

QuantiFERON[®]-TB Gold

(In-Tube-metode)

**Helblods IFN-gamma-test
Måler reaksjoner på
ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4) peptidantigener**

**PAKNINGS-
VEDLEGG**

For *in vitro*-diagnostisk bruk



INNHold

1. TILTENKT BRUK	2
2. OPPSUMMERING OG FORKLARING AV TESTEN	2
Prinsippene ved analysen	3
Nødvendig tidsforbruk for å utføre analysen	3
3. REAGENS MIDLER OG OPPBEVARING	4
Nødvendig materiale (men som ikke følger med)	4
Lagringsinstruksjoner	5
Blodprøverør	5
Reagensmiddelsett	5
Rekonstituerte og ubrukte reagensmidler	5
4. ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER	6
Advarsler	6
Forholdsregler	7
5. INNSAMLING OG HÅNÐTERING AV PRØVER	8
6. RETNINGSLINJER FOR BRUK	9
TRINN ÉN - Inkubasjon av blod og innsamling av plasma	9
TRINN TO - Menneskelig IFN- γ ELISA	10
7. BEREGNINGER OG TOLKING AV TESTER	13
Framstilling av standardkurve	13
Kvalitetskontroll av testen	14
Tolkning av resultater	15
8. BEGRENSNINGER	19
9. YTELSESKARAKTERISTIKKER	19
10. TEKNISK INFORMASJON	21
Ubestemmelige resultater	21
Levde plasmaprøver	21
ELISA feilsøking	22
Ikke spesifikk fargeutvikling	22
Lav optisk tetthetsmåling for standarder	22
Høy bakgrunn	23
Ikke-lineær standardkurve og dobbel variabilitet	23
11. LITTERATURLISTE	24
12. TEKNISK SERVICE	25
13. FORKORTET TESTPROSEDYRE	26

1. TILTENKT BRUK

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) er en *in vitro*-diagnostisk test som bruker en peptid-blanding som simulerer ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4) proteiner for å stimulere celler i heparinisert helblod. Detektering av interferon- γ (IFN- γ) av Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (enzym-koblet immunosorbent analyse - ELISA) brukes for å identifisere *in vitro* -reaksjoner på disse peptidantigenene som forbindes med en *Mycobacterium tuberculosis*-infeksjon.

QuantiFERON®-TB Gold IT er en indirekte test for *M. tuberculosis*-infeksjon (inkludert sykdom), og er tiltenkt brukt sammen med risikovurdering, radiografi og andre medisinske og diagnostiske vurderinger.

2. SAMMENDRAG OG FORKLARING AV TESTEN

Tuberkulose er en smittsom sykdom forårsaket av smitte fra *M. tuberculosis* -komplekse organismer (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), som typisk sprer seg til nye verter via luftbårne dråpenukleiner fra pasienter med åndedrettstuberkulose-sykdom. En person som nettopp er blitt smittet, kan bli syk av tuberkulose i løpet av uker eller måneder, men de fleste smittede personer blir ikke syke. Latent tuberkuloseinfeksjon (LTBI), en ikke-smittsom asymptomatisk tilstand, vedvarer hos noen, som kan utvikle en tuberkuløs sykdom etter måneder eller år. Hovedformålet med å diagnostisere LTBI er å vurdere medisinsk behandling for å forebygge tuberkuløs sykdom. Fram til nylig var tuberkulinprøve på huden (TST) den eneste tilgjengelige metoden for å diagnostisere LTBI. Hudreaksjoner overfor tuberkulin utvikles fra 2 til 10 uker etter smitte. Likevel er det noen smittede personer, inkludert de med en lang rekke tilstander som hindrer immune funksjoner, men også andre uten disse funksjonene, som ikke svarer på tuberkulin. Og omvendt er det noen personer som sannsynligvis ikke har *M. tuberculosis*-smitte, men som framviser reaksjoner på tuberkulin og som har positive TST-resultater etter vaksinerings med Bacille Calmette-Guérin (BCG), infeksjon med andre mykobakterier enn *M. tuberculosis*-kompleks, eller andre uavklarte faktorer.

LTBI må skilles fra tuberkuløs sykdom, en rapporterbar tilstand som vanligvis involverer lunger og nedre luftveier, selv om andre organsystemer også kan påvirkes. Tuberkuløs sykdom diagnostiseres ut fra historiske, fysiske, radiologiske, histologiske og mykobakteriologiske funn.

QuantiFERON®-TB Gold IT-testen er en test for Cell Mediated Immune (CMI)-reaksjoner på peptidantigener som simulerer mykobakterielle proteiner. Disse proteinene, ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4), er fraværende i alle BCG-stammer, og i nesten alle ikke-tuberkuløse mykobakterier, med unntak av *M. kansasii*, *M. szulgai* og *M. marinum*.¹ Personer som er smittet med *M. tuberculosis*-komplekse organismer, har vanligvis lymfocytter i blodet, som gjenkjenner disse og andre mykobakterielle antigener. Denne gjenkjenningsprosessen involverer framstilling og utsondring av cytokin, IFN- γ . Detektering og etterfølgende kvantifisering av IFN- γ danner grunnlaget for denne testen.

Antigenene som brukes i QuantiFERON®-TB Gold IT er en peptid-blanding som simulerer proteinene ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4). Mange undersøkelser har vist at disse peptidantigenene stimulerer IFN- γ -reaksjoner i T-celler fra personer som er smittet med *M. tuberculosis*, men generelt sett ikke fra usmittede personer eller BCG-vaksinerte personer uten sykdom eller fare for LTBI.¹⁻³² Likevel kan medisinske behandlinger eller tilstander som svekker immunfunksjoner potensielt redusere IFN- γ -reaksjonene. Pasienter med visse andre mykobakterielle infeksjoner kan også reagere på ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4) da de genene som koder disse proteinene er til stede i *M. kansasii*, *M. szulgai* og *M. marinum*.^{1,23} QuantiFERON®-TB Gold IT-testen er både en test for LTBI og en nyttig hjelp ved diagnostisering av *M. tuberculosis* -komplekse infeksjoner hos syke pasienter. Et positivt resultat støtter diagnosen tuberkuløs sykdom; men infeksjoner av andre mykobakterier (f.eks. *M. kansasii*) kan også føre til positive resultater. Andre medisinske og diagnostiske vurderinger er nødvendig for å bekrefte eller utelukke tuberkuløs sykdom.

Prinsippene ved analysen

QuantiFERON®-TB Gold IT-systemet bruker spesielle blodprøverør, som brukes til å samle inn helblod. Inkubasjon av blod oppstår i rørene etter 16 til 24 timer, hvoretter plasma samles inn og testes for nærvær av IFN- γ produsert som reaksjon på peptidantigener.

QuantiFERON®-TB Gold IT-testen utføres i to trinn. Først samles helblod inn i hver enkelt av QuantiFERON®-TB Golds blodprøverør, som inkluderer et Nil-kontrollrør, TB-antigenrør, og evt. et Mitogen-rør.

Mitogen-røret kan brukes sammen med QuantiFERON®-TB Gold IT-testen som en positiv kontroll. Dette kan være svært nyttig der det er tvil om pasientens immunstatus. Mitogen-røret kan også fungere som kontroll for korrekt blodhåndtering og -inkubasjon.

Rørene bør inkuberes ved 37 °C så snart som mulig, og innen 16 timer etter innsamling. Etter den 16- til 24-timers inkubasjonstiden sentrifugeres rørene, plasma fjernes, og mengden med IFN- γ (IU/ml) måles av ELISA.

En test betraktes som positiv på en IFN- γ -reaksjon på TB-antigenrøret som er betydelig over Nil IFN- γ IU/ml-verdien. Hvis den ble brukt, fungerer den Mitogen-stimulerte plasmaprøven som en IFN- γ -positiv kontroll for hver prøve som ble testet. En lav reaksjon på Mitogen (<0,5 IU/ml) indikerer et ubestemmelig resultat når en blodprøve også har negativ reaksjon på TB-antigenene. Dette mønsteret kan oppstå med for få lymfocytter, redusert lymfocytaktivitet pga. feil prøvehåndtering, feil påfylling/blanding av Mitogen-røret, eller hvis pasientens lymfocytter ikke kan framstille IFN- γ . Nil-prøven justerer for bakgrunn, heterofile antistoffeffekter⁷, eller ikke-spesifikk IFN- γ i blodprøvene. IFN- γ -nivået i Nil-røret trekkes fra IFN- γ -nivået for TB-antigenrøret og Mitogen-røret (hvis det ble brukt).

Nødvendig tidsforbruk for å utføre analysen

Nødvendig tid for å utføre QuantiFERON®-TB Gold IT-analysen er anslått nedenfor; tiden for testing av flere prøver samtidig indikeres også:

37 °C Inkubasjon av blodprøverør: 16 til 24 timer

ELISA: Ca. 3 timer for én ELISA-plate
(28 til 44 personer)

- <1 times arbeid
- Legg til 10 til 15 minutter for hver ekstra plate

3. REAGENS MIDLER OG OPPBEVARING

Blodprøverør for tuberkulose og kontroll-antigen

Katalognummer 0590 0301

1. Nil-kontroll (grå hette)	100 x rør
2. TB-antigen (rød hette)	100 x rør
3. Mitogen-kontroll (lilla hette)	100 x rør

MERK: Rørene finnes også i andre utgaver:

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

Kat.nr. 0593 0201: 100 x Mitogen-kontrollrør.

High Altitude (Høy stedshøyde)-rør (se avsnitt 5)

Kat.nr. 590 0501: (High Altitude - Høy stedshøyde) 100 x Nil-kontroll, 100 x TB-antigenrør.

Kat.nr. 0590 0505: (High Altitude - Høy stedshøyde) 100 x Nil-kontroll, 100 x TB-antigen- og 100 x Mitogenrør.

Kat.nr. T0593 0501 (High Altitude - Høy stedshøyde) 100 x Mitogen-kontrollrør.

ELISA-komponenter

Katalognummer 0594 0201

1. Mikroplateremser brønner	24 x 8
2. Menneskelig IFN- γ standard, lyofilisert	1 x ampulle
3. Grønn oppløsning	1 x 30 ml
4. Kobling 100X konsentrat, lyofilisert	1 x 0,3 ml
5. Vaskebuffer 20X konsentrat	1 x 100 ml
6. Enzymsubstrat-oppløsning	1 x 30 ml
7. Enzymstoppende oppløsning	1 x 15 ml

Nødvendig materiale (men som ikke følger med)

- 37 °C inkubator. CO₂ ikke nødvendig.
- Kalibrerte pipetter for variabelt -volum for levering av 10 μ l til 1000 μ l med engangsspisser.
- Kalibrerte pipetter for flere kanaler som kan levere 50 μ l og 100 μ l med engangsspisser.
- Mikroplate-shaker.
- Avionisert eller destillert vann - 2 l.
- Mikroplatevasker (automatisk vasker anbefales).
- Mikroplateleser med 450 nm-filter og 620 nm- til 650 nm-referansefilter.

Lagringsinstruksjoner

Blodprøverør

- Oppbevar blodprøverør ved 4 °C til 25 °C.
- Hyllelevetid for QuantiFERON®-TB Gold blodprøverør er 15 måneder fra produksjonsdato når de oppbevares ved 4 °C til 25 °C.

Reagensmiddelsett

- Oppbevar settet ved 2 °C til 8 °C.
- Enzymsubstrat-oppløsningen må beskyttes mot direkte sollys.
- Hyllelevetid for QuantiFERON®-TB Gold IT ELISA-settet er 3 år fra produksjonsdato når de oppbevares ved 2 °C til 8 °C.

Rekonstruerte og ubrukte reagensmidler

For informasjon om hvordan reagensmidler skal rekonstitueres, se avsnitt 6 (side 11).

- Det rekonstituerte Standard-settet kan oppbevares i opp til 3 måneder hvis det oppbevares ved 2 °C til 8 °C.
 - *Legg merke til datoen da Standard-settet ble rekonstituert.*
- Når det er rekonstituert, må ubrukt Kobling 100X konsentrat returneres til oppbevaring ved 2 °C til 8 °C og må også brukes innen 3 måneder.
 - *Legg merke til datoen da Kobling ble rekonstituert.*
- Arbeidsstyrken Kobling må brukes innen 6 timer etter klargjøring.
- Arbeidsstyrken Vaskebuffer kan lagres ved romtemperatur i opp til 2 uker.

4. ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

Advarsler

- Et negativt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat utelukker ikke muligheten for *M. tuberculosis*-smitte eller tuberkuløs sykdom: Feil negativt resultat kan oppstå pga. infeksjonens fase (f.eks. prøven ble tatt før utvikling av celleformet immunreaksjon), felles sykkelige tilstander som påvirker immunfunksjonen, feil håndtering av blodprøverør etterfulgt av venepunktur, feil ytelse av analysen, eller andre immunologiske variabler.
- Et positivt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat bør ikke være eneste eller definitive grunnlag for smitte av *M. tuberculosis*. Feil ytelse av analysen kan føre til feil positiv reaksjon.
- Et positivt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat bør etterfølges av videre medisinske vurderinger og diagnostiserende vurderinger for aktiv tuberkuløs sykdom (f.eks. AFB-vattpinne og -kultur, bryststrøntgen).
- Mens ESAT-6, CFP-10 og TB7.7(p4) er fraværende i alle BCG-stammer og i del fleste kjente ikke-tuberkuløse mykobakterier, er det mulig at et positivt QuantiFERON®-TB Gold IT-resultat kan være grunnet smitte av *M. kansasii*, *M. szulgai* eller *M. marinum*. Ved mistanke om slik smitte, bør alternative tester vurderes.

Forholdsregler

- **For in vitro-diagnostisk bruk.**
- **Skadelig: Enzymsubstrat-oppløsning** inneholder 3,3',5,5' tetrametylbenzidin som er skadelig ved inntak, innånding og hudkontakt. Irriterende for hud og øyer. Mutagen. Bruk beskyttelsesbriller, hansker, og håndter produktet som mulig karsinogen.
- **Skadelig: Enzymstoppende oppløsning** inneholder H₂SO₄, som er skadelig ved inntak, øyekontakt, hudkontakt og innånding. Bruk beskyttelsesbriller, hansker og vanlig beskyttende laboratorieklær. Hvis stoppeoppløsningen kommer i kontakt med hud eller øyer, må du skylle med store mengder vann og kontakte lege.
- **Skadelig: IFN-γ Standard og Kobling 100X konsentrat** kan være ubehagelig ved inntak og kan føre til hudirritasjon. Bruk hansker og vanlig beskyttende laboratorieklær.
- **Håndter menneskelig blod som potensielt smittefarlig.** Følg gjeldende retningslinjer for håndtering av blod.
- **Thimerosal** brukes som konserveringsmiddel i noen reagensmidler. Det kan være giftig ved inntak, innånding eller hudkontakt.
- **Grønn oppløsning** inneholder vanlig musserum og kasein, som kan utløse allergiske reaksjoner; unngå hudkontakt.
- Avvik fra pakningsvedlegget kan føre til feilaktige resultater. Les instruksjonene nøye før bruk.
- Ikke bruk settet hvis en reagensmiddelflaske viser tegn på skade eller lekkasje før bruk.
- Ikke bland eller bruk ELISA-reagensmidler fra andre partier QuantiFERON[®]-TB Gold-sett.
- Kast ubrukte reagensmidler og biologiske prøver iht. lokale, regionale og statlige forskrifter.
- Ikke bruk blodprøverør eller ELISA-sett etter utløpsdato.

5. INNSAMLING OG HÅNDTERING AV PRØVER

Blodtaking

QuantiFERON®-TB Gold IT bruker følgende prøverør:

1. Nil-kontroll (grå hette med hvit ring) (for høyder inntil 810 meter over havet)
2. TB-antigen (rød hette med hvit ring) (for høyder inntil 810 meter over havet)
3. Mitogen-kontroll (lilla hette med hvit ring) (ekstra) (for høyder inntil 810 meter over havet)
4. Nil-kontroll (grå hette med gul ring) (for høyder mellom 1.020 og 1.875 meter)
5. Tb-antigen (rød hette med gul ring) (for høyder mellom 1.020 og 1.875 meter)
6. Mitogen-kontroll - ekstra (lilla hette med gul ring) (for høyder mellom 1.020 og 1.875 meter)

Antigen er tørket på den innvendige veggen av blodprøverørene, så det er viktig at innholdet i rørene blandes godt med blodet. Rørene må overføres til en 37°C inkubator så snart som mulig, og innen 16 timer etter innsamling.

Følgende prosedyrer må følges for optimale resultater:

1. Fra hver pasient samler du inn 1ml blod ved venepunksjon i hvert av QuantiFERON®-TB Gold IT blodprøverørene.
 - High Altitude (høy stedshøyde - HA) QuantiFERON® blodprøverør bør brukes ved høyder over 1020 meter over havet.
 - Inntil en høyde på 810 m skal QuantiFERON® standard blodprøverør brukes. I høyder fra 1020 m skal de spesielle QuantiFERON® blodprøverørene for store høyder brukes.

Ved bruk av QuantiFERON® blodprøverør ble det utenfor de nevnte høydeområdene eller ved lave prøvevolumer kan blodet også tas med en sprøyte; da får hvert av de tre rørene 1 ml blod. Av sikkerhetsmessige grunner fjerner man helst sprøytenålen; her må du følge de vanlige sikkerhetsreglene. Ta av hetten på de tre QFT-Gold IT rørene, og gi 1 ml blod i hvert rør (til det svarte merket på siden av etiketten). Sett deretter på hetten igjen og bland som beskrevet i det følgende.

- Da 1-ml-rørene tar opp blodet relativt sakte, lar du røret være på nålen i 2-3 sekunder til etter at fyllenvået er nådd. Dette garanterer at den nødvendige blodmengden blir tatt opp.

Den svarte markeringen på siden av røret er 1 ml fyllelinjen. *QuantiFERON®-TB Gold blodprøverørene ble validert for volumina fra 0,8 til 1,2 ml. Hvis denne indikatorlinjen ikke nås under blodtakingen, anbefales det å ta en ny blodprøve.*

- Hvis man bruker en sommerfuglnål for å ta blodprøve, må man ved hjelp av et tomt rør garantere at slangeforbindelsen er fylt før QuantiFERON®-TB Gold rørene settes på.
2. Bland rørene ved å **riste rørene kraftig i 5 sekunder** (eller 10 ganger) for å sikre at **hele den innvendige overflaten i røret** er dekket med blod.
 - Det er nødvendig å blande nøye for å sikre at rørets innhold blandes fullstendig med blodet.
 - Det er normalt at blodet skummer under risteprosessen. Dette påvirker likevel ikke ytelsen til analysen, og er ikke noe å bry seg om.
 3. Merk rørene godt.
 4. Rørene må overføres til en 37°C inkubator så snart som mulig, og innen 16 timer etter innsamling. Blodprøver må ikke kjøles ned eller fryses.

6. RETNINGSLINJER FOR BRUK

Trinn én – Inkubasjon av blod og innsamling av plasma

Leverte materialer

QuantiFERON®-TB Gold IT blodprøverør (se avsnitt 3).

Nødvendig materiale (men som ikke følger med)

Se avsnitt 3.

Prosedyre

1. Hvis blodet ikke inkuberes umiddelbart etter innsamling, **må blandingen av rørene gjentas umiddelbart før inkubasjon**, som beskrevet i avsnitt 5.
2. Inkuber rørene **STÅENDE** ved 37°C i 16 til 24 timer. Inkubatoren trenger ikke CO₂ eller fukting.
3. Etter inkubasjon ved 37°C, kan blodprøverørene holdes mellom 2°C og 27°C i opp til 3 dager før sentrifugering.
4. Etter at rørene er inkubert ved 37°C, forenkles innsamling av plasma ved å sentrifugere rørene i 15 minutter ved 2000 til 3000 RCF (g). Gelproppen separerer cellene fra plasmaet. Hvis dette ikke skjer, bør rørene sentrifugeres på nytt med høyere hastighet.
 - Det er mulig å samle inn plasma uten sentrifugering, men det krever ekstra forsiktighet å fjerne plasmaet uten å ødelegge cellene.
5. Plasma-prøver kan lastes direkte fra blodprøverør og inn i QuantiFERON®-TB Gold ELISA-platen, særlig ved bruk av automatiske ELISA arbeidsstasjoner.
6. Alternativt kan plasma-prøver lagres før ELISA, enten i de sentrifugerte rørene eller samles i plasmaoppbevaringsbeholdere. For eksempel, samle inn >150µl plasma i mikropate-brønner eller rekker med mikrorør i 96 brønnformat, og forsegl disse for å hindre søl og fordamping hvis prøvene skal oppbevares.
 - Plasma-prøver kan oppbevares i opp til 4 uker ved 2°C til 8°C eller under –20°C (fortrinnsvis mindre enn –70°C) i lengre perioder.

Trinn to - Menneskelig IFN- γ ELISA

Leverte materialer

QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA-sett (se avsnitt 3).

Nødvendig materiale (men som ikke følger med)

Se avsnitt 3.

Prosedyre

1. Alle plasma-prøver og reagensmidler, bortsett fra Kobling 100X konsentrat, må romtempereres (22°C \pm 5°C) før bruk. Balanser i minst 60 minutter.
2. Fjern remser som ikke er nødvendige fra rammen, forsegl på nytt i folielommen og sett tilbake i kjøleskapet for oppbevaring til du får bruk for de.

Tillat minst én remse for QuantiFERON[®]-TB Gold-standard og tilstrekkelig antall remser for antall objekter som testes (se figurene 2A & 2B for hhv. 2-rørs- og 3-rørsformater). Etter bruk tar du vare på rammen og dekslet for bruk på gjenværende remser.

3. Rekonstituer det frysetørrede settet Standard med mengden avionisert eller destillert vann indikert på etiketten til Standard-ampullen.. Bland forsiktig for å minimalisere skumdannelse og sørg for at det løser seg fullstendig opp. Rekonstituering av Standard til angitt mengde vil framstille en oppløsning med en konsentrasjon på 8,0 IU/ml.

Merk: Rekonstitueringsvolumet av settet Standard vil være ulik mellom partiene.

Bruk det rekonstituerte settet Standard for å framstille en 4:1 fortynningsserie med IFN- γ i Grønn oppløsning (GD) – se figur 1. S1 (Standard 1) inneholder 4 IU/ml, S2 (Standard 2) inneholder 1 IU/ml, S3 (Standard 3) inneholder 0,25 IU/ml, og S4 (Standard 4) inneholder 0 IU/ml (kun GD). Standardene bør analyseres minst to ganger.

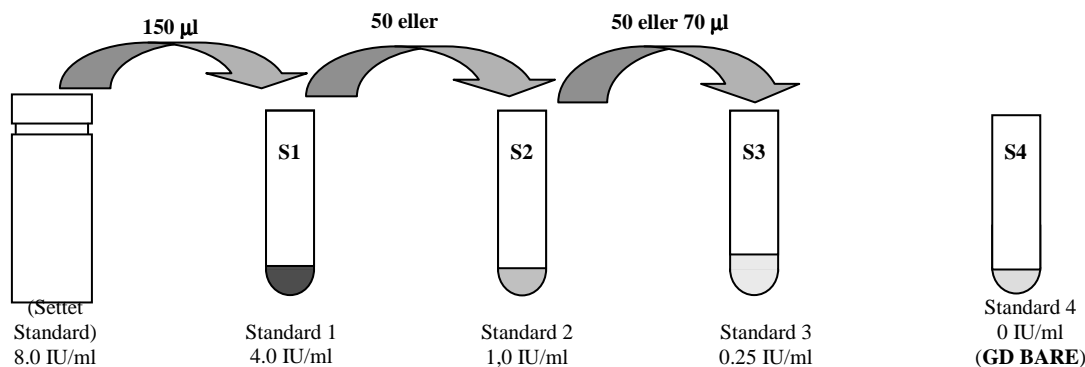
ANBEFALT PROSEDYRE FOR DOBLE STANDARDER

- a. Merk 4 rør "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Tilsett **150 μ l** med GD i S1, S2, S3, S4.
- c. Tilsett **150 μ l** av settet Standard i S1 og bland godt.
- d. Overfør **50 μ l** fra S1 til S2 og bland godt.
- e. Overfør **50 μ l** fra S2 til S3 og bland godt.
- f. **GD alene** fungerer som null-standard (S4).

ANBEFALT PROSEDYRE FOR TRIPLE STANDARDER

- a. Merk 4 rør "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Tilsett **150 μ l** med GD i S1.
- c. Tilsett **210 μ l** med GD i S2, S3, S4.
- d. Tilsett **150 μ l** av settet Standard i S1 og bland godt.
- e. Overfør **70 μ l** fra S1 til S2 og bland godt.
- f. Overfør **70 μ l** fra S2 til S3 og bland godt.
- g. **GD alene** fungerer som null-standard (S4).

FIGUR 1. Klargjøring av standardkurve



- Klargjør ferske fortynninger av settet Standard for hver ELISA-sesjon.

4. Rekonstituer frysetørket Kobling 100X konsentrat med 0,3 ml avionisert eller destillert vann. Bland forsiktig for å minimalisere skumdannelse og sørg for at Koblingen løser seg fullstendig opp.

Arbeidsstyrken kobling klargjøres ved å fortynne nødvendig mengde rekonstituert Kobling 100X konsentrat i Grønn oppløsning som angitt i tabell 1 - Klargjøring av Kobling.

TABELL 1. Klargjøring av kobling

ANTALL REMSER	VOLUM KOBLING 100X KONSENTRAT	VOLUM GRØNN OPPLØSNING
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

- Bland godt, men forsiktig, for å unngå skumdannelse.
 - Sett tilbake eventuelt ubrukt Kobling 100X konsentrat til 2°C til 8°C umiddelbart etter bruk.
 - Bruk bare Grønn oppløsning.
5. Før analyse skal plasmaer blandes for å sikre at IFN- γ fordeles jevnt i prøven.
 6. Tilsett 50µl nylig klargjort Arbeidsstyrke kobling til de nødvendige ELISA-brønnene ved hjelp av en pipette for flere kanaler.
 7. Tilsett 50µl testplasmaer til de egnede brønnene ved å bruke en pipette for flere kanaler (Se anbefalt plateplanløsning under – figurene 2A og 2B). Til slutt tilsettes 50 µl hver av Standardene 1 til 4.

**FIGUR 2A. Anbefalt prøveplanløsning for Nil- og TB-antigenrør
(44 tester per plate)**

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

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Prøve 1. Nil-kontrollplasma); 1A (Prøve 1. TB-antigenplasma).

**FIGUR 2B. Anbefalt prøveplanløsning for Nil-, TB-antigen og Mitogenrør
(28 tester per plate)**

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

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Prøve 1. Nil-kontrollplasma); 1A (Prøve 1. TB-antigenplasma).
1M (Prøve 1. Mitogen-kontrollplasma).

- Bland koblingen og plasmaprøver/standarder godt ved hjelp av en mikroplate-shaker i 1 minutt.
- Dekk hver plate med et lokk og inkuber ved romtemperatur ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) i 120 ± 5 minutter.
 - Plater skal ikke eksponeres for direkte sollys under inkuberingen.
- Under inkuberingen skal én del Vaskebuffer 20X konsentrat fortynnes med 19 deler avionisert eller destillert vann og blandes godt. Det er fremskaffet tilstrekkelig Vaskebuffer 20X konsentrat til å klargjøre 2 l Arbeidsstyrke vaskebuffer.

Vask brønner med **400 μl** Arbeidsstyrke vaskebuffer i minst 6 sykluser. Det anbefales å bruke en automatisert platevasker.

 - Det er svært viktig for ytelsen til analysen å vaske grundig. Sørg for at hver brønn er **helt fylt** opp til toppen med vaskebuffer for hver vaskesyklus. Det anbefales en inntrengningsperiode på minst 5 sekunder mellom hver syklus.
 - Standard laboratoriedesinfeksjonsmidler skal tilsettes avløpsreservoaret, og etablerte prosedyrer skal følges for dekontamineringen av potensielt smittefarlig materiale.
- Knakk platene med forsiden ned på absorberende håndkle for å fjerne rester av vaskebuffer. Tilsett 100 μl enzymsubstrat-oppløsning til hver brønn og bland godt med bruk av en mikroplate-shaker.
- Dekk hver plate med et lokk og inkuber ved romtemperatur ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) i 30 minutter.

- Plater skal ikke eksponeres for direkte sollys under inkuberingen.
13. Etter inkuberingen på 30 minutter, tilsettes 50µl enzymstoppende oppløsning til hver brønn og bland.
- Enzymstoppende oppløsning skal tilsettes til brønnene i samme rekkefølge og ved omtrent samme hastighet som substratet i trinn 11.
14. Mål den optiske tettheten (OD) i hver brønn innen 5 minutter etter at reaksjonen er stanset ved bruk av en mikroplateleser utstyrt med 450 nm filter og med et 620 nm til 650 nm referansefilter. OD-verdier brukes til å beregne resultater.

7. BEREGNINGER OG TOLKING AV TESTER

Analyseprogramvaren QuantiFERON®-TB Gold IT, som brukes til å analysere rådata og beregne resultater, er tilgjengelig fra Cellestis.

Programvaren utfører en kvalitetskontrollvurdering av analysen, genererer en standardkurve og gir et testresultat for hvert objekt, like detaljert som i avsnittet Tolkning av resultater.

Som et alternativ til å bruke analyseprogramvaren QuantiFERON®-TB Gold IT, kan resultater fastsettes i henhold til følgende metode:

Framstilling av standardkurve

(hvis analyseprogramvaren QuantiFERON®-TB Gold IT ikke brukes)

Fastsett de midlere OD-verdiene til replikatene av settet Standard på hver plate.

Opprett en $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standardkurve ved å plote $\log_{(e)}$ til den midlere OD (y-akse) mot $\log_{(e)}$ til IFN- γ -konsentrasjonen til standardene i IU/ml (x-akse), hvor du utelater nullstandarden fra disse beregningene. Beregn linjen for beste tilpassing for standardkurven ved regresjonsanalyse.

Bruk standardkurven for å fastsette IFN- γ -konsentrasjonen (IU/ml) til hver av testplasmaprøvene ved å bruke OD-verdien til hver prøve.

Disse beregningene kan utføres ved å bruke programvarepakker som er tilgjengelige med mikroplateleserne, og standard regneark eller statistisk programvare (så som Microsoft Excel). Det anbefales at disse pakkene brukes til å beregne regresjonsanalysen, variasjonskoeffisienten (%CV) til standardene, og korrelasjonskoeffisienten (r) til standardkurven.

Kvalitetskontroll av testen

Nøyaktigheten til testresultatene avhenger av genereringen av en nøyaktig standardkurve. Derfor må resultater avledet fra standardene undersøkes før testprøveresultatene kan tolkes.

Betingelser for ELISAs gyldighet:

- **Den midlere OD-verdien for Standard 1 må være $\geq 0,600$.**
- **Replikat OD-verdier i %CV for Standard 1 og Standard 2?? må være ≤ 15 %.**
- **Replikat OD-verdier for Standard 3 og Standard 4 må ikke variere med mer enn 0,040 enheter optisk tetthet fra deres middelvei.**
- **Korrelasjonskoeffisienten (r) beregnet fra de midlere absorberingsverdiene til standardene må være $\geq 0,98$.**

Analyseprogramvaren QuantiFERON[®]-TB Gold beregner og avgir disse kvalitetskontrollparametrene.

Hvis kriteriene over ikke oppfylles, er kjøringen ugyldig og må gjentas.

- **Den midlere OD-verdien for nullstandarden (Grønn oppløsning) skal være $\leq 0,150$. Hvis den midlere OD- verdien er $> 0,150$, skal platevaskingsprosedyren undersøkes.**

Tolkning av resultater

Resultatene til QuantiFERON®-TB Gold IT tolkes ved å bruke de følgende kriteriene:

MERK: Diagnostisering eller ekskludering av en tuberkuløs sykdom, og vurdering av sannsynligheten av LTBI, betinger en kombinasjon av epidemiologiske, historiske, medisinske og diagnostiske funn som skal vurderes når resultatene av QuantiFERON®-TB Gold IT tolkes.

NÅR BARE NIL- og TB-ANTIGENRØR BENYTTES

Nil [IU/ml]	TB-antigen minus Nil [IU/ml]	QuantiFERON®-TB [IU/ml]	Rapport/Tolkning
≤ 8.0	< 0.35	Negativ	<i>M. tuberculosis</i> infeksjon IKKE sannsynlig
	≥ 0,35 og < 25 % av Nil-verdi		
	≥ 0,35 og ≥ 25 % av Nil-verdi	Positiv¹	<i>M. tuberculosis</i> infeksjon sannsynlig
> 8.0 ²	Alle	Ubestemmelig³	Resultatene er ubestemmelige for Følsomhet for TB-antigen

¹ Der det ikke er mistanke om *M. tuberculosis*-infeksjon, kan initielt positive resultater bekreftes ved å teste de originale plasmaprøvene på nytt to ganger i QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Hvis gjentatt testing av den ene eller begge replikatene er

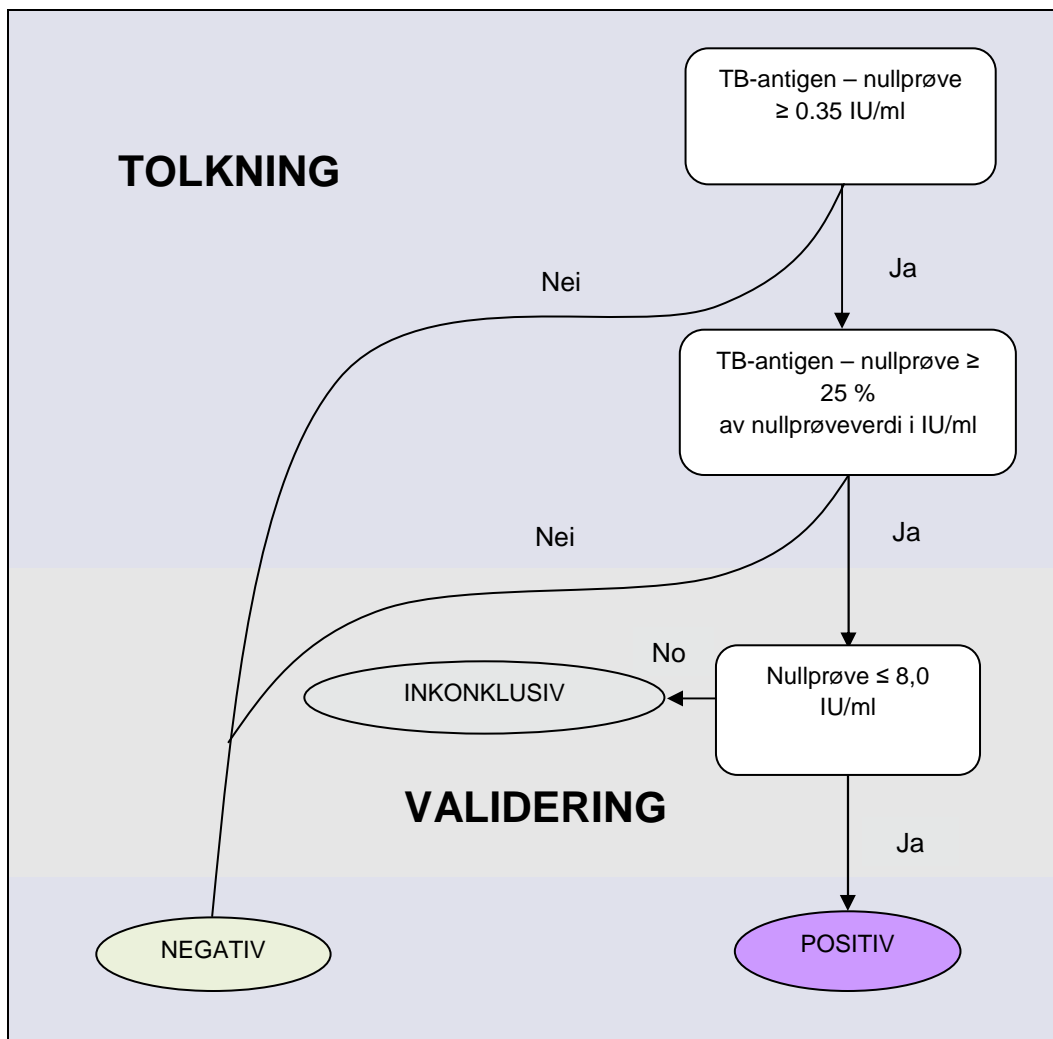
positiv, skal individet anses som test positiv.

² I kliniske undersøkelser hadde færre enn 0,25 % av objektene IFN- γ -nivåer på > 8,0 IU/ml for Nil-kontroll.

³ Se avsnittet om feilsøking for mulige årsaker.

Størrelsen til det målte IFN- γ -nivået kan ikke samsvare med nivå eller infeksjonsgrad, nivå av immunfølsomhet, eller sannsynlighet for progresjon til aktiv sykdom.

FIGUR 3. Tolkning av flytskjema NÅR NIL- og TB-ANTIGENRØR ble brukt



NÅR NIL-, TB-ANTIGEN- OG MITOGENRØR BENYTTES

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	Negativ	<i>M. tuberculosis</i> infeksjon IKKE sannsynlig
	≥ 0,35 og < 25 % av Nil-verdi	≥ 0.5		
	≥ 0,35 og ≥ 25 % av Nil-verdi	Alle	Positiv²	<i>M. tuberculosis</i> infeksjon sannsynlig
	< 0.35	< 0.5	Ubestemmelig³	Resultatene er ubestemmelige for Følsomhet for TB-antigen
≥ 0,35 og < 25 % av Nil-verdi	< 0.5			
> 8.0 ⁴	Alle	Alle		

¹ Reaksjoner på Mitogen positiv kontroll (og innimellom TB-antigen) kan være vanlig utenfor området til mikroplateleseren. Dette har ingen innvirkning for testresultatene.

² Der det ikke er mistanke om *M. tuberculosis*-infeksjon, kan initelt positive resultater bekreftes ved å teste de originale plasmaprøvene på nytt to ganger i QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Hvis gjentatt testing av den ene eller begge replikatene er

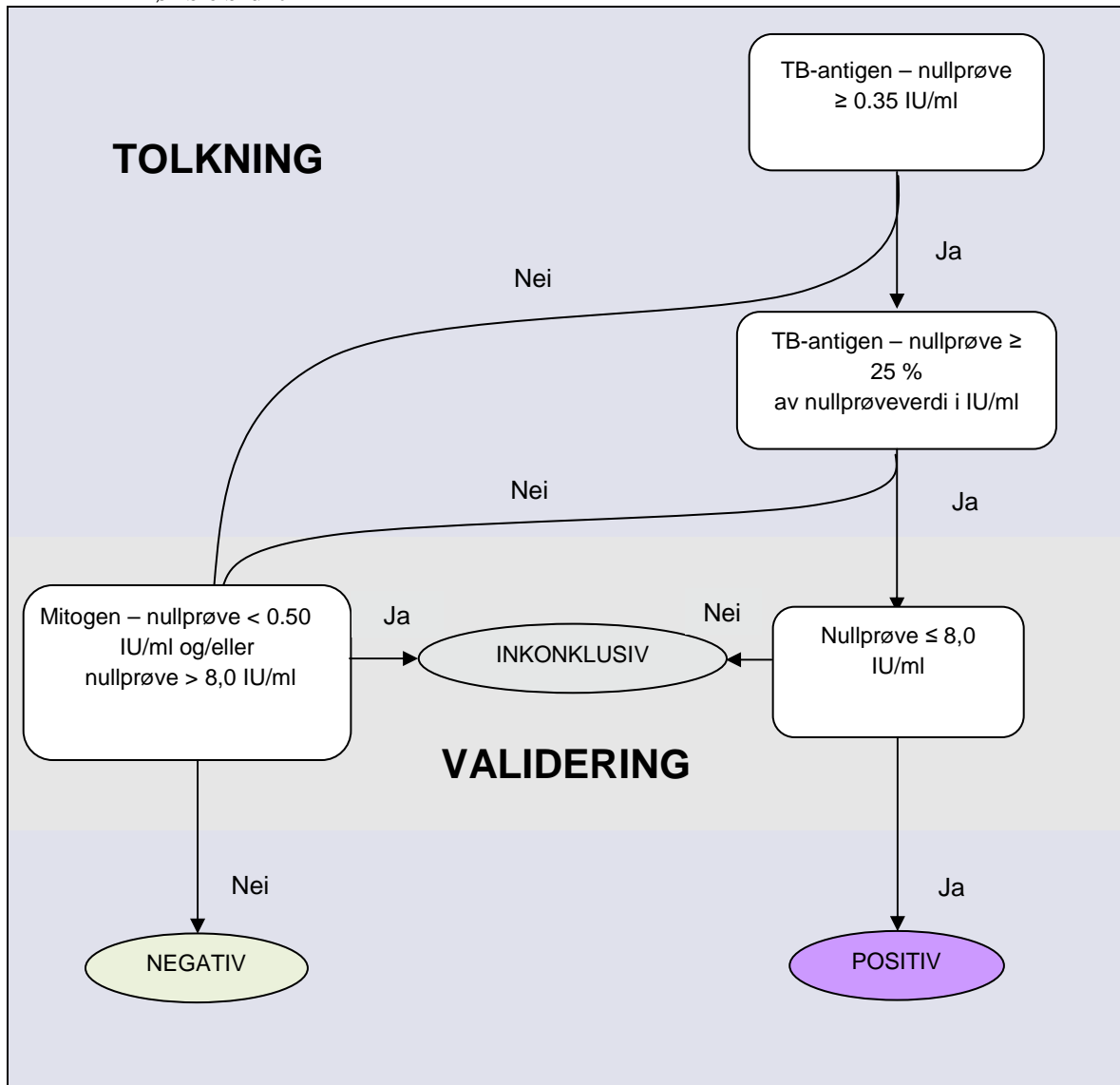
positiv, skal individet anses som test positiv.

³ Se avsnittet om feilsøking for mulige årsaker.

⁴ I kliniske undersøkelser hadde færre enn 0,25 % av objektene IFN- γ -nivåer på > 8,0 IU/ml for Nil-kontroll.

Størrelsen til det målte IFN- γ -nivået kan ikke samsvare med nivå eller infeksjonsgrad, nivå av immunfølsomhet, eller sannsynlighet for progresjon til aktiv sykdom.

FIGUR 4. Tolkning av flytskjema når NIL-,TB-ANTIGEN- og MITOGEN-rør ble brukt



8. BEGRENSNINGER

Resultater fra testing med QuantiFERON®-TB Gold IT, må brukes i sammen med hvert individs epidemiologiske historikk, gjeldende medisinske status og andre diagnostiske vurderinger.

Individer med Nil-verdier større enn 8 IU/ml klassifiseres som "ubestemmelige", fordi en 25 % høyere respons til TB-antigener kan være utenfor området til analysemålingen.

Upålitelige eller ubestemmelige resultater kan forekomme grunnet:

- Avvik fra prosedyren som er beskrevet i pakningsvedlegget,
- Høye nivåer av sirkulerende IFN- γ eller nærvær av heterofile antistoffer,
- Mer enn 16 timer fra blodprøvetaking til inkubering ved 37°C.

9. YTELSESKARAKTERISTIKKER

Kliniske undersøkelser

Fordi det ikke finnes noen definitiv standard for latent tuberkuloseinfeksjon (LTBI), kan ikke et estimat av reaksjon og spesifisitet for QuantiFERON®-TB Gold IT evalueres i praksis. Spesifisitet til QuantiFERON®-TB Gold IT ble anslått ved å evaluere falske positive rater i personene med lav risiko (ingen kjente risikofaktorer) for tuberkuløs infeksjon. Følsomhet ble anslått ved å evaluere pasientgrupper med kulturbestemt aktiv TB-sykdom.

Spesifitet

I en studie i USA som involverte 866 frivillige, ble det tappet blod for QuantiFERON®-TB Gold IT ved tilstedeværelse av en TST. Demografisk informasjon og risikofaktorer for TB ble fastsatt ved bruk av en standardundersøkelse ved testtidspunktet. Av 432 frivillige med ingen kjente risikofaktorer for *M. tuberculosis*-infeksjon, var QuantiFERON®-TB Gold IT og TST-resultater tilgjengelige for 391. Ingen var BCG-vaksinert. En andre spesifisitetstudie ble utført med QuantiFERON®-TB Gold IT hos individer med lav risiko i Japan, av hvilke omtrent 90 % hadde fått BCG-vaksine. Resultater fra begge spesifisitetsstudiene vises i tabell 2.

Tabell 2. QuantiFERON®-TB Gold IT-spesifisitet: Resultater for personer med ingen rapportert risiko for *M. tuberculosis*-infeksjon.

STUDIE	BCG-status % vaksinert	Totalt testet	Ant. QFT-G ubestemmelig	Ant. QFT-G positiv / Ant. gyldige tester	QFT-G spesifisitet (95 % CI)	Ant. TST positiv / Ant. testet	TST* spesifisitet (95 % CI)
USA (upublisert)	0%	391	1	3 / 390	99.2% (97.6-99.8)	6 / 391	98.5% (96.5-99.4)
Japan (upublisert)	~90%	190	4	3 / 186	98.4% (95-99.6)	-	-
TOTALT		581	5/584 (0.9%)	6 / 576	99.0%	-	-

*Bruk av 10 mm TST cut off. TST-spesifisitetsestimat er 99,1 % ved bruk av en 15 mm cut off.

Følsomhet for aktiv TB

TB-mistenkte fra Australia og Japan, som i ettertid ble bekreftet å ha kulturbestemt *M. tuberculosis*-infeksjon, ble testet for å evaluere følsomheten til QuantiFERON®-TB Gold IT. Mens det ikke er noen definitiv standardtest for latent tuberkuloseinfeksjon (LTBI), vil en passende surrogat være mikrobiologisk kultur av *M. tuberculosis*, fordi pasienter med sykdommen per definisjon er smittet. Pasientene hadde mottatt mindre enn 8 dager med behandling før det ble tappet blod for testing med QuantiFERON®-TB Gold IT.

Tabell 3 oppsummerer funn fra de to gruppene med kulturpositive *M. tuberculosis*-pasientene. Generell reaksjon på QuantiFERON®-TB Gold IT for aktiv TB-sykdom var 89 % (48/54).

Tabell 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Objekter med kulturbestemt *M. tuberculosis*-infeksjon.

STUDIE		Sykdom bekreftet ved	Ant. QFT-G positiv / Ant. gyldige tester	QFT-G følsomhet (95 % CI)
Japan TB-pasienter Valideringsstudie		Kultur	24 / 27	89% (72-96%)
Australsk TB-pasienter valideringsstudie	Pulmonær	Kultur	7 / 10	70% (40-89%)
	Ekstrapulmonal		17 / 17	100% (82-100%)
TOTALT			48 / 54	89% (78-95%)

Diagnose av LTBI

En rekke studier er publisert, hvilke viser ytelsen til QuantiFERON®-TB Gold IT i forskjellige befolkninger utsatt for LTBI. Hovedfunnene til enkelte utvalgte studier er vist i tabell 4.

Tabell 4. Utvalgte publiserte studier på QuantiFERON®-TB Gold IT i befolkninger utsatt for LTBI.

STUDIE	Totalt testet	Resultater og funn
Indisk HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁷	726	Funnet svært høye TB-rater. 40% QFT-Gold IT-positiv jfr. 41% TST-positiv ved 10 mm. Høy overensstemmelse med TST, ingen effekt av BCG på begge sider. Begge testene omhandler risikofaktorer for alder og arbeidsperiode i helsevesen
Dansk HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	Generell alminnelig forekomst av LTBI med QFT-Gold IT var 4,6 % (27/590) i HIV ⁺ persons. Positive resultater ble forbundet med TB-risiko. To QFT-Gold IT positive objekter utviklet aktiv TB innen ett år. Ubestemmelige reaksjoner (n=20, 3,4 %) ble betydelig forbundet med en CD4-telling <100 / µl
Barn innlagt ved sykehus (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Barn hvorved det var mistanke om TB eller som hadde en historikk med TB-kontakt, ble testet med QFT-Gold IT og TST. 10,5 % QFT-Gold IT-positiv jfr. 9,5 % TST-positiv ved 10 mm. Overensstemmelsen mellom testene var 95,2 % generell og 100 % i ikke-BCG-vaksinerte.
Tyske kontakter (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Nærkontakter til 15 forskjellige indekskasuser ble testet. 51 % var BCG-vaksinert, 27 % født i utlandet. 70 % av BCG-vaksinerte og 18 % av ikke-vaksinerte var TST-positive (5 mm), mens 9 % og 11 % var QFT-Gold IT-positiv. QFT-Gold IT ble forbundet med TB-risiko. TST ble bare forbundet med BCG-vaksinering.

Mange flere publikasjoner beskriver ytelsen til det mindre sensitive likvide antigenversjonen til QuantiFERON®-TB Gold (forløperen til QuantiFERON®-TB Gold IT) og QuantiFERON®-TB Gold IT-testen. Disse studiene inkluderer bruk av test(ene) i kontakt med aktive TB-kasuser^{9,11, 19, 25}, barn^{6-10, 25, 28}, HIV-positiv^{2, 5, 20}, ansatte i helsevesenet^{13, 26, 32}, pasienter som behandles med immunosuppressive stoffer^{3, 4, 22, 23, 27, 30, 31} så vel som TB-mistenkte^{7, 8, 10, 18} og individer med lav risiko¹⁵.

Repetierbarhet og virkning av TST på etterfølgende QuantiFERON®-TB Gold-testing

Som del av U.S.-spesifisitetsstudien, ble en delmengde av frivillige testet på nytt mellom 4 og 5 uker etter den opprinnelige QuantiFERON®-TB Gold IT-testen og TST. Resultater av QuantiFERON®-TB Gold IT for 260 medlemmer var tilgjengelige ved begge tidspunktene og overensstemmelsesnivået var 99,6 % (259/260). En tidligere TST medførte ikke positive QuantiFERON®-TB Gold IT-reaksjoner.

10. TEKNISK INFORMASJON

Ubestemmelige resultater

Ubestemmelige resultater bør være uvanlige og kan bethe immun status av individet som testes, man kan også være forbundet med en rekke tekniske faktorer:

- Mer enn 16 timer fra blodtapping til inkubering ved 37°C.
- Lagring av blod utenfor anbefalt temperaturområde (22°C ± 5°C)
- Utilstrekkelig blanding av blodprøverør
- Utilstrekkelig vask av ELISA-platen

Dersom det er mistanke om tekniske feil vedrørende innsamling eller håndtering av blodprøver, må hele QuantiFERON®-TB Gold IT-testen gjentas med en ny blodprøve. Gjentatt ELISA-testing av stimulerede plasmaer kan utføres ved mistanke om utilstrekkelig vasking eller annet prosedyreavvik med ELISA-testen. Ubestemmelige tester som resulterer fra lave Mitogen- eller høye Nil-verdier vil ikke kunne forventes å endres ved gjentatt testing, hvis da ikke det var en feil med ELISA-testingen. Ubestemmelige resultater skal rapporteres som sådan. Leger kan velge å tappe en ny prøve eller utføre andre egnede prosedyrer.

Levrede plasmaprøver

Hvis fibrinlevringer opptrer ved langvarig oppbevaring av plasmaprøver, skal prøvene sentrifugeres til levret materiale sedimenterer og muliggjør pipettering av plasma.

ELISA feilsøking

Ikke spesifikk fargeutvikling

MULIG ÅRSAK	LØSNING
Utilstrekkelig vask av platen.	Vask platen minst 6 ganger med 400 µl/brønn vaskebuffer. Det kan være nødvendig med flere enn 6 vaskesykluser, avhengig av vaskeren som benyttes. Det bør anvendes en inntrengningsperiode på minst 5 sekunder mellom hver syklus.
Krysskontaminering av ELISA-brønner.	For å minimere risiko, må man være forsiktig ved pipettering og blanding av prøver.
Sett / komponenter er foreldet.	Sørg for at settet brukes innen utløpsdatoen. Sørg for at rekonstituert Standard og Kobling 100X konsentrat brukes innen tre måneder etter rekonstitueringsdatoen.
Enzymsubstrat-oppløsning er kontaminert.	Kast substratet dersom det har blå farge. Sørg for å bruke rene reagensbeholdere.

Lav optisk tetthetsmåling for standarder

MULIG ÅRSAK	LØSNING
Standard fortynningsfeil.	Sørg for at fortynninger av settet Standard klargjøres korrekt i henhold til pakningsvedlegget.
Pipetteringsfeil.	Forsikre deg om at pipettene er kalibrerte og brukes i henhold til produsentens instruksjoner.
Inkuberingstemperatur for lav.	Inkubering av ELISA skal utføres ved romtemperatur, 17°C til 27°C.
Inkuberingstid for kort.	Inkubering av platen med koblingen, standarder og prøver skal være i 120 ± 5 minutter. Enzymsubstrat-oppløsningen inkuberes på platen i 30 minutter.
Bruk av feil plateleserfilter.	Platen skal leses ved 450 nm med et referansefilter på mellom 620 og 650 nm.
Reagenser er for gamle.	Alle reagenser, med unntak av Kobling 100X konsentrat, må bringes til romtemperatur før analysen starter. Dette tar omtrent én time.
Sett / komponenter er foreldet.	Sørg for at settet brukes innen utløpsdatoen. Sørg for at rekonstituert Standard og Kobling 100X konsentrat brukes innen tre måneder etter rekonstitueringsdatoen.

Høy bakgrunn

MULIG ÅRSÅK	LØSNING
Utilstrekkelig vask av platen.	Vask platen minst 6 ganger med 400 µl/brønn vaskebuffer. Det kan være nødvendig med flere enn 6 vaskesykluser, avhengig av vaskeren som benyttes. Det bør anvendes en inntrengningsperiode på minst 5 sekunder mellom hver syklus.
Inkuberingstemperatur for høy.	Inkubering av ELISA skal utføres ved romtemperatur, 17°C til 27°C.
Sett / komponenter er foreldet.	Sørg for at settet brukes innen utløpsdatoen. Sørg for at rekonstituert Standard og Kobling 100X konsentrat brukes innen tre måneder etter rekonstitueringsdatoen.
Enzymsubstrat-oppløsning er kontaminert.	Kast substratet dersom det har blå farge. Sørg for å bruke rene reagensbeholdere.

Ikke-lineær standardkurve og dobbel variabilitet

MULIG ÅRSÅK	LØSNING
Utilstrekkelig vask av platen.	Vask platen minst 6 ganger med 400 µl/brønn vaskebuffer. Det kan være nødvendig med flere enn 6 vaskesykluser, avhengig av vaskeren som benyttes. Det bør anvendes en inntrengningsperiode på minst 5 sekunder mellom hver syklus.
Standard fortynningsfeil.	Sørg for at fortynninger av Standard klargjøres korrekt i henhold til pakningsvedlegget.
Dårlig blanding.	Bland reagenser godt ved inversjon eller forsiktig rotasjon før de settes på platen.
Inkonsekvent pipetteringsteknikk eller avbrudd under oppsett av analysen.	Prøve- og standardtillegg skal utføres på kontinuerlig måte. Alle reagenser skal klargjøres før analysen starter.

Analyseprosedyrevideo og løsning på de fleste tekniske problemene finner du på CD-ROM-en
Produktinformasjon og teknisk rettledning kan fås gratis fra Cellestis eller via din distributør.

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.

13. FORKORTET TESTPROSEDYRE

TRINN 1 - BLODINKUBASJON

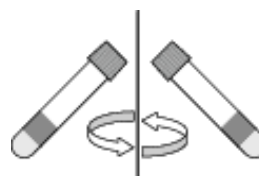
1. Samle pasientblod i blodprøverør og bland ved å **riste rørene kraftig i 5 sekunder (eller 10 ganger)** for å sikre at **hele den indre overflaten til røret** er dekket med blod.



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



3. Etter inkubasjon, skal rørene sentrifugeres i 5 til 15 minutter ved 2000 til 3000 g RCF (g) for å separere plasmaet og de røde blodlegemene.

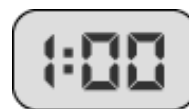


4. Etter sentrifugering skal plasmaprøve høstes fra hvert rør for IFN- γ -kvantifisering.



TRINNS 2 – IFN- γ ELISA

1. Ekvilibrere ELISA-komponenter, med unntak av Kobling 100X konsentrat, til romtemperatur i minst 60 minutter.

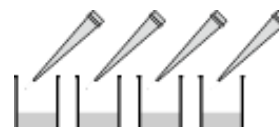


2. Rekonstituer settet Standard til 8,0 IU/ml med destillert eller avionisert vann. Klargjør fire (4) standard fortynninger.

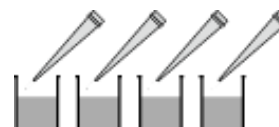


3. Rekonstituer frysetørket Kobling 100X konsentrat med destillert eller avionisert vann.

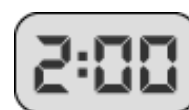
4. Klargjør arbeidsstyrke kobling i Grønn oppløsning og tilsett 50 μ l til alle brønnene.



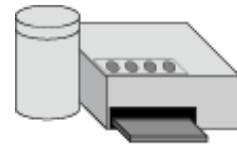
5. Tilsett 50 μ l testplasma prøver og 50 μ l standarder til de egnede brønnene. Bland ved bruk av en shaker.



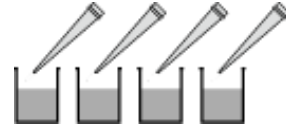
6. Inkuber i 120 minutter ved romtemperatur.



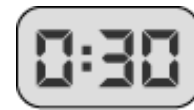
7. Vask brønner minst 6 ganger med 400 μ l/brønn vaskebuffer.



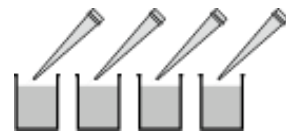
8. Tilsett 100 μ l enzymsubstrat-oppløsning til brønnene. Bland ved bruk av en shaker.



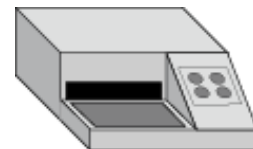
9. Inkuber i 30 minutter ved romtemperatur.



10. Tilsett 50 μ l stoppeløsning til alle brønnene. Bland ved bruk av en shaker.



11. Les resultater på 450 nm med et 620 til 650 nm referansefilter.



12. Analyseresultater.





Produsert for:
Cellestis Limited (Australia) og Cellestis GmbH (Europe)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Australia
Telefon (Austr.) +61 3 9571 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0
E-post: quantiferon@cellestis.com
Nettsted: www.cellestis.com

Dok. nr. 05990301C
August 2009

