



März 2023

QuantiFERON[®]-TB Gold Plus ELISA Kit Gebrauchsanweisung



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Version 1



In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit QuantiFERON[®]-TB Gold Plus Blood Collection
Tubes



622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Deutschland



1123669DE

Inhalt

Verwendungszweck	5
Vorgesehene Anwender	5
Beschreibung und Prinzip	6
Angaben zum Pathogen	6
Zusammenfassung und Erläuterung	7
Assayprinzip	9
Im Lieferumfang enthaltene Materialien	11
Kit-Inhalt	11
Bestandteile des Kits	12
Plattform und Software	12
Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien	13
Zusätzliche Reagenzien	13
Verbrauchsmaterialien	13
Ausstattung/Geräte	13
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen	14
Sicherheitshinweise	14
Informationen für Notfälle	15
Vorsichtsmaßnahmen	16
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	18
Stabilität nach dem Öffnen	18
Rekonstituierte und nicht verbrauchte Reagenzien	18
Lagerung und Handhabung der Proben	19

Protokoll: Durchführung des ELISA.....	20
Ergebnisse (Berechnungen)	26
Erstellung der Standardkurve und Ermittlung der Probenwerte	26
Qualitätskontrolle des Tests.....	28
Interpretation der Ergebnisse.....	30
Einschränkungen	32
Leistungsmerkmale	33
Klinische Studien	33
Sensitivität	35
Erwartete Werte.....	43
Zusammenfassung zur Sicherheit und Leistung	49
Assay-Leistungsmerkmale	50
Analytische Leistung.....	50
Entsorgung.....	63
Verweise	64
Hilfe zur Fehlerbehebung.....	66
Symbole	69
Anhang A: Technische Informationen	72
Unbestimmte Ergebnisse.....	72
Geronnene Plasmaproben	72
Lipämische Plasmaproben	72
Anhang B: Kurzanleitung zum ELISA-Test	73
Bestellinformationen	75
Bearbeitungshistorie des Dokuments.....	77

Verwendungszweck

Der QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) Assay ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur Stimulation von Zellen in heparinisiertem Vollblut mithilfe eines Peptid-Cocktails, der die Proteine ESAT-6 und CFP-10 simuliert. Die *In-vitro*-Reaktion auf diese Peptidantigene, die in Zusammenhang mit einer Infektion durch *Mycobacterium tuberculosis* stehen, wird durch Nachweis von Interferon- γ (IFN- γ) mittels ELISA-Assay (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) festgestellt.

QFT-Plus ist ein indirekter Test auf Infektionen mit *M. tuberculosis* (einschließlich der aktiven Erkrankung) und ist zur Verwendung in Zusammenhang mit Risikoabschätzung, Röntgenuntersuchungen und anderen medizinischen und diagnostischen Verfahren vorgesehen.

Vorgesehene Anwender

Dieses Kit ist für die Anwendung durch Fachkräfte vorgesehen.

Der QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Assay darf nur von geschultem Fachpersonal in einer professionellen Laborumgebung verwendet werden.

Beschreibung und Prinzip

Angaben zum Pathogen

Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, die durch Infektion mit Organismen aus dem *M. tuberculosis*-Komplex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* und *M. caprae*) entsteht. Die Übertragung auf neue Wirte erfolgt üblicherweise aerogen über Tröpfchen, die von Patienten mit Lungentuberkulose ausgestoßen werden. Neu infizierte Personen können binnen Wochen oder Monaten an Tuberkulose erkranken; die meisten Infizierten bleiben jedoch gesund. In einigen Fällen bleibt eine latente Tuberkulose-Infektion (LTBI) bestehen, welche nicht ansteckend ist und asymptomatisch verläuft, aber noch Monate oder Jahre später zum Ausbruch der Tuberkulose führen kann. Der Hauptnutzen der Diagnose einer LTBI liegt darin, eine medizinische Behandlung erwägen zu können, um einen möglichen Ausbruch der Tuberkulose zu verhindern. Mehr als 100 Jahre lang war die einzige verfügbare Methode zur Diagnose einer LTBI der Tuberkulin-Hauttest (THT) (4). Die kutane Sensitivität gegenüber Tuberkulin entwickelt sich zwischen der 2. und 10. Woche nach Infektion. Einige Infizierte, etwa Personen mit Erkrankungen, die die Immunfunktionen beeinträchtigen, aber auch Personen ohne solche Erkrankungen, zeigen jedoch keine Reaktion auf Tuberkulin. Im Gegenzug weisen andere Personen, bei denen eine Infektion mit *M. tuberculosis* unwahrscheinlich ist, nach Impfung mit Bacille Calmette-Guérin (BCG) oder Infektion mit Mykobakterien, die nicht zum *M. tuberculosis*-Komplex gehören, oder aufgrund unbekannter anderer Faktoren eine Sensitivität gegenüber Tuberkulin und entsprechend positive THT-Testergebnisse auf.

Eine Unterscheidung zwischen LTBI und der Krankheit Tuberkulose, einer meldepflichtigen Erkrankung, die üblicherweise die Lungen und die unteren Atemwege befällt, aber auch andere Organsysteme beeinträchtigen kann, ist erforderlich. Die Diagnose der Tuberkulose kann auf der Anamnese und auf körperlichen, radiologischen und mykobakteriellen Befunden beruhen.

Zusammenfassung und Erläuterung

Der QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Test ist die vierte Generation der QuantiFERON-TB Testtechnologie, die das zellvermittelte Ansprechen durch eine quantitative Messung von IFN- γ in einer Vollblutprobe bewertet. QFT-Plus ist ein qualitativer Test, der die zellvermittelte Immunantwort auf Peptidantigene, welche mykobakterielle Proteine simulieren, misst. Diese Proteine, ESAT-6 und CFP-10, sind in sämtlichen BCG-Stämmen und den meisten nichttuberkulösen Mykobakterien (mit Ausnahme von *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum*) nicht vorhanden (1). Im Blut von Personen, die mit einem Organismus aus dem *M. tuberculosis*-Komplex infiziert sind, befinden sich normalerweise Lymphozyten, die diese und andere mykobakterielle Antigene erkennen. Im Laufe dieses Erkennungsprozesses wird das Zytokin IFN- γ von den Zellen produziert und sezerniert. Der Nachweis und die anschließende Quantifizierung von IFN- γ bilden die Grundlage dieses Tests.

Tuberkulin-Hauttests und IGRA-Tests sind zwar hilfreich, reichen aber nicht aus, um eine Infektion mit dem *M. tuberculosis*-Komplex bei kranken Patienten zu diagnostizieren. Ein positives Ergebnis kann die Diagnose einer Tuberkuloseerkrankung unterstützen; jedoch können auch Infektionen durch andere Mykobakterien (z. B. *M. kansasii*) zu positiven Ergebnissen führen. Um die Diagnose einer Tuberkulose bestätigen oder ausschließen zu können, sind weitere medizinische und diagnostische Beurteilungen erforderlich.

Bei den im QFT-Plus Test eingesetzten Antigenen handelt es sich um einen Peptid-Cocktail, welcher die Proteine ESAT-6 und CFP-10 simuliert. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass diese Peptidantigene bei T-Zellen von mit *M. tuberculosis* infizierten Personen IFN- γ -Antworten stimulieren, im Allgemeinen aber nicht bei T-Zellen von nicht infizierten oder mit BCG geimpften Personen, die weder erkrankt sind noch ein Risiko für LTBI aufweisen (1, 2, 6, 9). Allerdings können medizinische Behandlungen oder Erkrankungen, die die Immunfunktionen beeinträchtigen, IFN- γ -Antworten möglicherweise reduzieren. Patienten, die mit bestimmten anderen Mykobakterien infiziert sind, können ebenfalls auf ESAT-6 und CFP-10 ansprechen, da die für diese Proteine kodierenden Gene auch in *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum* vorhanden sind (1, 3, 7).

Die Testpopulation für QFT-Plus Tests sind Patienten mit klinisch bestätigter aktiver Tuberkulose sowie Patienten mit Risiko für eine Tuberkulose-Infektion oder eine latente Tuberkulose-Infektion (LTBI). Es gelten keine Einschränkungen bezüglich Alter, Geschlecht oder sonstigen Kriterien.

Bei einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) spielen CD4⁺ T-Zellen durch ihre Sekretion des Zytokins IFN- γ eine wesentliche Rolle bei der immunologischen Kontrolle. Inzwischen liegen Anhaltspunkte vor, dass CD8⁺ T-Zellen ebenfalls an der Wirtsabwehr gegen MTB beteiligt sind, indem sie IFN- γ und andere lösliche Faktoren produzieren. Diese aktivieren Makrophagen, welche wiederum die Ausbreitung von MTB unterdrücken, infizierte Zellen abtöten oder intrazelluläre MTB direkt lysieren. IFN- γ produzierende MTB-spezifische CD8⁺-Zellen wurden bei Patienten mit LTBI und aktiver TB nachgewiesen. Darüber hinaus wurden ESAT-6- und CFP-10-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten häufiger in Probanden mit aktiver TB gefunden als in solchen mit LTBI. Sie könnten mit einer kürzlich erfolgten MTB-Exposition in Verbindung stehen (8,10–12). MTB-spezifische, IFN- γ produzierende CD8⁺ T-Zellen wurden außerdem bei Probanden mit aktiver TB, die mit HIV koinfiziert waren (13, 14), und bei an Tuberkulose erkrankten Kleinkindern identifiziert (15).

QFT-Plus umfasst zwei separate TB Antigen Tubes: TB Antigen Tube 1 (TB1) und TB Antigen Tube 2 (TB2). Beide Röhrchen enthalten Peptidantigene aus den mit dem MTB-Komplex assoziierten Antigenen ESAT-6 und CFP-10. Sowohl das TB1- als auch das TB2-Röhrchen enthalten Peptide aus ESAT-6 und CFP-10, welche die zellvermittelte Immunantwort durch CD4⁺ T-Helferlymphozyten auslösen sollen, während die Peptide im TB2-Röhrchen zur Stimulation der zellvermittelten Immunantwort durch CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten dienen.

Risikofaktoren für eine Infektion mit *M. tuberculosis* sind u. a. in der Anamnese enthaltene, medizinische oder epidemiologische Prädiktoren für eine Tuberkulose-Erkrankung oder Tuberkulose-Exposition. Detaillierte Empfehlungen zur Diagnose einer Infektion mit *M. tuberculosis* (einschließlich der aktiven Erkrankung) und zur Auswahl von Testpersonen finden Sie in den aktuellsten WHO-Leitlinien <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment> (16). QFT-Plus wurde in einigen Patientengruppen, die gemäß den aktuellen WHO-Leitlinien zum Screening auf TB-

Infektionen indiziert waren (16), getestet, darunter Personen, die positiv auf das humane Immundefizienz-Virus (HIV) getestet wurden, Kontakte kürzlicher TB-Patienten sowie Personen in beengten Wohnverhältnissen, die einem hohen TB-Risiko ausgesetzt waren (5).

Assayprinzip

QFT-Plus ist ein qualitativer Assay, bei dem zur Gewinnung von Vollblut spezielle Blutentnahmeröhrchen mit Peptidantigenen verwendet werden, die *M. tuberculosis*-Proteine simulieren. Nach einer Inkubation der Blutproben in den Röhrchen für 16 bis 24 Stunden wird das Plasma entnommen und auf das Vorhandensein von in Reaktion auf die Peptidantigene produziertem IFN- γ getestet.

Zunächst wird Vollblut in jedes der vier QFT-Plus Blood Collection Tubes abgenommen. Dabei handelt es sich um ein Nil-Röhrchen, TB1- und TB2-Röhrchen sowie ein Mitogen-Röhrchen. Alternativ kann zur Blutentnahme ein Blutentnahmeröhrchen mit Lithium- oder Natriumheparin als Antikoagulans verwendet werden, aus dem das Blut anschließend in die QFT-Plus Blood Collection Tubes überführt wird.

Die QFT-Plus Blood Collection Tubes werden geschüttelt, um Antigene und Blut zu vermischen, und sollten so bald wie möglich, spätestens jedoch 16 Stunden nach Blutentnahme, bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 16 bis 24 Stunden werden die Röhrchen zentrifugiert, das Plasma wird abgenommen und die Menge an IFN- γ (IE/ml) mittels ELISA gemessen. Der QFT-Plus ELISA verwendet einen rekombinanten Human-IFN- γ -Standard, der gegen ein IFN- γ -Referenzpräparat geprüft wurde (NIH-Ref.: Gxg01-902-535). Die Ergebnisse der Testproben werden in internationalen Einheiten pro ml (IE/ml) ausgegeben und anhand einer Standardkurve bestimmt, die durch Tests von Verdünnungen des im Kit vorhandenen Standards erstellt wurde.

Es ist bekannt, dass im Serum oder Plasma vorliegende heterophile Antikörper (z. B. humane Anti-Maus-Antikörper) bestimmter Personen Immunassays stören. Der Effekt heterophiler Antikörper wurde im QFT-Plus ELISA dadurch minimiert, dass der grünen Verdünnungslösung Normalserum von Mäusen zugegeben und die Mikrotiterplatten-Vertiefungen mit monoklonalen F(ab')₂-Antikörperfragmenten als IFN- γ -Fängerantikörper beschichtet wurden.

Der QFT-Plus-Assay gilt für ein TB-Antigenröhrchen als positiv für die IFN- γ -Reaktion, wenn der Messwert des jeweiligen Röhrchens (IFN- γ in IU/ml) signifikant über dem Nil-Wert liegt. Die Plasmaprobe aus dem Mitogen-Röhrchen dient als IFN- γ -Positivkontrolle für die zu testenden Proben. Wenn eine Blutprobe eine negative Reaktion auf die TB-Antigene zeigt, steht eine schwache Reaktion auf Mitogen (< 0,5 IE/ml) für ein unbestimmtes Ergebnis. Ein solches Muster kann auftreten bei ungenügender Lymphozytenzahl, herabgesetzter Lymphozytenaktivität infolge unsachgemäßer Probenbehandlung, unsachgemäßem Befüllen oder Mischen des Mitogen-Röhrchens oder in Fällen, in denen die Lymphozyten des Patienten nicht in der Lage sind, IFN- γ zu bilden. Erhöhte Messwerte für IFN- γ in der Nil-Probe können in Gegenwart heterophiler Antikörper oder bei intrinsischer IFN- γ -Sekretion auftreten. Das Nil-Röhrchen dient zur Korrektur des Hintergrunds (z. B. erhöhter Gehalt an zirkulierendem IFN- γ oder Vorhandensein heterophiler Antikörper). Der IFN- γ -Wert des Nil-Röhrchens wird von den für die TB-Antigenröhrchen und das Mitogen-Röhrchen erhaltenen IFN- γ -Werten abgezogen. Der Messbereich des QFT-Plus ELISA reicht bis zu 10 IE/ml.

Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Kit-Inhalt

ELISA-Komponenten Katalog-Nr.	2-Platten-Kit 622120	Laborpackung zu Referenzzwecken 622822
Microplate Strips (Mikrotiterplattenstreifen, 12 x 8 Wells, beschichtet mit monoklonalen Mausantikörpern gegen Human-IFN- γ)	2 Sätze von Mikrotiterplattenstreifen, 12 x 8	20 Sätze von Mikrotiterplattenstreifen, 12 x 8
IFN- γ Standard (IFN- γ -Standard, lyophilisiert, enthält rekombinantes Human-IFN- γ , Rinder-casein, 0,01 % m/v Thimerosal)	1 Fläschchen (8 IE/ml nach der Rekonstitution)	10 Fläschchen (8 IE/ml nach der Rekonstitution)
Green Diluent (grüne Verdünnungslösung, enthält Rinder-casein, Normalserum von Mäusen, 0,01 % m/v Thimerosal)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate (100x Konjugatkonzentrat, lyophilisiert, Meerrettichperoxidase (Maus) gegen Human-IFN- γ mit 0,01 % Thimerosal)	1 x 0,3 ml (nach der Rekonstitution)	10 x 0,3 ml (nach der Rekonstitution)
Wash Buffer 20x Concentrate (20x Waschpufferkonzentrat, pH 7,2, mit 0,05 % v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratlösung, mit H ₂ O ₂ , 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzymstopplösung, mit 0,5 M H ₂ SO ₄)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
<i>QuantiFERON TB-Gold Plus ELISA Kit</i> <i>Gebrauchsanweisung</i>	1	1

Bestandteile des Kits

Kontrollen und Kalibratoren

Der QFT-Plus ELISA verwendet einen rekombinanten Human-IFN- γ -Standard, der gegen ein IFN- γ -Referenzpräparat geprüft wurde (NIH-Ref.: Gxg01-902-535).

Plattform und Software

Zur Analyse der Rohdaten und der Berechnung von Ergebnissen kann die optionale QFT-Plus Analysis Software verwendet werden. Sie steht unter www.qiagen.com zum Download zur Verfügung.

Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

Zusätzliche Reagenzien

- QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser (2 Liter)

Verbrauchsmaterialien

- Plattendeckel für eine 96-Well-Platte
- Optional: 1-ml-Mikroröhrchen mit Deckeln in 96-Well-Racks oder unbeschichteten Mikrotiterplatten mit Plastikversiegelungsfolie zur Plasmalagerung (22 Patienten/Rack oder Platte)
- Reagenzbehälter

Ausstattung/Geräte*

- Inkubator, $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (mit oder ohne CO_2 -Zufuhr)
- Kalibrierte Pipetten mit variablem Volumen für die Abgabe von 10 μl bis 1000 μl mit Einwegspitzen
- Kalibrierte Mehrkanalpipette zur Abgabe von 50 μl und 100 μl mit Einwegspitzen
- Schüttler für Mikrotiterplatten mit Geschwindigkeiten zwischen 500 und 1000 U/min
- Mikrotiterplatten-Waschgerät (bei der Handhabung von Plasmaproben wird aus Sicherheitsgründen ein automatisches Plattenwaschgerät empfohlen)
- Mikrotiterplatten-Reader mit 450-nm-Filter und Referenzfilter bei 620 bis 650 nm
- Vortex-Mischer mit variabler Geschwindigkeit
- Zentrifuge zum Zentrifugieren der Blood Collection Tubes bei mindestens 3000 RZB (g)
- Messzylinder, 1 oder 2 Liter

* Stellen Sie vor dem Gebrauch sicher, dass die Geräte gemäß den Empfehlungen des Herstellers geprüft und kalibriert wurden.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Bitte beachten Sie, dass Sie ggf. verpflichtet sind, Ihre lokalen Vorschriften zur Meldung schwerwiegender Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetreten sind, an den Hersteller, seinen autorisierte Vertreter und die Regulierungsbehörde, welcher der Anwender und/oder der Patient unterliegt, zu konsultieren.

In-vitro-Diagnostikum.

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets einen geeigneten Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDS). Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN einsehen und ausdrucken.

- Die Proben sind potenziell infektiös. Proben- und Assay-Abfälle sind gemäß den örtlichen Sicherheitsbestimmungen zu entsorgen.
- Ein negatives QFT-Plus Ergebnis schließt die Möglichkeit einer Infektion mit *M. tuberculosis* oder einer Tuberkuloseerkrankung nicht aus: Falsch negative Ergebnisse können durch das Stadium der Infektion (z. B. Proben vor der Entwicklung der zellulären Immunantwort entnommen), eine fehlerhafte Handhabung der Blood Collection Tubes im Anschluss an die Venenpunktion, eine fehlerhafte Durchführung des Assays oder andere einzelne immunologische Variablen bedingt sein, einschließlich solcher, die mit Komorbiditäten in Verbindung stehen. Heterophile Antikörper oder eine unspezifische IFN- γ -Produktion infolge anderer entzündlicher Erkrankungen kann die spezifischen Reaktionen auf ESAT-6 oder CFP-10-Peptide verdecken.

- Umgekehrt sollte ein positives QFT-Plus Ergebnis nicht als einzige oder endgültige Grundlage für die Diagnose einer Infektion mit *M. tuberculosis* dienen. Eine fehlerhafte Durchführung des Assays kann zu falsch positiven QFT-Plus Ergebnissen führen.
- Einem positiven QFT-Plus Ergebnis sollten weitere medizinische Untersuchungen auf eine aktive Tuberkulose folgen (z. B. AFB-Abstrich (AFB, Acid Fast Bacilli) und -Kultur, Thorax-Röntgen).
- In BCG-Stämmen und den meisten bekannten nichttuberkulösen Mykobakterien kommen ESAT-6 und CFP-10 nicht vor; eine Infektion mit *M. kansasii*, *M. szulgai* oder *M. marinum* könnte jedoch zu einem positiven QFT-Plus Ergebnis führen. Bei Verdacht auf eine dieser Infektionen sollten alternative Tests gewählt werden.
- Ein falsch negatives QFT-Plus Ergebnis kann auf eine fehlerhafte Blutentnahme oder eine unsachgemäße Probenbehandlung und daraus resultierende Beeinträchtigung der Lymphozytenfunktion zurückzuführen sein. Für die sachgemäße Behandlung der Blutproben siehe Abschnitt „Protokoll: Durchführung des ELISA“, Seite 20. Verzögerungen bei der Inkubation können zu falsch negativen oder unbestimmten Ergebnissen führen, und andere technische Parameter können die Fähigkeit zum Nachweis einer bedeutenden IFN- γ -Reaktion beeinträchtigen.

Informationen für Notfälle

CHEMTREC

Außerhalb der USA und Kanadas +1 703 527-3887

Vorsichtsmaßnahmen

<p>VORSICHT</p> 	<p>Behandeln Sie Humanblutproben stets als potenziell infektiös.</p> <p>Die einschlägigen Richtlinien zum Umgang mit Blut sind zu beachten. Proben und Materialien, die mit Blut oder Blutprodukten in Kontakt gekommen sind, müssen gemäß den auf Bundes-, Landes- und kommunaler Ebene geltenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.</p>
--	---

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Enthält: Schwefelsäure. Warnung! Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Warnung! Bewirkt leichte Hautreizung. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

QuantiFERON Green Diluent



Enthält: Tartrazin. Warnung! Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Schädlich für Wasserorganismen mit langfristigen Auswirkungen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

Weitere Informationen

Sicherheitsdatenblätter: www.qiagen.com/safety

- Thimerosal wird in einigen QFT-Plus Reagenzien als Konservierungsmittel eingesetzt. Bei Verschlucken, Einatmen oder Hautkontakt kann es toxisch sein.
- Abweichungen von der *QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Gebrauchsanweisung* können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Bitte lesen Sie die Anweisungen vor Gebrauch sorgfältig durch.
- Verwenden Sie das Kit nicht, wenn Reagenzflaschen vor Gebrauch beschädigt oder undicht erscheinen.
- **Wichtig:** Fläschchen vor der Verwendung prüfen. Keine Konjugat- oder IFN- γ -Standard-Fläschchen verwenden, bei denen Zeichen einer Beschädigung sichtbar sind oder deren Gummidichtung beeinträchtigt ist. Defekte Fläschchen nicht anfassen. Fläschchen unter Beachtung geeigneter Vorsichtsmaßnahmen sicher entsorgen. Es wird empfohlen, das Konjugat- bzw. IFN- γ -Standard-Fläschchen mit einer Entbördelzange zu öffnen, um die Verletzungsgefahr durch die metallene Bördelkappe zu minimieren.
- Komponenten wie Mikrotiterplattenstreifen, IFN- γ -Standard, grüne Verdünnungslösung oder 100x Konjugatkonzentrat von unterschiedlichen QFT-Plus Kit-Chargen dürfen nicht zusammen verwendet oder vermischt werden. Andere Reagenzien (20x Waschpufferkonzentrat, Enzymsubstratlösung und Enzymstopplösung) können zwischen den Kits ausgetauscht werden, vorausgesetzt, das Verfallsdatum der Reagenzien ist noch nicht abgelaufen und die Chargendaten werden notiert.
- Nicht benötigte Reagenzien und biologische Proben müssen gemäß den auf Bundes-, Landes- und kommunaler Ebene geltenden Bestimmungen entsorgt werden.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums darf das QFT-Plus ELISA Kit nicht mehr verwendet werden.
- Zu jedem Zeitpunkt sind korrekte Laborverfahren anzuwenden.
- Stellen Sie sicher, dass Laborausüstung wie Plattenwäscher und -leser für die Verwendung kalibriert/validiert wurden.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten aufgedruckten Verfallsdaten und Lagerungsbedingungen sind zu beachten. Abgelaufene oder falsch gelagerte Komponenten dürfen nicht verwendet werden.

Stabilität nach dem Öffnen

- Das ELISA Kit bei 2–8 °C lagern.
- Die Enzymsubstratlösung ist stets vor direkter Sonneneinstrahlung zu schützen.

Rekonstituierte und nicht verbrauchte Reagenzien

- Für Anweisungen zur Rekonstitution der Reagenzien siehe Abschnitt „Protokoll: Durchführung des ELISA“, Seite 20.
- Der rekonstituierte Kit-Standard ist bei Lagerung bei 2–8 °C bis zu 3 Monate lang haltbar.

Notieren Sie das Datum der Rekonstitution des Kit-Standards.

- Das 100x Konjugatkonzentrat muss nach der Rekonstitution bei 2–8 °C gelagert und innerhalb von 3 Monaten aufgebraucht werden.

Notieren Sie das Datum der Rekonstitution des Konjugats.

- Gebrauchsfertig verdünntes Konjugat muss innerhalb von 6 Stunden nach Zubereitung verwendet werden.
- Gebrauchsfertig verdünnter Waschpuffer ist bei Raumtemperatur bis zu 2 Wochen lang haltbar.
- Mikrotiterplattenstreifen sind nur für den Einmalgebrauch vorgesehen. Nicht verwendete Streifen können vom Plattenrahmen entfernt und für die zukünftige Verwendung gelagert werden.

Lagerung und Handhabung der Proben

Details zum Blutentnahme-Arbeitsablauf für den QFT-Plus Test siehe *QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes Gebrauchsanweisung* (1123668).

Protokoll: Durchführung des ELISA

Wichtige Hinweise vor Beginn

Vorbereitung (erforderliche Zeit zur Assaydurchführung)

- Um mit dem QFT-Plus Assay gültige Ergebnisse zu erzielen, muss der Bediener spezifische Aufgaben innerhalb bestimmter Zeiträume durchführen. Daher wird empfohlen, dass der Bediener vor Verwendung des Assays die einzelnen Phasen der Assaydurchführung sorgfältig plant, um in jeder Phase über ausreichend Zeit zu verfügen. Nachstehend finden Sie Angaben zur geschätzten Dauer sowie zur erforderlichen Zeit bei der gleichzeitigen Durchführung mehrerer Tests.
 - Etwa 3 Stunden für eine ELISA-Platte
 - < 1 Stunde Arbeitszeit
 - Plus 10 bis 15 Minuten für jede zusätzliche Platte

IFN- γ -ELISA

- Informationen über Materialien, die für die Durchführung des ELISA erforderlich sind, siehe Abschnitt „Kit-Inhalt“, Seite 11, und Abschnitt „Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien“, Seite 13.

Verfahren

1. Mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats müssen alle Plasmaproben und Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) gebracht werden. Planen Sie für die Temperaturäquilibrierung mindestens 60 Minuten ein.
2. Nehmen Sie nicht benötigte ELISA-Plattenstreifen aus dem Rahmen, geben Sie sie in die Folienverpackung zurück und lagern Sie diese versiegelt bis zum Gebrauch im Kühlschrank.

3. Sehen Sie mindestens 1 Streifen für die QFT-Plus Standards und eine ausreichende Anzahl von Streifen für die zu testenden Patienten vor (empfohlenes Plattenformat siehe Abbildung 2). Bewahren Sie den Rahmen und den Deckel nach dem Gebrauch für die verbleibenden Streifen auf.
- 3a. Rekonstituieren Sie den IFN- γ -Standard mit der auf dem Etikett des Fläschchens angegebenen Menge an entionisiertem oder destilliertem Wasser. Mischen Sie vorsichtig, um die Schaumbildung zu minimieren, und vergewissern Sie sich, dass der gesamte Inhalt des Fläschchens vollständig aufgelöst wurde. Durch Rekonstitution des IFN- γ -Standards auf das angegebene Volumen erhalten Sie eine Lösung mit einer Konzentration von 8,0 IE/ml.
- 3b. Stellen Sie eine Verdünnungsreihe des rekonstituierten Standards mit 4 IFN- γ -Konzentrationen her (siehe Abbildung 1).
- 3c. Mit den folgenden IFN- γ -Konzentrationen ist eine Standardkurve zu erstellen:
- S1 (Standard 1) enthält 4,0 IE/ml
 - S2 (Standard 2) enthält 1,0 IE/ml
 - S3 (Standard 3) enthält 0,25 IE/ml
 - S4 (Standard 4) enthält 0 IE/ml (nur grüne Verdünnungslösung [Green Diluent, GD])
- 3d. Die Standards sind mindestens in Doppelbestimmungen zu testen.
- 3e. Stellen Sie die Verdünnungen des Kit-Standards für jeden ELISA-Durchgang frisch her.

Verfahren

A	4 Röhrchen beschriften: S1, S2, S3, S4
B	150 μ l GD zu S1, S2, S3 und S4 zugeben
C	150 μ l Kit-Standard zu S1 zugeben und gründlich mischen
D	50 μ l von S1 nach S2 überführen und gründlich mischen
E	50 μ l von S2 nach S3 überführen und gründlich mischen
F	Nur GD dient als Nullstandard (S4)

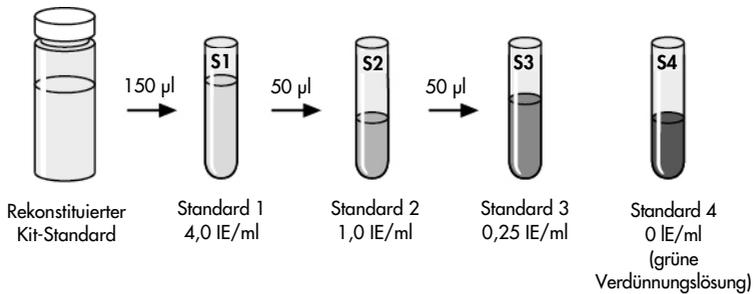


Abbildung 1. Herstellung der Verdünnungsreihen für die Standardkurve.

4. Rekonstituieren Sie das lyophilisierte 100x Konjugatkonzentrat in 0,3 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser. Mischen Sie vorsichtig, um die Schaumbildung zu minimieren, und vergewissern Sie sich, dass der gesamte Inhalt des Fläschchens vollständig aufgelöst wurde.
 - 4a. Das gebrauchsfertig verdünnte Konjugat wird hergestellt, indem Sie die erforderliche Menge des rekonstituierten 100x Konjugatkonzentrats in grüner Verdünnungslösung verdünnen (Tabelle 1).
 - 4b. Gebrauchsfertig verdünntes Konjugat sollte innerhalb von 6 Stunden nach Zubereitung verwendet werden.
 - 4c. Nicht verbrauchtes 100x Konjugatkonzentrat muss sofort nach Gebrauch wieder bei 2 bis 8 °C gelagert werden.

Tabelle 1. Konjugatherstellung (gebrauchsfertige Verdünnung)

Anzahl Streifen	Volumen Konjugat (100x Konzentrat)	Volumen grüne Verdünnungslösung
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Plasmaproben, die aus Blood Collection Tubes gewonnen und anschließend (im Kühlschrank oder gefroren) gelagert wurden, müssen vor der Zugabe zum ELISA-Well gründlich gemischt werden. Plasmaproben können in zentrifugierten QFT-Plus Blood Collection Tubes bis zu 28 Tage bei 2–8 °C aufbewahrt werden, gewonnene Plasmaproben ebenfalls. Gewonnene Plasmaproben können auch bei unter –20 °C (vorzugsweise unter –70 °C) über längere Zeiträume aufbewahrt werden.

Plasmaproben können zur Messung direkt aus den zentrifugierten Blood Collection Tubes in die QFT-Plus ELISA-Platte überführt werden.

Wichtig: Wenn die Plasmaproben direkt aus den zentrifugierten QFT-Plus Blood Collection Tubes überführt werden, ist ein Mischen des Plasmas zu vermeiden. Achten Sie stets darauf, das Material an der Geloberfläche nicht zu verwirbeln.

6. Geben Sie je 50 µl des frisch angesetzten gebrauchsfertig verdünnten Konjugats in jedes Well der ELISA-Platte.

7. Geben Sie je 50 µl der zu testenden Plasmaprobe in die entsprechenden Wells (empfohlenes ELISA-Plattenlayout siehe Abbildung 2).
8. Geben Sie schließlich je 50 µl der Standards 1 bis 4 in die entsprechenden Plattenwells (empfohlenes ELISA-Plattenlayout siehe Abbildung 2). Die Standards sind mindestens in Doppelbestimmungen zu testen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
C	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
G	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Abbildung 2. Empfohlenes ELISA-Plattenlayout. S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4). 1N (Probe 1; Nil-Kontrollplasma), 1 TB1 (Probe 1; TB1-Plasma), 1 TB2 (Probe 1; TB2-Plasma), 1M (Probe 1; Mitogenplasma).

9. Decken Sie die ELISA-Platte ab und mischen Sie das Konjugat und die Plasmaproben bzw. Standards 1 Minute lang gründlich mit einem Schüttler für Mikrotiterplatten bei 500 bis 1000 U/min. Ein Verspritzen muss vermieden werden.
10. Decken Sie die ELISA-Platte ab und inkubieren Sie sie 120 ± 5 Minuten lang bei Raumtemperatur ($22 \text{ °C} \pm 5 \text{ °C}$). Die ELISA-Platte darf während der Inkubation keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden. Eine Abweichung vom angegebenen Temperaturbereich kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
11. Bereiten Sie während der Inkubation der ELISA-Platte den Waschpuffer in gebrauchsfertiger Konzentration vor. Verdünnen Sie dazu einen Teil 20x Waschpufferkonzentrat mit 19 Teilen entionisiertem oder destilliertem Wasser und mischen Sie gründlich. Im Lieferumfang ist ausreichend 20x Waschpufferkonzentrat zur Herstellung von 2 Litern gebrauchsfertig verdünntem Waschpuffer vorhanden.
12. Waschen Sie nach Abschluss der Inkubation der ELISA-Platte die Wells mit 400 µl gebrauchsfertigem Waschpuffer. Führen Sie den Waschschrift mindestens 6-mal durch.

Bei der Handhabung von Plasmaproben wird aus Sicherheitsgründen die Verwendung eines automatischen Plattenwaschgeräts empfohlen.

Sorgfältiges Waschen ist für die Leistung des Assays sehr wichtig. Achten Sie bei jedem Waschzyklus darauf, dass alle Wells vollständig bis oben mit Waschpuffer gefüllt sind. Es empfiehlt sich, den Waschpuffer bei jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken zu lassen.

In den Auffangbehälter für Abfallflüssigkeit sollte ein laborübliches Desinfektionsmittel gegeben werden. Befolgen Sie zudem die in Ihrem Labor geltenden Anweisungen zur Dekontamination potenziell infektiösen Materials.

13. Klopfen Sie die ELISA-Platte umgekehrt auf einem saugfähigen, fusseelarmen Tuch aus, um noch vorhandenen Waschpuffer zu entfernen. Geben Sie 100 µl Enzymsubstratlösung in jedes Well, decken Sie die Platte ab und mischen Sie sie 1 Minute lang gründlich mit einem Schüttler für Mikrotiterplatten bei 500 bis 1000 U/min.
14. Decken Sie die ELISA-Platte ab und inkubieren Sie sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). Die ELISA-Platte darf während der Inkubation keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden.
15. Geben Sie nach der 30-minütigen Inkubation 50 µl Enzymstopplösung in jedes Well. Gehen Sie dazu in der gleiche Reihenfolge vor wie bei Zugabe des Substrats. Mischen Sie die Platte anschließend gründlich mit einem Schüttler für Mikrotiterplatten bei 500 bis 1000 U/min.
16. Messen Sie innerhalb von 5 Minuten nach Stoppen der Reaktion die optische Dichte (OD) jedes Wells der ELISA-Platte mit einem Mikrotiterplatten-Reader unter Verwendung eines 450-nm-Filters und eines Referenzfilters bei 620 nm bis 650 nm. Die OD-Werte werden für die Berechnung der Ergebnisse verwendet.

Ergebnisse (Berechnungen)

Zur Analyse der Rohdaten und der Berechnung von Ergebnissen kann die QFT-Plus Analysis Software verwendet werden. Sie steht unter www.qiagen.com zur Verfügung. Bitte achten Sie darauf, die aktuellste Version der QFT-Plus Analysis Software zu verwenden.

Die Software führt eine Qualitätskontrolle des Assays durch, erstellt eine Standardkurve und liefert für jeden Patienten ein Testergebnis nach der in Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“, Seite 30, beschriebenen Methode. Die Software gibt alle Konzentrationen über 10 IE/ml als „> 10“ aus, da diese Werte oberhalb des validierten linearen Bereichs des ELISA liegen.

Alternativ zur Verwendung der QFT-Plus Analysis Software können die Ergebnisse auch gemäß der folgenden Methode bestimmt werden.

Erstellung der Standardkurve und Ermittlung der Probenwerte

Ohne QFT-Plus Analysis Software

Wenn zur Bestimmung der Standardkurve und der Probenwerte (IE/ml) nicht die QFT-Plus Analysis Software verwendet wird, ist ein Tabellenkalkulationsprogramm wie Microsoft® Excel® erforderlich.

Verwendung eines Tabellenkalkulationsprogramms

1. Ermitteln Sie für jede Platte die OD-Mittelwerte der Bestimmungen des Kit-Standards.
2. Erstellen Sie eine $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -Standardkurve durch Auftragen des $\log_{(e)}$ des OD-Mittelwerts (y-Achse) gegen den $\log_{(e)}$ der IFN- γ -Konzentration der Standards in IE/ml (x-Achse). Der Nullstandard wird bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Berechnen Sie dann die Regressionsgerade für die Standardkurve mittels Regressionsanalyse.

3. Ermitteln Sie anhand der Standardkurve die IFN- γ -Konzentration (IE/ml) der getesteten Plasmaproben. Legen Sie dabei den OD-Wert jeder Probe zugrunde.
4. Für diese Berechnungen können Softwarepakete für Mikrotiterplatten-Reader verwendet werden sowie gängige Tabellenkalkulations- bzw. Statistikprogramme (wie beispielsweise Microsoft Excel). Wir empfehlen die Verwendung solcher Softwarepakete zur Durchführung der Regressionsanalyse und zur Berechnung des Variationskoeffizienten (% VK) der Standards sowie des Korrelationskoeffizienten (r) der Standardkurve.

Probenberechnung

Bei Erhalt der folgenden OD-Messwerte für die Standards würden die Berechnungen mit $-\log(e)$ – denen in Tabelle 2 entsprechen.

Tabelle 2. Standardkurve

Standard	IE/ml	OD-Werte a und b	OD- Mittelwert	% VK	Log _(e) IE/ml	Log _(e) - Mittelwert (OD)
Standard 1	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Standard 2	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Standard 3	0,25	0,114, 0,136	0,125	n. z.	-1,386	-2,079
Standard 4	0	0,034, 0,037	0,036	n. z.	n. z.	n. z.

Die Gleichung der Kurve lautet $y = 0,7885(x) - 0,9837$, wobei „m“ = 0,7885 und „c“ = -0,9837. Diese Werte werden in der Gleichung $X = (Y - c)/m$ verwendet, um nach X aufzulösen. Auf Grundlage der Standardkurve ist der berechnete Korrelationskoeffizient (r) = 1,000. n. z.: nicht zutreffend.

Die Validität des Assays wird mit den in Abschnitt „Qualitätskontrolle des Tests“, Seite 28, aufgeführten Kriterien ermittelt.

Die Standardkurve (Tabelle 2) wird zur Umrechnung der ermittelten Antigen-OD in internationale Einheiten (IE/ml) verwendet.

Tabelle 3. Probenberechnung

Antigen	OD-Wert	\log_{10} -OD-Wert	X	e^x (IE/ml)	Antigen – Nil (IE/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	-
TB1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,16
TB2	1,356	0,305	1,634	5,12	5,07
Mitogen	1,783	0,578	1,981	7,25	7,20

Zur Korrektur des Hintergrunds wird der Wert der jeweiligen Nil-Kontrolle (in IE/ml) von dem IFN- γ -Wert (in IE/ml) für TB1, TB2 und Mitogen subtrahiert. Die entsprechend korrigierten Werte werden zur Interpretation der Testergebnisse herangezogen.

Qualitätskontrolle des Tests

Die Genauigkeit der Testergebnisse hängt von der Erstellung einer korrekten Standardkurve ab. Daher müssen die Ergebnisse der Standards vor Auswertung der Testergebnisse geprüft werden.

Der ELISA liefert gültige Ergebnisse, wenn alle nachstehenden Kriterien erfüllt sind:

- Der OD-Mittelwert von Standard 1 muss $\geq 0,600$ betragen.
- Der Variationskoeffizient (% VK) für die Bestimmungen von Standard 1 und Standard 2 muss ≤ 15 % sein.
- Die OD-Werte für die Bestimmungen von Standard 3 und Standard 4 dürfen höchstens um 0,040 OD-Einheiten vom jeweiligen Mittelwert abweichen.
- Der aus den mittleren Absorptionswerten der Standards berechnete Korrelationskoeffizient (r) muss $\geq 0,98$ sein.
- Werden diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.
- Der OD-Mittelwert des Nullstandards (grüne Verdünnungslösung) muss $\leq 0,150$ sein. Ist der OD-Mittelwert $> 0,150$, muss das Verfahren zum Waschen der Platten überprüft werden.

Die Berechnung und Ausgabe dieser Qualitätskontrollparameter wird mit der QFT-Plus Analysis Software durchgeführt.

Die geeigneten Kontrollmaterialien und die Abstände zwischen den Tests sind von jedem Labor entsprechend den Vorgaben der zuständigen Bundes-, Landes-, kommunalen oder sonstigen Akkreditierungsstellen festzulegen. Eine externe Qualitätsprüfung sowie alternative Validierungsverfahren sind in Erwägung zu ziehen.

Hinweis: Mit rekombinantem IFN- γ versetztes Plasma zeigte bei einer Lagerung bei entweder 2–8 °C oder –20 °C Konzentrationsverluste von bis zu 50 %. Rekombinantes IFN- γ wird daher nicht zur Herstellung der Kontrollstandards empfohlen.

Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse des QFT-Plus Assay werden gemäß den folgenden Kriterien interpretiert (Tabelle 4).

Wichtig: Um eine Tuberkulose diagnostizieren oder ausschließen und die Wahrscheinlichkeit einer LTBI einschätzen zu können, ist eine Kombination aus epidemiologischen, anamnesebezogenen, medizinischen und diagnostischen Ergebnissen erforderlich. Diese sollten bei der Interpretation der QFT-Plus Ergebnisse berücksichtigt werden. Siehe allgemeine Hinweise zur Diagnose und Behandlung einer TB-Erkrankung und LTBI:

(<https://www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/default.htm>).

Tabelle 4. Interpretation der Ergebnisse des QFT-Plus Tests

Nil (IE/ml)	TB1 minus Nil (IE/ml)	TB2 minus Nil (IE/ml)	Mitogen minus Nil (IE/ml)*	QFT-Plus Ergebnis	Bericht/Interpretation
≤ 8,0	≥ 0,35 und ≥ 25 % von Nil	Beliebig	Beliebig	Positiv†	Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> wahrscheinlich
	Beliebig	≥ 0,35 und ≥ 25 % von Nil			
	< 0,35 oder ≥ 0,35 und < 25 % von Nil	< 0,35 oder ≥ 0,35 und < 25 % von Nil	≥ 0,50	Negativ	Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> NICHT wahrscheinlich
	< 0,35 oder ≥ 0,35 und < 25 % von Nil	< 0,35 oder ≥ 0,35 und < 25 % von Nil	< 0,50	Unbestimmt‡	Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> kann nicht ermittelt werden
> 8,0§	Beliebig				

* Die Ergebnisse der Mitogen-Positivkontrolle (und gelegentlich auch die des TB-Antigens) können außerhalb des Messbereichs des Mikrotiterplatten-Readers liegen. Die Testergebnisse werden dadurch nicht beeinträchtigt. Werte > 10 IE/ml werden von der QFT-Plus Software als > 10 IE/ml ausgegeben.

† Wenn eine Infektion mit *M. tuberculosis* nicht vermutet wird, können anfänglich positive Ergebnisse durch eine Testwiederholung der ursprünglichen Plasmaproben in Doppelbestimmung mit dem QFT-Plus ELISA bestätigt werden. Ergibt auch die Testwiederholung für eines oder beide Replikate ein positives Ergebnis, so ist der Test als positiv einzustufen.

‡ Mögliche Ursachen finden Sie unter „Hilfe zur Fehlerbehebung“, Seite 66.

§ Klinische Studien haben ergeben, dass der IFN- γ -Spiegel des Nil-Werts bei weniger als 0,25 % der Patienten > 8,0 IE/ml ist.

Von der Größenordnung des gemessenen IFN- γ -Spiegels kann nicht auf Stadium oder Schweregrad der Infektion, Intensität der Immunreaktion oder die Wahrscheinlichkeit der Progredienz zur aktiven Erkrankung geschlossen werden. Eine positive TB-Reaktion bei Personen, die eine negative Mitogen-Reaktion zeigen, ist selten, bei Tuberkulosepatienten aber bereits aufgetreten. Ein solches Verhalten deutet darauf hin, dass die IFN- γ -Antwort auf TB-Antigene stärker ausfällt als die auf Mitogen, was durchaus möglich ist, da Mitogen die IFN- γ -Produktion durch Lymphozyten nicht maximal stimuliert.

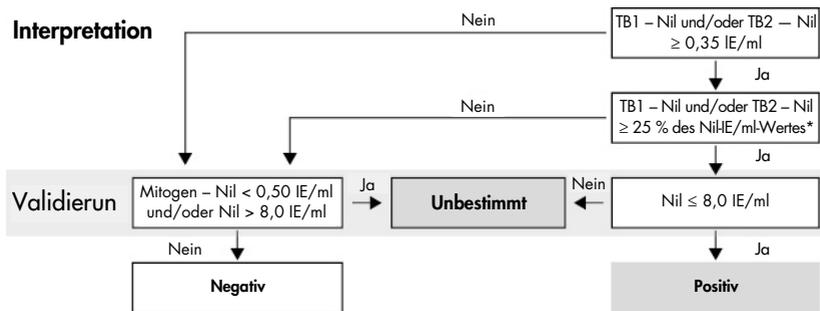


Abbildung 3. Interpretation des QFT-Plus Tests. *Damit die Werte für TB1 minus Nil oder TB2 minus Nil gültig sind, muss der Wert $\geq 25\%$ des Nil-IE/ml-Werts mit dem gleichen Röhrchen ermittelt worden sein wie das ursprüngliche Ergebnis von $\geq 0,35$ IE/ml.

Einschränkungen

Die Ergebnisse des QFT-Plus Assays müssen im Zusammenhang mit der epidemiologischen Anamnese jedes Patienten, dessen aktuellem Gesundheitszustand und sonstigen diagnostischen Untersuchungen bewertet werden.

Patienten mit Nil-Werten über 8 IE/ml werden als „unbestimmt“ eingestuft, da eine um 25 % höhere Reaktion auf die TB-Antigene sich außerhalb des Messbereichs des Assays befinden kann.

- Die Vorhersagekraft eines positiven QFT-Plus Ergebnisses bei der Diagnose einer Infektion mit *M. tuberculosis* ist abhängig von der Wahrscheinlichkeit einer Infektion, welche anhand von in der Anamnese enthaltenen, epidemiologischen, diagnostischen und weiteren Erkenntnissen bewertet wird.
- Für die Diagnose einer LTBI muss die Tuberkulose durch medizinische Bewertungen ausgeschlossen werden, was die Beurteilung der indizierten aktuellen medizinischen und diagnostischen Tests auf die Erkrankung einschließt.
- Ein negatives Ergebnis muss vor dem Hintergrund der medizinischen und sonstigen Anamnesedaten des Patienten, die für die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit *M. tuberculosis* und das potenzielle Risiko einer Progredienz zur Tuberkulose von Bedeutung sind, beurteilt werden, und zwar insbesondere bei Patienten mit eingeschränkter Immunfunktion.

Unzuverlässige oder unbestimmte Ergebnisse können folgende Ursachen haben:

- Abweichungen von dem in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren
- Fehlerhafter Transport/fehlerhafte Behandlung der Blutproben
- Erhöhte Spiegel an zirkulierendem IFN- γ oder Vorliegen heterophiler Antikörper
- Überschreitung der validierten Zeiträume für das Blut von der Blutentnahme bis zur Inkubation. Siehe *QFT-Plus Blood Collection Tubes Gebrauchsanweisung* (1123668).

Leistungsmerkmale

Klinische Studien

Da kein definitiver Standardtest für die Bestätigung oder den Ausschluss der Diagnose von LTBI existiert, ist eine Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des QFT-Plus Tests nicht möglich. Die Spezifität des QFT-Plus Tests wurde näherungsweise durch Auswertung der Falsch-positiv-Rate bei Personen mit geringem Risiko (oder keinen bekannten Risikofaktoren) für eine Tuberkuloseinfektion ermittelt. Die Sensitivität wurde angenähert durch Auswertung von Probanden mit durch Kultur bestätigter aktiver TB. Darüber hinaus wurde die Assay-Leistung in einer Population gesunder Probanden mit identifizierten Risikofaktoren für eine Tuberkuloseinfektion (Population mit uneinheitlichem Risiko) hinsichtlich der positiven und negativen Rate bewertet.

Spezifität

Es wurde eine multizentrische Studie durchgeführt, bei der die klinische Spezifität des QFT-Plus evaluiert wurde. Dazu wurden 733 Probanden untersucht, bei denen entweder von einem geringen Risiko für eine *M. tuberculosis*-Infektion oder keinen Risikofaktoren für eine Infektion oder Erkrankung ausgegangen wurde. Demographische Daten und Risikofaktoren für eine TB-Exposition wurden zum Testzeitpunkt anhand eines standardisierten Fragebogens erhoben. Die Studie wurde an vier unabhängigen Standorten durchgeführt, darunter einem in den USA, zwei in Japan und einem weiteren in Australien. Der QFT-Plus Test wurde mit dem QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT) Test verglichen. Eine Zusammenfassung der Leistungsdaten zur klinischen Spezifität, unterteilt nach Studienzentrum und -region, ist in Tabelle 5 aufgeführt. Die Leistungsergebnisse basieren auf der Gesamtzahl der gültigen Tests. Es gab keine unbestimmten Ergebnisse.

Tabelle 5. Spezifität des QFT-Plus in einer Population mit geringem Risiko

Standort	N	Positiv		Negativ		Unbestimmt		Spezifität (95%-KI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
USA									
(Nr. 1) USA-4	212	2	4	210	208	0	0	99,06 % (210/212) (96,63– 99,74)	98,11 % (208/212) (95,25– 99,26)
Japan									
(Nr. 2) JPN-3	106	1	2	105	104	0	0	99,06 % (105/106) (94,85– 99,83)	98,11 % (104/106) (93,38– 99,48)
(Nr. 3) JPN-1	216	3	5	213	211	0	0	98,61 % (213/216) (96,00– 99,53)	97,69 % (211/216) (94,70– 99,01)
Japan gesamt	322	4	7	318	315	0	0	98,76 % (318/322) (96,85– 99,52)	97,83 % (315/322) (95,6–98,9)
Australien									
(Nr. 4) AU-3	199	8	9	191	190	0	0	95,98 % (191/199) (92,27– 97,95)	95,48 % (190/199) (91,63– 97,60)

Die Spezifität des QFT-Plus betrug in den USA 98,11 %, in Japan 97,83 % und in Australien 95,48 %. Die Gesamtspezifität des QFT-Plus betrug 97,27 % (713/733). Die Spezifität des QFT betrug in den USA 99,06 %, in Japan 98,76 % und in Australien 95,98 %. Die Gesamtspezifität des QFT betrug 98,09 % (719/733).

Als Beispiel für die erwarteten Ergebnisse in einer Population mit geringem Risiko ist eine Aufschlüsselung der Ergebnisse nach dem Typ des TB-Antigenröhrchens und Kombinationen davon dargestellt (Tabelle 6).

Tabelle 6. Ergebnisse der QFT-Plus Spezifitätsstudie nach TB Antigen Tube

Interpretation auf Grundlage von TB-Antigen-Nil	TB1	TB2	QFT-Plus (positiv nach TB1 und/oder TB2)*	Konkordant positiv TB1 und TB2 (alternative Analyse) [†]
Positiv	10	18	20	8
Negativ	723	715	713	725
Unbestimmt	0	0	0	0
Spezifität (95%-KI)	–	–	97,3 % (713/733) (95,8–98,2)	–
Negativitätsrate (95%-KI)	98,6 % (723/733) (97,5–99,3)	97,5 % (715/733) (96,2–98,4)	–	98,9 % (725/733) (97,9–99,5)

* Interpretation auf der Grundlage eines TB-Antigen – Nil-Werts $\geq 0,35$ IE/ml bei beiden (sowohl TB1 als auch TB2) oder bei einem der TB-Röhrchen, um die Interpretationskriterien zu erfüllen, nach denen der QFT-Plus (TB1 oder TB2) als positiv bestimmt wird.

[†] Alternative Analyse nur zu Informationszwecken bereitgestellt.

Bei den Probanden mit geringem TB-Risiko ergab sich für insgesamt 20 von 733 Probanden ein positives Ergebnis. Bei nur 8 dieser Probanden ergab sich ein Wert von $> 0,35$ IE/ml sowohl für TB1- als auch für TB2-Röhrchen. In der Studienkohorte mit niedrigem Risiko wurde ein Vergleich des QFT mit dem QFT-Plus Assay durchgeführt. Die Gesamtübereinstimmung betrug 97,5 % (715/733) und die prozentuale negative Übereinstimmung betrug 98,3 % (707/719).

Sensitivität

Ein definitiver Standardtest auf LTBI existiert zwar nicht, jedoch stellt die mikrobiologische Kultur von *M. tuberculosis* einen geeigneten Ersatz dar, da eine TB-Infektion eine notwendige Voraussetzung für die Krankheit darstellt.

Es wurde eine multizentrische Studie durchgeführt, bei der die klinische Sensitivität des QFT-Plus evaluiert wurde. Dazu wurden 434 Studienteilnehmer untersucht, die Anzeichen und Symptome einer durch Kultur und/oder PCR bestätigten aktiven *M. tuberculosis*-Erkrankung aufwiesen und weder zum Zeitpunkt der Blutabnahme noch innerhalb der letzten 14 Tage vor der Blutabnahme wegen TB behandelt wurden. Die Studie wurde an 7 unabhängigen Standorten durchgeführt, darunter drei in den USA, drei in Japan und einem weiteren in Australien. Der QFT-Plus Test wurde mit dem QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT) Test verglichen. Eine Zusammenfassung der Leistungsdaten zur klinischen Sensitivität nach Studienzentrum und Land ist in Tabelle 7 aufgeführt. Die Leistungsergebnisse basieren auf der Gesamtzahl der gültigen Tests. Die Häufigkeit unbestimmter Ergebnisse für QFT und QFT-Plus betrug 2,3 % (10/434) bzw. 2,5 % (11/434).

Tabelle 7. Zusammenfassung der Studienleistungsdaten zur klinischen Sensitivität, unterteilt nach Studienzentrum und -land, sowie insgesamt

Standort	N	Positiv		Negativ		Unbestimmt		Sensitivität (95%-KI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
USA									
(Nr. 1) USA-5	15	13	13	2	2	0	0	86,67 % (13/15) (62,12– 96,26)	86,67 % (13/15) (62,12– 96,26)
(Nr. 2) USA-1	33	29	29	4	4	0	0	87,88 % (29/33) (72,67– 95,18)	87,88 % (29/33) (72,67– 95,18)
(Nr. 3) USA-4	5	5	5	0	0	0	0	100,0 % (5/5) (56,55– 100,0)	100,0 % (5/5) (56,55– 100,0)
USA gesamt	53	47	47	6	6	0	0	88,7 % (47/53) (77,4–94,7)	88,7 % (47/53) (77,4–94,7)
Japan									
(Nr. 4) JPN-2	76	72	67	1	3	3	6	98,63 % (72/73) (92,64– 99,76)	95,71 % (67/70) (88,14– 98,53)
(Nr. 5) JPN-3	99	97	98	2	1	0	0	97,98 % (97/99) (92,93– 99,44)	98,99 % (98/99) (94,50– 99,82)

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 7. Zusammenfassung der Studienleistungsdaten zur klinischen Sensitivität, unterteilt nach Studienzentrum und -land, sowie insgesamt (fortgesetzt)

Standort	N	Positiv		Negativ		Unbestimmt		Sensitivität (95%-KI)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(Nr. 6) JPN-1	177	159	157	12	15	6	5	92,98 % (159/171) (88,14– 95,94)	91,28 % (157/172) (86,11– 94,64)
Japan gesamt	352	328	322	15	19	9	11	95,63 % (328/343) (92,91– 97,33)	94,43 % (322/341) (91,5–96,4)
Australien									
(Nr. 7) AU-2	29	27	29	1	0	1	0	96,43 % (27/28) (82,29– 99,37)	100,0 % (29/29) (88,30– 100,0)

Die Analyse in der obigen Tabelle beinhaltet keine unbestimmten Ergebnisse.

Die Sensitivität des QFT-Plus betrug in den USA 88,7 %, in Japan 94,43 % und in Australien 100,0 %. Die Gesamtsensitivität des QFT-Plus betrug 94,09 % (398/423). Die Sensitivität des QFT betrug in den USA 88,7 %, in Japan 95,63 % und in Australien 96,43 %. Die Gesamtsensitivität des QFT betrug 94,81 % (402/424).

Als Beispiel für die erwarteten Ergebnisse in einer Population mit bestätigter TB-Infektion ist eine Aufschlüsselung der Ergebnisse nach dem Typ des TB-Antigenröhrchens und nach Kombinationen von Röhrchen dargestellt (Tabelle 8).

Tabelle 8. Ergebnisse der QFT-Plus Sensitivitätsstudie nach TB Antigen Tube

Interpretation auf Grundlage von TB Antigen-Nil in IE/ml	TB Antigen Tube		QFT-Plus (positiv nach TB1 und/oder TB2)
	TB1	TB2	
Positiv	388	397	398
Negativ	32	26	25
Unbestimmt	14	11	11
Sensitivität* (95%-KI)	–	–	94 % (398/423) (91,4–96,0)
Positivitätsrate (95%-KI)	92,4 % (388/420) (89,4–94,6)	93,9 % (397/423) (91,1–95,8)	–

* Mit Ausnahme unbestimmter Werte.

In der Kohorte mit durch Kultur bestätigter aktiver TB (Sensitivitätsstudien-Kohorten) wurde ein Vergleich zwischen QFT und QFT-Plus Assay durchgeführt. Die Gesamtübereinstimmung betrug 95,9 % und die prozentuale positive Übereinstimmung 97,3 % (391/402).

Tabelle 9. Wahrscheinlichkeitsverhältnisse für QFT-Plus

Standort*	Sensitivität	Spezifität	LR+	LR-
Australien	100,00 %	95,48 %	22,11	0,00
Japan	94,43 %	97,83 %	43,44	0,06
USA	88,68 %	98,11 %	47,00	0,12

*Insgesamt

Leistung bei Personen mit identifizierten Risikofaktoren für eine MTB-Infektion (Personen mit uneinheitlichem Risiko)

Eine Kohorte aus 601 Personen mit uneinheitlichen Risikofaktoren für eine TB-Infektion (z. B. HIV-Positivität, Behandlungsanamnese für aktive oder latente TB, Exposition gegenüber aktiver TB, Gesundheitspersonal-Status usw.) wurde sowohl mit dem QFT als auch dem QFT-Plus Test untersucht. Die Risikofaktoren wurden anhand einer standardisierten Umfrage identifiziert und die Personen zeigten zum Zeitpunkt der Rekrutierung keine Symptome einer aktiven TB. Demografische Daten und Risikofaktoren sind in Tabelle 10 aufgeführt. In dieser Population ergab sich für 68/601 Probanden (11,3 %) ein positives QFT-Plus Ergebnis, wobei die prozentuale positive Übereinstimmung (Positive Percent Agreement, PPA) 98,44 % und die prozentuale negative Übereinstimmung (Negative Percent Agreement, NPA) 99,07 % betrug (Tabelle 11). In dieser Kohorte mit 68 gemäß QFT-Plus positiven Probanden waren insgesamt 62 Probanden sowohl nach TB1- als auch nach TB2-Röhrchen positiv, 2 Probanden waren nur nach TB1 positiv und 4 Probanden waren nur nach TB2 positiv. Es wurden keine unbestimmten Ergebnisse (0/601) beobachtet.

Tabelle 10. Demografische Daten und Faktoren im Zusammenhang mit dem TB-Infektionsrisiko in einer uneinheitlichen Kohorte

Probanden gesamt (601)		Anzahl	Prozentsatz
Geschlecht	Männlich	539	89,7 %
	Weiblich	62	10,3 %
Alter (Jahre)	Bereich	18–70	–
	MW	46,7	
BCG-geimpft	Ja	15	2,5 %
	Nein	586	97,5 %
HIV-positiv oder auf HTLV-Viren positiv getestet	Ja	12	2,0 %
	Nein	589	98 %
Vorherige Diagnose einer aktiven TB	Ja	11	1,8 %
	Nein	590	98,2 %
Positiver Tuberkulin-Hauttest (TST)/Mantoux-Test auf TB	Ja	47	7,8 %
	Nein	554	92,2 %
Zuvor bereits wegen aktiver oder latenter TB behandelt	Ja	35	5,8 %
	Nein	566	94,2 %
Mehr als 1 Monat in einem Gefängnis gelebt oder gearbeitet	Ja	373	62,1 %
	Nein	228	37,9 %
Mehr als 1 Monat in einem Obdachlosenasyll gelebt oder gearbeitet	Ja	525	87,4 %
	Nein	76	12,6 %
Gesundheitspersonal	Ja	8	1,3 %
	Nein	593	98,7 %
Enger Kontakt mit Personen mit aktiver TB oder Verdacht auf eine aktive TB	Ja	9	1,5 %
	Nein	592	98,5 %

Tabelle 11. Zusammenfassung der Leistung des QFT-Plus im Vergleich zum QFT bei Probanden mit bekannten Risikofaktoren für eine latente TB-Infektion

		QFT		
		Positiv (+)	Negativ (-)	Insgesamt
QFT-Plus	Positiv (+)	63	5*	68
	Negativ (-)	1*	532	533
	Insgesamt	64	537	601

*Alle 6 Ausreißerproben wiesen in den TB-Antigen-Röhrchen IFN- γ -Konzentrationen auf, die nahe des Assay-Cut-off-Werts lagen.

Die prozentuale positive Übereinstimmung (PPA) und die prozentuale negative Übereinstimmung (NPA) der Ergebnisse von QFT und QFT-Plus betragen:

- PPA: 98,44 % (63/64), 95%-KI (91,67, 99,72)
- NPA: 99,07 % (532/537), 95%-KI (97,84, 99,60)

In Tabelle 12 unten ist die Leistung von QFT-Plus verglichen mit dem QFT Test bei BCG-geimpften Studienteilnehmern dargestellt.

Tabelle 12. Leistung von QFT-Plus verglichen mit dem QFT Test bei BCG-geimpften Studienteilnehmern (kombinierte Daten von Probanden aus Sensitivitäts-, Spezifitäts- und LTBI-Studien)

		QFT		
		Positiv (+)	Negativ (-)	Insgesamt
QFT-Plus	Positiv (+)	66	5	71
	Negativ (-)	3	268	271
	Insgesamt	69	273	342*

* Zwei Probanden der Sensitivitätsstudie wurden aufgrund unbestimmter Ergebnisse aus der Analyse ausgeschlossen.

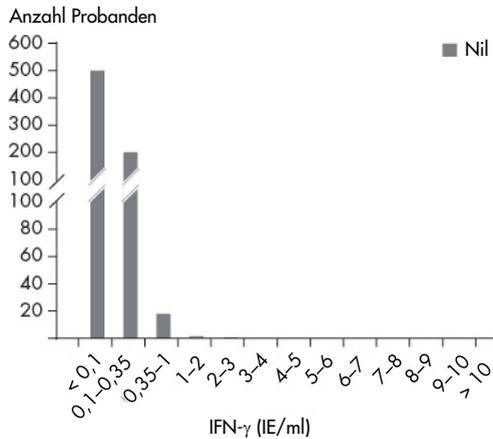
- PPA = 95,6 % (66/69), 95%-KI (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2 % (268/273), 95%-KI (95,79, 99,22)

Erwartete Werte

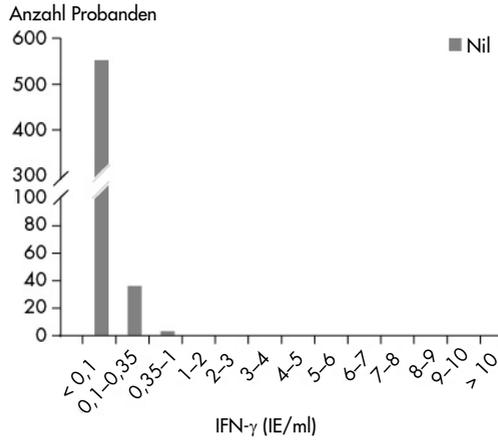
Beobachtete Reaktionsverteilungen – risikostratifiziert

In klinischen Studien wurden verschiedene IFN- γ -Reaktionen auf TB1-, TB2- und Kontrollröhrchen beobachtet und nach Risiko einer *M. tuberculosis*-Infektion stratifiziert (Abbildung 4 bis Abbildung 7). Die Gruppe mit uneinheitlichem Risiko setzt sich aus Probanden zusammen, die eine allgemeine Testpopulation repräsentieren, einschließlich Probanden mit und ohne Risikofaktoren für eine TB-Exposition und solcher, bei denen eine aktive TB unwahrscheinlich ist (d. h. LTBI).

A



B



C

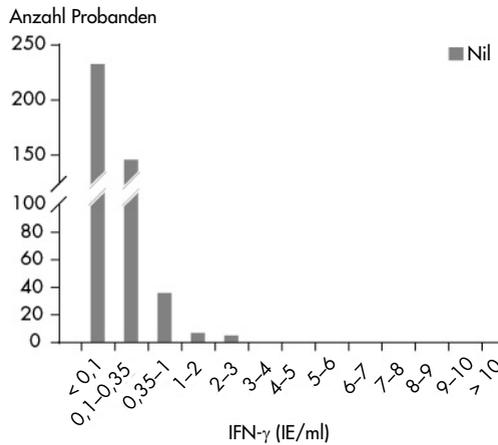
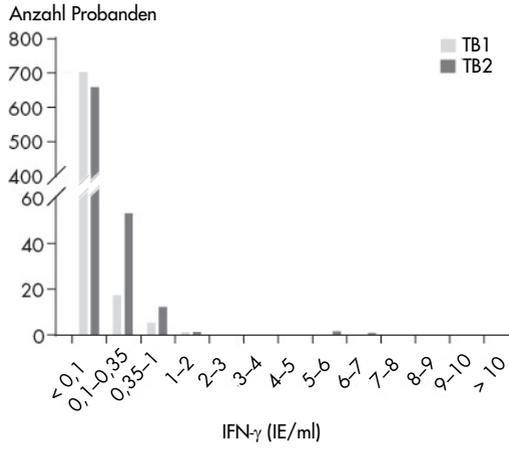
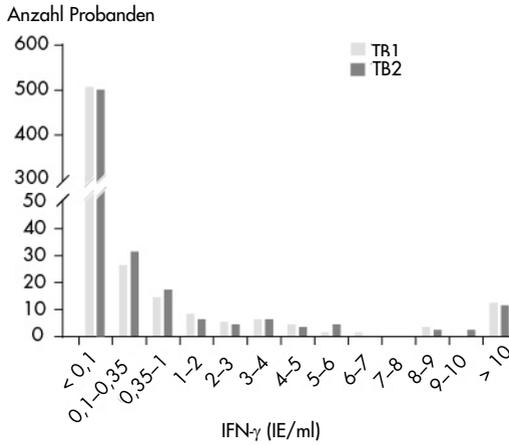


Abbildung 4. Verteilung von Nil. A Verteilung der Nil-Werte in einer Population mit geringem Risiko (n = 744). B Verteilung der Nil-Werte in einer Population mit uneinheitlichem Risiko (n = 601). C Verteilung der Nil-Werte in einer Population mit durch Kultur bestätigter *M. tuberculosis*-Infektion (n = 416).

A



B



C

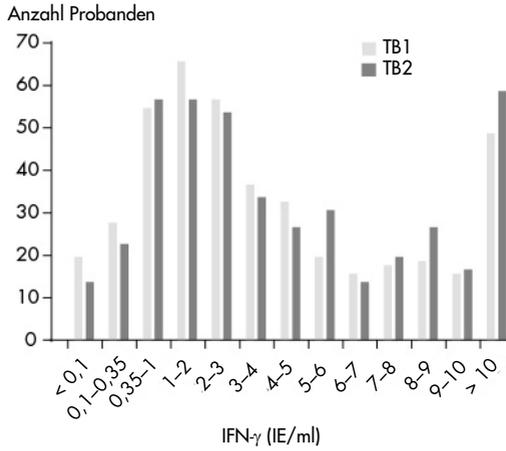
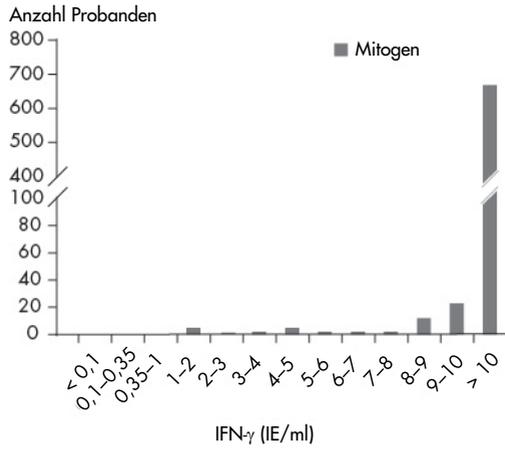
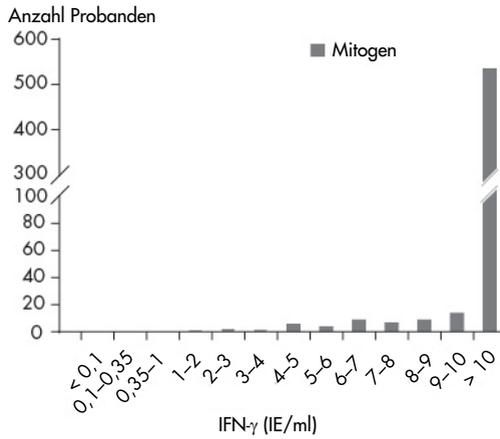


Abbildung 5. Verteilung von TB1 und TB2 (Nil subtrahiert). A Verteilung der TB1- und TB2-Werte (Nil subtrahiert) in einer Population mit geringem Risiko (n = 744). B Verteilung der TB1- und TB2-Werte (Nil subtrahiert) in einer Population mit uneinheitlichem Risiko (n = 601). C Verteilung der TB1- und TB2-Werte (Nil subtrahiert) in einer Population mit durch Kultur bestätigter *M. tuberculosis*-Infektion (n = 416).

A



B



C

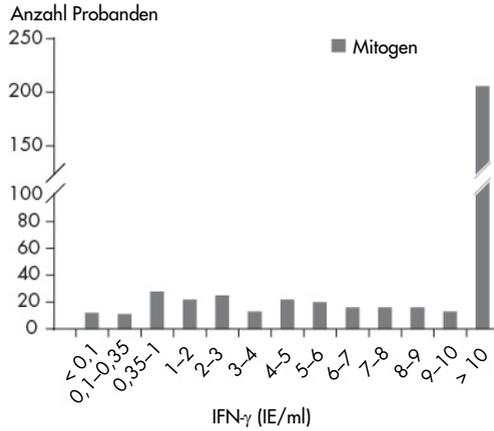


Abbildung 6. Verteilung von Mitogen (Nil subtrahiert). A Verteilung der Mitogen-Werte (Nil subtrahiert) in einer Population mit geringem Risiko (n = 744). B Verteilung der Mitogen-Werte (Nil subtrahiert) in einer Population mit B Risiko (n = 601). C Verteilung der Mitogen-Werte (Nil subtrahiert) in einer Population mit durch Kultur bestätigter *M. tuberculosis*-Infektion (n = 415).

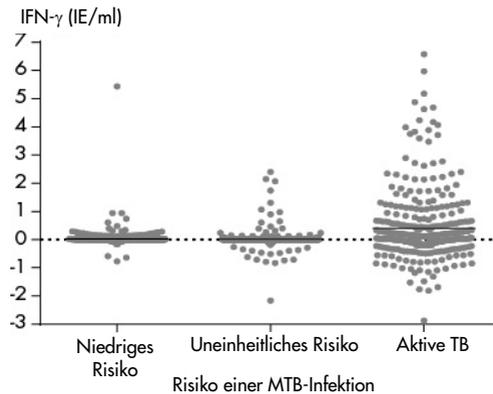


Abbildung 7. Unterschied, der bei Risikostratifizierung zwischen TB1- und TB2-Werten (Nil subtrahiert) festgestellt wurde. Enthält Daten aus der Studie einer Kohorte mit uneinheitlichem Risiko, um Unterschiede zwischen Kohorten mit niedrigem Risiko, aktivem Risiko und uneinheitlichem Risiko aufzuzeigen. Diese Datenanalyse umfasste eine Kohorte mit uneinheitlichem Risiko und bekannten Risikofaktoren. Daher galt für die Kohorte mit niedrigem Risiko $n = 733$, die Kohorte mit uneinheitlichem Risiko $n = 588$ und die Kohorte mit aktiver TB $n = 357$. Die quantitative Differenz in IE/ml für die einzelnen Probanden wurde durch Subtrahieren des TB1-Werts vom TB2-Wert ermittelt.

Zusammenfassung zur Sicherheit und Leistung

Eine Zusammenfassung der Sicherheits- und Leistungsdaten finden Sie auf der EUDAMED-Website.

Assay-Leistungsmerkmale

Analytische Leistung

Cut-off-Wert des Assays

Der Cut-off-Wert des QFT-Plus Assays wurde anhand der Daten von 216 Probanden ohne identifizierte Risikofaktoren für eine TB-Exposition, die BCG-geimpft waren und als infektionsfrei angesehen wurden, sowie von 118 Probanden mit durch Kultur bestätigter *M. tuberculosis*-Infektion bestimmt. Die Sensitivitäts- und Spezifitätsdaten wurden zusammengefasst und mithilfe einer Receiver Operator Characteristic(ROC)-Kurve analysiert. Aus diesen mit der ROC-Analyse untersuchten Sensitivitäts- und Spezifitätsdaten ergab sich ein optimaler Cut-off-Wert für den ELISA von 0,35 IE/ml (siehe Abbildung 8).

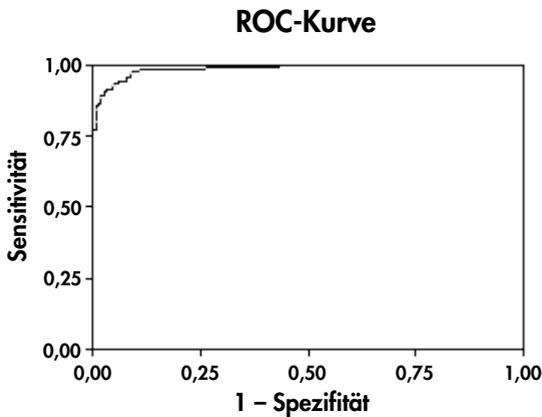


Abbildung 8. ROC-Kurve für die ESAT-6- und CFP-10-Antworten.

Tabelle 13. Sensitivitäts- und Spezifitätswerte für den ELISA bei verschiedenen Cut-offs

Cut-off IE/ml IFN-γ	Sensitivität %	95%-KI	Spezifität %	95%-KI	Sensitivität + Spezifität
0,20	91,53	84,97 % bis 95,86 %	96,31	92,87 % bis 98,40 %	187,84
0,23	91,53	84,97 % bis 95,86 %	96,77	93,47 % bis 98,69 %	188,30
0,26	90,68	83,93 % bis 95,25 %	96,77	93,47 % bis 98,69 %	187,45
0,28	90,68	83,93 % bis 95,25 %	97,24	94,08 % bis 98,98 %	187,92
0,30	89,83	82,91 % bis 94,63 %	97,24	94,08 % bis 98,98 %	187,07
0,31	88,98	81,90 % bis 94,00 %	97,24	94,08 % bis 98,98 %	186,22
0,33	88,98	81,90 % bis 94,00 %	97,70	94,71 % bis 99,25 %	186,68
0,35	88,98	81,90 % bis 94,00 %	98,16	95,35 % bis 99,50 %	187,14
0,39	88,14	80,90 % bis 93,36 %	98,16	95,35 % bis 99,50 %	186,3
0,42	87,29	79,90 % bis 92,71 %	98,16	95,35 % bis 99,50 %	185,45
0,43	86,44	78,92 % bis 92,05 %	98,16	95,35 % bis 99,50 %	184,6
0,45	86,44	78,92 % bis 92,05 %	98,62	96,01 % bis 99,71 %	185,06

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 13. Sensitivitäts- und Spezifitätswerte für den ELISA bei verschiedenen Cut-offs

Cut-off IE/ml IFN-γ	Sensitivität %	95%-KI	Spezifität %	95%-KI	Sensitivität + Spezifität
0,47	85,59	77,94 % bis 91,38 %	99,08	96,71 % bis 99,89 %	184,67
0,48	84,75	76,97 % bis 90,70 %	99,08	96,71 % bis 99,89 %	183,83
0,50	83,90	76,00 % bis 90,02 %	99,08	96,71 % bis 99,89 %	182,98

Linearität

Die Linearität des QFT-Plus ELISA wurde nachgewiesen. Hierzu wurden 11 Plasmapools mit bekannten IFN-γ-Konzentrationen jeweils in Fünffachbestimmung in zufälliger Anordnung auf der ELISA-Platte untersucht. Die Regressionsgerade hat eine Steigung von $1,002 \pm 0,011$ und einen Korrelationskoeffizienten von 0,99 (Abbildung 9).

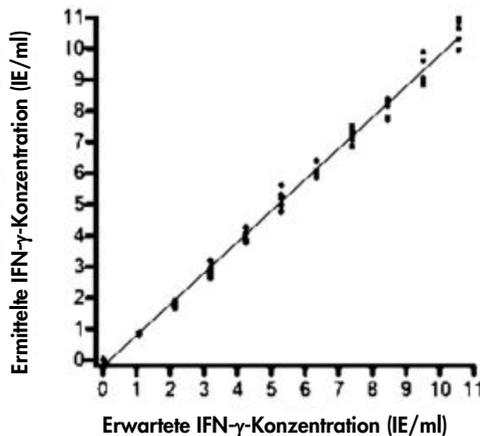


Abbildung 9. Darstellung der Regressionsanalyse aus der Linearitätsstudie – Mittelwert Pool hoch = $-0,24 + 0,9964 \cdot \text{Erwartet}$.

Reproduzierbarkeit

Es wurde eine multizentrische Reproduzierbarkeitsstudie durchgeführt, in der die Leistung des QFT-Plus mit mehreren Bedienern über die Studienstandorte hinweg evaluiert wurde. Dabei handelte es sich um eine prospektive Studie, die an drei externen Teststandorten und einem Entnahmeort durchgeführt wurde. In die Studie wurden insgesamt 32 Studienteilnehmer mit positivem und 34 Studienteilnehmer mit negativem Ergebnis (jeweils ermittelt mittels QFT-Test) aufgenommen. Die Studienteilnehmer waren Heilberufler in den USA. Aufgrund ihrer Berufstätigkeit oder als im Ausland geborenes Gesundheitspersonal aus Orten mit einer TB-Rate von über 50/100.000 stellten die Studienteilnehmer die Gruppe mit uneinheitlichem Risiko für eine TB-Exposition.

Jedem Studienteilnehmer wurde am Entnahmeort Blut in drei Lithiumheparin-Blutentnahmeröhrchen entnommen. Anschließend wurden die Lithiumheparin-Blutentnahmeröhrchen an alle drei Teststandorte geschickt. Dort wurden sie in zwei Sätze QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen und Nil) aliquotiert und gemäß dem QFT-Plus Assay-Verfahren getestet. An jedem Testzentrum wurden die beiden Tests pro Studienteilnehmer von mindestens zwei Bedienern unabhängig durchgeführt. Jeder Bediener war gegenüber den Ergebnissen des anderen Bedieners verblindet, ebenso wie gegenüber dem QFT-Testergebnis des Studienteilnehmers.

Für jeden der 66 Studienteilnehmer wurden an allen 3 Testzentren jeweils sechs Ergebnisse generiert, sodass insgesamt 396 Datenpunkte ermittelt wurden. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14. Zusammenfassung der Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsstudie – prozentuale Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse nach Zentrum, verglichen mit den anderen Bedienern; Patientenproben N = 66

Testzentrum 1 – 2 Bediener	Testzentrum 2 – 2 Bediener	Testzentrum 3 – 3 Bediener
64/66 = 96,97 %	64/66 = 96,97 %	59/66 = 89,39 %
Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse von Röhrchensatz 1 und Röhrchensatz 2	Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse von Röhrchensatz 1 und Röhrchensatz 2	Übereinstimmung der qualitativen Ergebnisse von Röhrchensatz 1 und Röhrchensatz 2

Die qualitative prozentuale Übereinstimmung für alle Studienzentren beträgt 94,7 % (375/396). Bei dieser Berechnung umfasst die Gesamtzahl der übereinstimmenden Testergebnisse (375) sämtliche Fälle, in denen alle 6 Ergebnisse, 5 von 6 Ergebnissen, 4 von 6 Ergebnissen oder 3 von 6 Ergebnissen übereinstimmen.

Inter-Chargen-Wiederholbarkeit

Es wurde eine Studie zur Bestimmung der Inter-Chargen-Variabilität der QFT-Plus Blood Collection Tubes im Vergleich zu den QFT Rörhchen durchgeführt. Insgesamt wurden 30 Probanden getestet (15 bestätigt TB-positiv und 15 bestätigt TB-negativ, jeweils ermittelt mittels QFT-Test). Die Studie umfasste je 3 verschiedene Chargen der QFT-Plus TB1, TB2 und QFT Blood Collection Tubes. Pro Spender und Charge der Blutentnahmerörhchen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nil- und Mitogen-Rörhchen wurden jeweils in einem Replikat getestet.

Das Blut der einzelnen Probanden wurde in Lithiumheparin-Blutentnahmerörhchen entnommen. Anschließend wurde 1 ml Blut in jedes der QFT-Plus und QFT Blood Collection Tubes überführt und gemäß dem Assay-Verfahren untersucht. Die Gesamtvarianz der Ergebnisse der QFT-Plus Rörhchen durfte für jede positive und negative Probengruppe nicht signifikant höher sein als die Gesamtvarianz der Ergebnisse der QFT Rörhchen. Diese wurde anhand des p-Werts bestimmt, der mit dem Varianzhomogenitätstest (HOV, Homogeneity of Variance) nach Levene erzielt wurde. Wenn der p-Wert nicht signifikant war ($p > 0,05$) und/oder die Variation der QFT-Plus TB-Rörhchen geringer war als die des QFT TB-Rörhchens, dann lag zwischen den QFT-Plus und QFT TB-Rörhchen eine Varianz vor.

Tabelle 15. Vergleich der Varianzen zwischen QFT-Plus und QFT TB Blood Collection Tubes mit Levene-HOV-Test

Probenart	Differenz	Effekt	Abhängig	p-Wert	Signifikant
Positiv	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Rest	0,0378	Ja
Positiv	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Rest	0,0540	Nein
Negativ	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Rest	0,1025	Nein
Negativ	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Rest	0,6344	Nein

Die Variation zwischen QFT-Plus und QFT TB Blood Collection Tubes war nicht signifikant, mit Ausnahme des QFT-Plus TB2-Röhrchens bei Tests mit positiven Probanden. Bei Analyse der Schätzung der Standardabweichung war die Variation beim QFT-Plus TB2-Röhrchen geringer (0,06089) als beim QFT TB-Röhrchen (0,07641), wie in Tabelle 16 gezeigt. Daher war die Varianz der QFT-Plus TB1 und TB2 Blood Collection Tubes nicht höher als die des QFT TB Blood Collection Tube.

Tabelle 16. Standardabweichung für Residual- und 95%-Konfidenzintervall für positive Probanden

Probenart	Subtyp	Geschätzte Standardabweichung	95 %-LCL	95 %-UCL
Positiv	QFT	0,07641	0,06826	0,08680
Positiv	TB1	0,06275	0,05605	0,07127
Positiv	TB2	0,06089	0,05439	0,06917

Intra-Chargen-Wiederholbarkeit

Zur Bewertung der Reproduzierbarkeit der QFT-Plus Blood Collection Tubes innerhalb einer Charge wurde eine Studie durchgeführt, in der die IFN- γ -Konzentration aus den Replikaten der mit Blut gefüllten QFT-Plus TB Blood Collection Tubes verglichen wurde.

Sechs Aliquote einer Blutprobe von denselben Probanden mit bestätigter TB-Infektion wurden in 6 Blood Collection Tubes von jeweils einer Charge beider QFT-Plus Röhrchen (TB1 und TB2) getestet. Der Test wurde an 13 Probanden durchgeführt. Der % VK-Wert wurde für jeden einzelnen Probanden sowie für alle Probanden berechnet, um einen mittleren % VK-Wert zu ermitteln, wie in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17. % VK für Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Median und Maximum für die einzelnen QFT-Plus TB Blood Collection Tubes bei TB-positiven Patienten

QFT-Plus Tube	Probenvolumen	Mittelwert (% VK)	Standardabweichung	Minimum	Median	Maximum
TB1	13	13,31	6,88	4,17	12,87	29,56
TB2	13	13,04	7,48	4,86	10,75	29,44

Die Ergebnisse zeigten, dass der mittlere % VK-Wert für TB1 und TB2 ca. 13 % betrug, sodass das Akzeptanzkriterium von ≤ 30 % erfüllt und die Intra-Chargen-Wiederholbarkeit demonstriert wurde.

Leerwertgrenze (Limit of Blank, LoB)

Für den QFT-Plus Assay wurde die Leerwertgrenze (LoB) bestimmt, wobei 14 normale Humanplasmaproben (als Leerwert) in Zweifachbestimmung mit 2 Chargen des QFT-Plus ELISA von 3 Bedienern an 3 Untersuchungstagen mit jeweils einem Bediener pro Untersuchungstag untersucht wurden, sodass für jede Charge des ELISA Kits 84 Bestimmungen vorlagen.

Die LoB-Werte (IE/ml) für die 2 Chargen des ELISA Kits wurden getrennt berechnet, wie der Tabelle 18 zu entnehmen ist.

Tabelle 18. LoB-Werte (IE/ml) für die 2 Chargen des QFT-Plus ELISA Kits

QFT-Plus ELISA Kit	LoB, geschätzt (IE/ml)
Kit 1	0,030
Kit 2	0,040

Der höhere LoB-Wert für die beiden Chargen des QFT-Plus ELISA Kits, 0,040 IE/ml, wurde als der endgültige LoB-Wert angegeben.

Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD)

Für den QFT-Plus Assay wurde die Nachweisgrenze (LoD) bestimmt und durch Zusammenführen von 14 einzelnen Plasmaproben wurde ein TB-negativer Humanplasmapool erzeugt. Jeder der 3 Bediener setzte einen IFN- γ -Referenzstandard von 1,0 IE/ml, verdünnt in Puffer, an. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe mit 8 Konzentrationen erstellt. Die Studie wurde über 3 Tage und mit 3 unterschiedlichen Bedienern unter Verwendung von 2 Chargen des QFT-Plus ELISA Kits durchgeführt. An jedem Untersuchungstag wurden innerhalb jedes Satzes der seriellen Verdünnungsreihe 5 Bestimmungen pro Konzentration durchgeführt, sodass insgesamt 45 Bestimmungen pro Verdünnung der IFN- γ -Konzentration für jede Charge des QFT-Plus ELISA Kits durchgeführt wurden.

Der LoD-Wert für jede getestete Charge des QFT-Plus ELISA Kits wurde getrennt berechnet, wie Tabelle 19 zu entnehmen ist.

Tabelle 19. Geschätzte LoD-Werte (IE/ml) für die 2 Chargen des QFT-Plus ELISA Kits

QFT-Plus ELISA Kit	Wahrscheinlichkeit	Konzentration, geschätzt (IE/ml)	Untere 95%-Konfidenzgrenze der Schätzung	Obere 95%-Konfidenzgrenze der Schätzung
Kit 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Kit 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Der höhere LoD-Wert für die beiden Chargen des QFT-Plus ELISA Kits, 0,065 IE/ml, wurde als der endgültige LoD-Wert angegeben.

Störsubstanzen

Zur Ermittlung der Effekte potenzieller Störsubstanzen auf die Leistung des QFT-Plus ELISA beim Nachweis von IFN- γ wurde eine Studie mit den folgenden Störsubstanzen durchgeführt: Triglyceride (gesamt), Hämoglobin, Protein (Gesamtserum), Bilirubin (konjugiert), Bilirubin (unkonjugiert), Abacavir (als Sulfat), Ciclosporin und Prednisolon. Insgesamt 5 Plasmapools mit bekannten IFN- γ -Konzentrationen wurden mit Störsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen vorbereitet. Die IFN- γ -Konzentration des Basispools wurde zuvor mit einer bekannten Menge an IFN- γ (ca. 0,21, 0,45 und 1,4 IE/ml) vorbereitet. Dieser Pool wurde anschließend zur Vorbereitung der Pools mit den Störsubstanzen verwendet. Die Störsubstanzen wurden in Konzentrationen von 0 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 15 mg/dl und 20 mg/dl untersucht. Die Zielkonzentrationen der Störsubstanzen basierten auf Referenzintervallen, pathologischen Spiegeln, therapeutischen Bereichen und toxischen Bereichen bzw. auf den Empfehlungen des Anbieters oder allgemeinen klinischen Werten. Für jeden Konzentrationslevel der Störsubstanz wurden Sechsfachbestimmungen durchgeführt.

Für jede Probenkonzentration wurde ein Zweistichproben-t-Test durchgeführt, der den Unterschied des mittleren \log_{10} (IE/ml) des primären Interferenzlevels mit der Kontrolle (Level ohne Störsubstanz) verglich (siehe Tabelle 20 und 21). Auch der geschätzte Unterschied bei dem Mittelwert der Reaktion sowie die entsprechenden zweiseitigen 95 %-Konfidenzgrenzen und der p-Wert wurden berichtet.

Tabelle 20. Log10 IE/ml: Tabellarische Übersicht des t-Tests zu den Unterschieden zwischen den Mittelwerten der Kontrolle und des primären Interferenzlevels für jede Störsubstanz und jeden IFN- γ - Konzentrationslevel

Störsubstanz	Interferenzlevel	Probenkonzentration (IE/ml)	Varianz	Mittelwertdifferenz	Unteres 95%-KI	Oberes 95%-KI	p-Wert	OK
Triglyceride	Hoch	1,4	Gleich	0,019	-0,040	0,077	0,491	Ja
		0,45	Gleich	0,004	-0,022	0,030	0,732	Ja
		0,21	Gleich	0,006	-0,035	0,047	0,759	Ja
Hämoglobin	Hoch	1,4	Gleich	-0,005	-0,42	0,032	0,784	Ja
		0,45	Gleich	-0,000	-0,023	0,023	0,981	Ja
		0,21	Gleich	0,000	-0,034	0,035	0,980	Ja
Protein	Hoch	1,4	Gleich	0,004	-0,034	0,042	0,836	Ja
		0,45	Gleich	0,001	-0,38	0,040	0,962	Ja
		0,21	Gleich	-0,008	-0,076	0,060	0,809	Ja
Bilirubin, konjugiert	Hoch	1,4	Gleich	-0,011	-0,057	0,034	0,589	Ja
		0,45	Gleich	-0,002	-0,058	0,053	0,923	Ja
		0,21	Gleich	-0,014	0,074	0,046	0,625	Ja
Unkonjugiertes Bilirubin	Hoch	1,4	Gleich	-0,008	-0,041	0,026	0,614	Ja
		0,45	Gleich	-0,000	-0,042	0,041	0,982	Ja
		0,21	Gleich	-0,000	-0,048	0,048	0,989	Ja
Abacavir	Hoch	1,4	Gleich	0,008	-0,025	0,041	0,601	Ja
		0,45	Gleich	0,012	-0,019	0,044	0,412	Ja
		0,21	Gleich	-0,006	-0,052	0,040	0,770	Ja

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 20. Log₁₀ IE/ml: Tabellarische Übersicht des t-Tests zu den Unterschieden zwischen den Mittelwerten der Kontrolle und des primären Interferenzlevels, für jede Störsubstanz und jeden IFN- γ - Konzentrationslevel

Störsubstanz	Interferenzlevel	Probenkonzentration (IE/ml)	Varianz	Mittelwertdifferenz	Unteres 95%-KI	Oberes 95%-KI	p-Wert	OK
Ciclosporin	Hoch	1,4	Gleich	0,014	-0,020	0,047	0,383	Ja
		0,45	Gleich	0,005	-0,035	0,045	0,773	Ja
		0,21	Gleich	0,024	-0,008	0,056	0,131	Ja
Prednisolon	Hoch	1,4	Gleich	0,017	-0,017	0,050	0,293	Ja
		0,45	Gleich	0,000	-0,036	0,036	0,979	Ja
		0,21	Gleich	0,015	-0,035	0,065	0,524	Ja

Tabelle 21. Log10 IE/ml: Tabellarische Übersicht des t-Tests zu den Unterschieden zwischen den Mittelwerten der Kontrolle und des hohen Interferenzlevels für jede Störsubstanz und jeden IFN- γ - Konzentrationslevel

Störsubstanz	Interferenzlevel	Probenkonzentration (IE/ml)	Varianz	Mittelwertdifferenz	Unteres 95%-KI	Oberes 95%-KI	p-Wert	OK
Triglyceride	Hoch	1,4	Gleich	0,053	-0,004	0,110	0,063	Ja
		0,45	Gleich	0,039	-0,021	0,058	< 0,001	Ja
		0,21	Gleich	0,034	-0,002	0,071	0,061	Ja
Hämoglobin	Hoch	1,4	Gleich	-0,001	-0,042	0,040	0,967	Ja
		0,45	Gleich	0,016	-0,007	0,040	0,152	Ja
		0,21	Gleich	0,014	-0,030	0,059	0,489	Ja
Protein	Hoch	1,4	Gleich	-0,030	-0,071	0,011	0,136	Ja
		0,45	Gleich	0,000	-0,046	0,046	0,992	Ja
		0,21	Gleich	-0,045	-0,103	0,012	0,109	Ja
Bilirubin, konjugiert	Hoch	1,4	Gleich	0,001	-0,046	0,048	0,961	Ja
		0,45	Gleich	0,012	-0,043	0,067	0,639	Ja
		0,21	Gleich	0,015	-0,044	0,074	0,586	Ja
Unkonjugiertes Bilirubin	Hoch	1,4	Gleich	0,015	-0,011	0,042	0,231	Ja
		0,45	Gleich	0,015	-0,023	0,052	0,411	Ja
		0,21	Gleich	0,012	-0,033	0,057	0,566	Ja
Abacavir	Hoch	1,4	Gleich	0,013	-0,015	0,040	0,322	Ja
		0,45	Gleich	0,015	-0,014	0,044	0,283	Ja
		0,21	Gleich	0,008	-0,034	0,050	0,677	Ja

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle von der vorhergehenden Seite

Tabelle 21. Log10 IE/ml: Tabellarische Übersicht des t-Tests zu den Unterschieden zwischen den Mittelwerten der Kontrolle und des hohen Interferenzlevels, für jede Störsubstanz und jeden IFN- γ - Konzentrationslevel

Störsubstanz	Interferenzlevel	Probenkonzentration (IE/ml)	Varianz	Mittelwertdifferenz	Unteres 95%-KI	Oberes 95%-KI	p-Wert	OK
Ciclosporin	Hoch	1,4	Gleich	0,002	-0,019	0,024	0,816	Ja
		0,45	Gleich	0,007	-0,030	0,043	0,682	Ja
		0,21	Gleich	0,015	-0,007	0,038	0,155	Ja
Prednisolon	Hoch	1,4	Gleich	0,007	-0,016	0,030	0,518	Ja
		0,45	Gleich	-0,001	-0,034	0,033	0,964	Ja
		0,21	Gleich	0,021	-0,025	0,068	0,334	Ja

In den Ergebnissen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem primären Interferenzlevel und der Kontrolle (Level ohne Störsubstanz) und für das hohe Interferenzlevel, mit Ausnahme der Triglyceride bei einem Konzentrationslevel von 0,45 IE/ml. Die Mittelwertdifferenz wurde als innerhalb des Bereichs von ± 2 Standardabweichungen ermittelt. Dies belegt, dass der Unterschied innerhalb der zu erwartenden Variabilität des Assays liegt und die Triglyceride keinen störenden Einfluss auf den QFT-Plus ELISA haben.

Entsorgung

Die einschlägigen Richtlinien zum Umgang mit Blut sind zu beachten. Proben und Materialien, die mit Blut oder Blutprodukten in Kontakt gekommen sind, müssen gemäß den auf Bundes-, Landes- und kommunaler Ebene geltenden Sicherheitsbestimmungen entsorgt werden.

Verweise

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 645.
3. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 84.
4. Rothel, J.S., Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: Is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 3, 981.
5. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, 681.
6. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. *J. Immunol.* 166, 439.
7. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. *PLoS Pathol.* 3, 1240.
8. Barcellini, L. et al. (2016) First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur. Respir. J.* 47, 1587.
9. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J. Immunol.* 187, 2222.

10. Rozot, V. et al. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur. J. Immunol. 43, 1568.
11. Nikolava, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 75, 277.
12. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. 69, 533.
13. Ongaya, A. et al. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis 93, S60.
14. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 185, 206.
15. Mazurek, G.H., et al.; IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection – United States, 2010. MMWR Recomm. Rep. 59, 1.
16. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: tuberculosis preventive treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Hilfe zur Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Für technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen wenden Sie sich unter www.qiagen.com/Support an unser Technikus-Zentrum (für Kontaktinformationen besuchen Sie www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Fehlerbehebung beim ELISA

Nicht-spezifische Farbentwicklung

- | | |
|--|---|
| a) Platte unzureichend gewaschen | Waschen Sie die Platte mindestens 6-mal mit 400 µl Waschpuffer pro Well. Je nach verwendetem Waschgerät können mehr als 6 Waschzyklen erforderlich sein. Der Waschpuffer muss in jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken können. |
| b) Kreuzkontamination der ELISA-Well | Achten Sie zur Risikominimierung darauf, die Proben vorsichtig zu pipettieren und zu mischen. |
| c) Kit/Komponenten abgelaufen | Vergewissern Sie sich, dass das Verfallsdatum des Kits nicht abgelaufen ist. Achten Sie darauf, dass Standard und 100x Konjugatkonzentrat nur innerhalb von 3 Monaten nach der Rekonstitution verwendet werden. |
| d) Enzymsubstratlösung verunreinigt | Verwerfen Sie die Substratlösung, wenn sie blau gefärbt ist. Stellen Sie sicher, dass die verwendeten Reagenzbehälter sauber sind. |
| e) Mischen des Plasmas in den QFT- Blood Collection Tubes vor Entnahme | Vermeiden Sie nach der Zentrifugation unbedingt ein Auf- und Abpipettieren oder Mischen des Plasmas vor der Entnahme. Achten Sie stets darauf, das Material an der Geloberfläche nicht zu verwirbeln. |

Niedrige OD-Messwerte für die Standards

- | | |
|--|---|
| a) Fehler beim Verdünnen der Standards | Stellen Sie sicher, dass die Verdünnungen des Kit-Standards wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben hergestellt werden. |
| b) Pipettierfehler | Stellen Sie sicher, dass die Pipetten gemäß den Herstellerempfehlungen kalibriert und verwendet werden. |
| c) Inkubationstemperatur zu niedrig | Die Inkubation des ELISA muss bei Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) durchgeführt werden. |
| d) Inkubationszeit zu kurz | Die Inkubation der Platte mit Konjugat, Standards und Proben muss für 120 ± 5 Minuten erfolgen. Die Enzymsubstratlösung sollte 30 Minuten lang auf der Platte inkubiert werden. |
| e) Falscher Filter im Platten-Reader verwendet | Die Platte muss bei 450 nm gemessen werden, mit einem Referenzfilter zwischen 620 und 650 nm. |
| f) Reagenzien zu kalt | Alle Reagenzien, mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats, müssen vor Durchführung des Assays auf Raumtemperatur gebracht werden. Dies dauert etwa 1 Stunde. |
| g) Kit/Komponenten abgelaufen | Vergewissern Sie sich, dass das Verfallsdatum des Kits nicht abgelaufen ist. Achten Sie darauf, dass Standard und 100x Konjugatkonzentrat nur innerhalb von 3 Monaten nach der Rekonstitution verwendet werden. |

Hoher Hintergrund

- | | |
|----------------------------------|--|
| a) Platte unzureichend gewaschen | Waschen Sie die Platte mindestens 6-mal mit 400 µl Waschpuffer pro Well. Möglicherweise sind mehr als 6 Waschzyklen erforderlich. Der Waschpuffer muss in jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken können. |
|----------------------------------|--|

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|-------------------------------------|--|
| b) Inkubationstemperatur zu hoch | Die Inkubation des ELISA muss bei Raumtemperatur ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) durchgeführt werden. |
| c) Kit/Komponenten abgelaufen | Vergewissern Sie sich, dass das Kit vor Ablauf des Verfallsdatums verwendet wird. Achten Sie darauf, dass Standard und 100x Konjugatkonzentrat nur innerhalb von 3 Monaten nach der Rekonstitution verwendet werden. |
| d) Enzymsubstratlösung verunreinigt | Verwerfen Sie die Substratlösung, wenn sie blau gefärbt ist. Stellen Sie sicher, dass die verwendeten Reagenzbehälter sauber sind. |

Nicht lineare Standardkurve und Variabilität bei Doppelbestimmungen

- | | |
|---|---|
| a) Platte unzureichend gewaschen | Waschen Sie die Platte mindestens 6-mal mit 400 μl Waschpuffer pro Well. Möglicherweise sind mehr als 6 Waschzyklen erforderlich. Der Waschpuffer muss in jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken können. |
| b) Fehler beim Verdünnen der Standards | Stellen Sie sicher, dass die Verdünnungen des Standards wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben hergestellt werden. |
| c) Unzureichendes Mischen | Mischen Sie die Reagenzien gründlich durch Überkopfdrehen oder vorsichtiges Mischen mit dem Vortex-Mischer, bevor sie zur Platte zugegeben werden. |
| d) Nicht einheitliche Pipettierung oder Unterbrechung bei der Assay-Konfiguration | Die Zugabe von Proben und Standards muss in einem kontinuierlichen Prozess erfolgen. Alle Reagenzien sollten vor Beginn des Assays vorbereitet werden. |

Symbole

Die folgenden Symbole werden in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Kennzeichnung verwendet:

Symbol	Bedeutung des Symbols
 <N>	Inhalt ausreichend für <N> Reaktionen
	Verfallsdatum
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der europäischen Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika.
	Autorisierte Vertretung in der Europäischen Gemeinschaft/Europäischen Union
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer (d. h. Kennzeichnung von Komponenten)
	Komponenten
	Enthält
	Anzahl
	Internationale Artikelnummer
Rn	R steht für Revision der Gebrauchsanweisung, n ist die Revisionsnummer

Symbol

Bedeutung des Symbols



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Gebrauchsanweisung beachten



Vor Lichteinwirkung schützen



Warnung/Vorsicht oder Vorsicht, Begleitdokumente beachten

An in vitro diagnostic test using a peptide cocktail simulating ESAT-6 and CFP-10 proteins to stimulate cells in heparinized whole blood.

In-vitro-Diagnostikum zur Stimulation von Zellen in heparinisiertem Vollblut. Hierzu wird ein Peptid-Cocktail verwendet, der die Proteine ESAT-6 und CFP-10 simuliert.



Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs



Enthält biologisches Material menschlichen Ursprungs

Symbol

Bedeutung des Symbols

UDI

Eindeutige Geräteerkennung

tartrazine

Enthält Tartrazin

sulfuric acid

Enthält Schwefelsäure

Anhang A: Technische Informationen

Unbestimmte Ergebnisse

Unbestimmte Ergebnisse sind selten und können auf den Immunstatus des untersuchten Patienten zurückzuführen sein (5); sie können aber auch mit verschiedenen technischen Faktoren zusammenhängen (z. B. unsachgemäße Handhabung/Lagerung der Blood Collection Tubes, unzureichendes Waschen der ELISA-Platte), wenn die oben angegebenen Gebrauchsanweisungen nicht befolgt werden.

Falls technische Probleme bei der Lagerung der Reagenzien, der Blutentnahme oder der Handhabung der Blutproben vermutet werden, muss der gesamte QFT-Plus Test mit neuen Blutproben wiederholt werden. Falls ein unzureichendes Waschen oder andere Verfahrensabweichungen bei der Durchführung des ELISA-Tests vermutet werden, kann der ELISA-Test mit den stimulierten Plasmaproben wiederholt werden. Es steht dem untersuchenden Arzt frei, eine neue Blutprobe abzunehmen oder andere als geeignet erachtete Verfahren anzuwenden.

Geronnene Plasmaproben

Wenn bei der Langzeiltlagerung von Plasmaproben Fibringerinnsel auftreten, zentrifugieren Sie die Proben, damit sich das geronnene Material absetzt und das Plasma abpipettiert werden kann.

Lipämische Plasmaproben

Gehen Sie beim Abpipettieren von lipämischen Proben mit Vorsicht vor, da Fettablagerungen die Pipettenspitzen verstopfen können.

Anhang B: Kurzanleitung zum ELISA-Test

1. Alle Komponenten des ELISA, mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats, mindestens 60 Minuten lang auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen.



2. Den Kit-Standard mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf 8,0 IE/ml rekonstituieren. Vier (4) Standardverdünnungen herstellen.



3. Das gefriergetrocknete 100x Konjugatkonzentrat mit entionisiertem oder destilliertem Wasser rekonstituieren.

4. Gebrauchsfertig verdünntes Konjugat mit Hilfe von grüner Verdünnungslösung herstellen und 50 µl in jedes Well geben.



5. 50 µl der zu testenden Plasmaproben und 50 µl der Standards in die entsprechenden Wells geben. Auf dem Schüttler mischen.



6. 120 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.



7. Die Wells mindestens 6-mal mit 400 µl Waschpuffer pro Well waschen.



8. Je 100 µl Enzymsubstratlösung in die Wells geben. Auf dem Schüttler mischen.



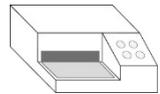
9. 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.



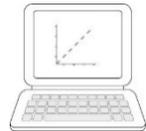
10. 50 μ l Enzymstopplösung in jedes Well geben. Auf dem Schüttler mischen.



11. Ergebnisse bei 450 nm mit einem Referenzfilter zwischen 620 und 650 nm ablesen.



12. Ergebnisse auswerten.



Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit	2-Platten-ELISA Kit	622120
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	20-Platten-ELISA Kit	622822
Related products		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 Röhrchen (je 50 Nil, TB1, TB2 und Mitogen)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 Röhrchen (je 25 Nil, TB1, TB2 und Mitogen)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 Röhrchen (je 1 Nil, TB1, TB2 und Mitogen pro Packung), 10er-Packung	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 Röhrchen (je 50 Nil, TB1, TB2 und Mitogen)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 Röhrchen (je 50 Nil, TB1, TB2 und Mitogen)	623423
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Single Patient Pack	40 Röhrchen (je 1 Nil, TB1, TB2 und Mitogen pro Packung), 10er-Packung	623222

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie in der Gebrauchsanweisung für das jeweilige QIAGEN Kit. Gebrauchsanweisungen für das QIAGEN Kit sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Bearbeitungshistorie des Dokuments

Datum	Änderungen
R2, Juni 2021	Informationen über Single Patient Pack enthalten Tabellen 10 und 11 überarbeitet, um zwischen Daten für QFT-GIT und QFT-Plus zu unterscheiden Informationen über Testpopulation und Messbereich zu Abschnitt „Beschreibung und Prinzip“ hinzugefügt Tabelle 9 mit Daten zum QFT-Plus Wahrscheinlichkeitsverhältnis hinzugefügt
R3, Oktober 2021	Katalognummerierung auf die ursprünglichen Katalognummern zurückgesetzt Hinweis zum Einmalgebrauch von Mikrotiterplattenstreifen zu Kit-Inhalt hinzugefügt
R4, März 2023	Formatierungskorrekturen

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit

Mit der Verwendung dieses Produkts erkennen jegliche Käufer oder Benutzer des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und dieser Gebrauchsanweisung bereitgestellten Protokollen und nur mit den im Panel enthaltenen Komponenten verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu diesem Panel gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu diese Panel gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der Anwendungen, die in den mit dem Produkt bereitgestellten Protokollen, dieser Gebrauchsanweisung sowie zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschrieben werden. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Benutzern für andere QIAGEN-Benutzer zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group), ProClin®, Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

03/2023 L1123669 1123669DE © 2023 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Bestellungen www.qiagen.com/shop | Technischer Support support.qiagen.com |
Website www.qiagen.com