icke-linjär standardkurva och variabilitet mellan duplikat

MÖJLIG ORSAK	LÖSNING
Bristfällig rengöring av plattan.	Tvätta plattan minst 6 gånger med 400 µl tvättbuffert per brunn. Det kan krävas mer än 6 tvättcykler beroende på vilken tvättmaskin som används. Låt tvättbufferten verka i minst 5 sekunder mellan varje cykel.
Spädningsfel i standard.	Säkerställ att spädnings av standarden prepareras enligt bipacksedeln.
Bristfällig blandning.	Blanda reagenserna noggrant genom vändning eller genom försiktig skakning innan de appliceras på plattan.
Bristfällig pipettering eller fel under beredningen av analysen.	Prover och standard ska tillföras i anslutning till varandra. Alla reagenser ska ha preparerats innan analysen påbörjas.

Cd-romskivan Product Information and Technical Guide innehåller en instruktionsvideo som demonstrerar analysrutinen och lösningar på de flesta tekniska problemen. Du kan beställa cd-romskivan gratis från Cellestis eller din lokala distributör.

11. BIBLIOGRAFI

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.
22. **Manuel, O., et al.** Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007. 7; 2797-801.

13. FÖRKORTAD TESTRUTIN

STEG 1 – INKUBATION AV BLOD

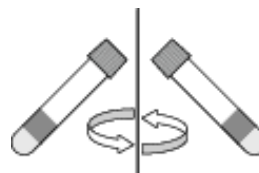
1. Tappa ur blod från patienten i provtagningsrören. Blanda rören genom att **skaka dem kraftigt i 5 sekunder (eller 10 gånger)** för att **hela insidan av röret** ska täckas med blod.



2. Rören ska inkuberas **stående** vid 37°C i 16 till 24 timmar.



3. Efter inkubation ska rören centrifugeras i 5 till 15 minuter vid 2 000 till 3 000 g RCF (g), för att plasman och de röda blodkropparna ska separeras.

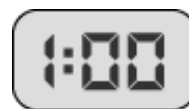


4. Efter centrifugering ska plasma samlas upp i varje rör för IFN- γ -kvantifiering.



STEG 2 – IFN- γ ELISA

1. Låt ELISA-komponenterna nå rumstemperatur, med undantag för konjugatkoncentrat (100X), i minst 60 minuter.

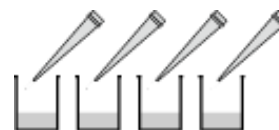


2. Rekonstituera kitstandarden till 8,0 IU/ml med destillerat eller avjoniserat vatten. Preparera fyra (4) standardspädningar.

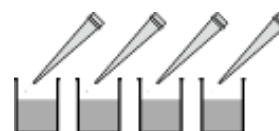


3. Rekonstituera frystorkat konjugatkoncentrat (100X) med destillerat eller avjoniserat vatten.

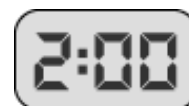
4. Förbered working strength-konjugat i den gröna diluenten och tillsätt 50 μ l i alla brunnar.



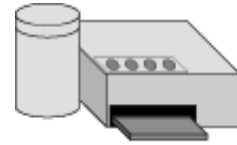
5. Tillsätt 50 μ l av plasmaproverna och 50 μ l standard i lämpliga brunnar. Blanda i en skakare.



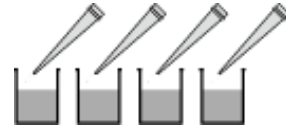
6. Inkubera i 120 minuter vid rumstemperatur.



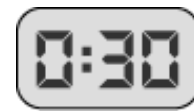
7. Tvätta brunnarna minst 6 gånger med 400 μ l tvättbuffert per brunn.



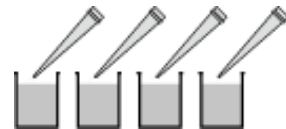
8. Tillsätt 100 μ l enzymsubstratlösning i brunnarna. Blanda i en skakare.



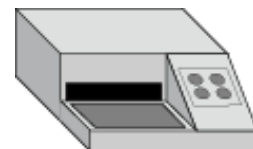
9. Inkubera i 30 minuter vid rumstemperatur.



10. Tillsätt 50 μ l stopplösning i alla brunnar. Blanda i en skakare.



11. Läs av resultaten vid 450 nm med ett 620 till 650 nm referensfilter.



12. Analysera resultaten.





Tillverkad för:

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

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

E-post: quantiferon@cellestis.com

Webbplats: www.cellestis.com

Dok.nr. 05990301C

August 2009



EC	REP
----	-----

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover
Germany