LIOFeron® TB/LTBI

Gebrauchsanweisung

2 Komponenten Kit

Komponente 01

HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES

Σ	1 Test	REF	LIO-Feron 01_1
Σ	22 Tests	REF	LIO-Feron 01_22
Σ	2 x 22 Tests	REF	LIO-Feron 01_44

Komponente 02

HUMAN IFN-γ ELISA

Σ	22 Tests	REF	LIO-Feron 02_22
Σ	44 Tests	REF	LIO-Feron 02_44

Interferon Gamma (IFN-γ) Release Assay (IGRA) in menschlichem Blut zur Diagnose latenter TB-Infektionen (LTBI). Wie bei anderen IGRA-Tests auf dem Markt kann dieser Test auch bei TB-Patienten positiv reagieren, aber nicht zwischen LTBI und aktiver TB unterscheiden. Nur für den professionellen Einsatz in der In-vitro-Diagnostik! Nicht für Eigenanwendung!

IVD In-vitro-Diagnostikum

CE

Hersteller:
LIONEX GmbH
Salzdahlumer Strasse 196, Geb. 1A
38126 Braunschweig, GERMANY
Tel.: +49 (0) 531 - 260 12 66
Fax: +49 (0) 531 - 618 06 54
Web: www.lionex.de

www.lionex.de
Bitte wenden Sie sich an sales@lionex.de

LIONEX Diagnostics and Therapeutics

Inhalt

Vorgesehene Anwendung **3**

Einführung/Anwendungsfeld **3**

Testprinzip 5

Kit Komponenten 6

Zusätzlich erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien 7

Zeitbedarf für den Test 7

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen **8**

Gefahren- und Sicherheitshinweise 9

Probenentnahme und Vorbereitung **10**

Verwendung und Lagerung von Plasma nach der Blutstimulation **10**

Vorbereitung von Reagenzien **11**

Testdurchführung **12**

Stabilität und Lagerbedingungen rekonstituierter Standard und anderer Kit Komponenten **17**

Berechnung und Testinterpretation **18**

Generierung der Standardkurve (x-y Diagramm) 18

Interpretation der Ergebnisse 20

Qualitätskontrolle des Testergebnisses 21

Einschränkungen **22**

Interferierende Substanzen **23**

Leistungsmerkmale **24**

Messbereich des HUMAN IFN-γ ELISA 24

Vergleichsstudien 24

Sensitivität und Spezifität 24

Klinische Sensitivität und Spezifität 25

Leistungsmerkmale 25

Technische Information **27**

Unbestimmte Ergebnisse 27

Geronnenes Human Plasma 27

Anleitung zur Fehlerbehebung **28**

Literatur **30**

Symbole **31**

Kontaktinformation **32**

Kurzbeschreibung des Testverfahrens **33**

Vorgesehene Anwendung

Der **LIOFeron®TB/LTBI** ist ein Zytokin-Nachweis-Test zur quantitativen Bestimmung von Interferon Gamma (IFN-γ), welches von menschlichen Blutzellen nach Stimulation mit *Mycobacterium tuberculosis* Antigenen gebildet wird. Der Test ist für die Diagnose einer latenten TB-Infektion (LTBI) geeignet. Wie bei anderen IGRA-Tests auf dem Markt kann dieser Test auch bei TB-Patienten positiv reagieren, aber nicht zwischen LTBI und aktiver TB unterscheiden.

Der **LIOFeron®TB/LTBI** ist ein 2-Komponenten-Kit, bestehend aus **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** und **HUMAN IFN-γ ELISA**. Der Test ist für den professionellen Einsatz in der In-vitro-Diagnostik bestimmt. Der Test ist NICHT für Eigenanwendung.

Einführung/Anwendungsfeld

Die Human-Tuberkulose hat sich mit deren Wiederaufleben in den westlichen Ländern in den letzten Jahrzehnten zu einer globalen Krankheit entwickelt. TB ist überwiegend eine Erkrankung der Atemwege, kann aber auch andere Organe betreffen. Menschen mit einer aktiven TB sind hoch infektiös. Die Übertragung einer aktiven TB erfolgt am häufigsten durch Tröpfcheninfektion beim Husten oder Niesen über die Inhalation durch Nase oder Mund. Die latente TB-Infektion (LTBI) ist nicht ansteckend und tritt auf, wenn das Immunsystem eine primäre TB-Infektion unterdrücken konnte. Eine LTBI verbleibt ein Leben lang im Körper und kann ausbrechen, wenn das Immunsystem geschwächt ist, wie etwa im Alter, bei Krebserkrankung oder aufgrund einer Infektion mit anderen Krankheiten.

Nach den neuesten Schätzungen der World Health Organization (WHO) gehört die TB weltweit zu den häufigsten zehn Todesursachen und führt die Liste der infektionsbedingten Todesursachen an. Im Jahr 2017 verursachte die TB circa 1.3 Millionen Todesfälle (Variation von 1.2-1.4 Millionen) bei HIV-negativen Patienten und zusätzlich etwa 300.000 Todesfälle (Variation von 266.000-335.000) bei HIV-positiven Patienten. Im Jahr 2017 gab es schätzungsweise 10.0 Millionen neue TB-Fälle (Variation von 9.0-11.1 Millionen)[24]. Arzneimittel-Resistenzen bei HIV-Behandlung und das Auftreten von Multiresistenter (MDR) sowie Extensiv resistenter (XDR) Stämme des Tuberkuloseerregers *M. tuberculosis* erschweren zunehmend die Therapie und führen zu hoffnungslosen Situationen. Nach Einschätzung der WHO wurden im Jahr 2017 weltweit 160.684 MDR -TB Fälle nachgewiesen und gemeldet[24].

Zusätzlich gibt es keine effiziente Impfung gegen HIV und TB, was die Situation weiter verschlimmert. *M. bovis* BCG, das einzige verfügbare Vakzin gegen TB, hat sich als wenig effizient erwiesen und die Impfung ist häufig inaktiv[25].

Die Diagnose einer Infektion mit TB kann hilfreich bei der Entscheidung sein, wie die Therapie gestaltet wird. Konzentrationen verschiedener Zytokine in humanem Blut haben sich als signifikanter Parameter zur Diagnose von Infektionen wie auch mit *M. tuberculosis* bewährt.

T-Lymphocyten von Patienten, die mit *M. tuberculosis* infiziert sind, erkennen mykobakterielle Antigene und lösen eine Zytokinprodution aus, z.B. IFN-γ [9, 12-14]. Die quantitative Bestimmung von IFN-γ bildet die Basis des Interferon-Gamma (IFN- γ) Release Assays (IGRA), **LIOFeron®TB/LTBI**, und kann hilfreich für die Diagnose von aktiver und latenter TB sein. Dieser IGRA Test kann jedoch nicht zwischen aktiver und latenter TB unterscheiden.

IGRA Tests werden verbreitet verwendet, um die IFN- γ-Produktion der humanen Peripheren Mononukleären Blutzellen (PBMCs) bei aktiver und latenter TB nach Kontakt mit rekombinanten Antigenen aus *M. tuberculosis* zu messen. **Die WHO hat IGRAs als den bevorzugten Test für den Nachweis einer latenten TB-Infektion (LTBI) bei BCG-geimpften Personen in Ländern mit geringer TB-Belastung befürwortet.**

LIOFeron®TB/LTBI enthält zwei verschiedene TB-Antigen Röhrchen, TB A und TB B. TB A enthält Antigene, von denen bekannt ist, das diese bei BCG fehlen und die gewöhnlich weithin für IGRA Tests verwendet werden[2-4, 7, 10, 11, 17, 19, 20]. TB B enthält ein patentiertes Antigen der LIONEX GmbH mit CD8+ Epitopen[4, 18].

Testprinzip

Der **LIOFeron®TB/LTBI** besteht aus zwei Hauptkomponenten, den **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** und dem **HUMAN IFN-γ ELISA**. Der Test ist ein Zytokin-Nachweis Test der auf der Tatsache basiert, das humane Blutzellen bei Exposition zu spezifischen *M. tuberculosis* Antigenen IFN-γ bilden.

Je Probe enthalten die **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** je ein Positiv-Kontrollröhrchen, ein Negativ-Kontrollröhrchen und zwei TB-Antigenröhrchen. Die humane Blutprobe wird venös gewonnen und in Li-Heparin Röhrchen gesammelt (nicht im Kit enthalten). Anschließend wird je 1 mL der Probe in die Negativ-, Positive- und TB-Antigenröhrchen des Kits pipettiert. Die Proben in den Röhrchen werden vorsichtig durch Invertieren der Röhrchen gemischt und in einem Inkubator bei 37°C über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag wird der klare Überstand (Plasma) vorsichtig vom Pellet (Blutzellen, rot) getrennt und mittels **HUMAN IFN-γ ELISA** analysiert. Mit dem ELISA wird die Konzentration an IFN-γ bestimmt, welches nach Kontakt der Blutzellen mit den spezifischen *M. tuberculosis* Antigenen produziert wurde. Diese spezifischen Antigene unterscheiden sich von den Antigenen, welche in BCG und in den meisten anderen Mykobakterien vorkommen, welche nicht zum *M. tuberculosis* Komplex gehören (NTM).

Der **HUMAN IFN-γ ELISA** basiert auf dem Prinzip des Enzym Immuno Assays (EIA). Spezifische monoklonale anti-human IFN-γ Antikörper auf der Oberfläche der Mikrotiterplatten fungieren als Fängerantikörper.

Die Plasmaproben aus den **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** werden zusammen mit den Standards in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wird ein Biotin-gekoppelter sekundärer Antikörper (Detektionsantikörperlösung) hinzupipettiert und die Mikrotiterplatte inkubiert. Falls IFN-γ in der Probe enthalten ist, bindet dieses an die auf der Mikrotiterplatte immobilisierten Fängerantikörper. Nach dem ersten Inkubationsschritt wird die Platte mit Waschlösung gewaschen, damit ungebundenes Material entfernt wird. Anschließend an den Waschschritt wird die Konjugatlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert und die Platte wird erneut inkubiert. Nach einem finalen Waschschritt wird die Substratlösung zugefügt, die eine mehr oder weniger starke blaue Farbentwicklung induziert. Die Farbentwicklung wird durch die Zugabe der Stopplösung unterbrochen und die Farbe schlägt von blau nach gelb um. Vertiefungen, die kein IFN-γ enthalten, bleiben farblos. Die Farbentwicklung wird mittels eines ELISA Readers bei 450 nm gemessen. Die Konzentration von IFN-γ ist direkt proportional zur Intensität der Farbe. Dadurch, dass die Proben jeweils parallel zu den Standards gemessen werden, ist die quantitative Bestimmung der IFN-γ Konzentration für jede Probe möglich.

Kit Komponenten

Tabele 1: Komponenten der **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES**:

HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES:					
Farbe des Deckels		Σ REF	1 Test **LIO-Feron 01_1**	22 Tests **LIO-Feron 01_22**	2x 22 Tests **LIO-Feron 01_44**
■	Positiv-Kontrolle (Gebrauchsfertig) enthält Li-Heparin und Mitogen (schwarzer Deckel)	PC	1 Röhrchen	22 Röhrchen	2x 22 Röhrchen
□	Negativ-Kontrolle (Gebrauchsfertig) enthält Li-Heparin (weißer Deckel)	NC	1 Röhrchen	22 Röhrchen	2x 22 Röhrchen
■	TB Antigen A (Gebrauchsfertig) enthält Li-Heparin und LIONEX-Antigen, fehlt in BCG (grüner Deckel)	TB A	1 Röhrchen	22 Röhrchen	2x 22 Röhrchen
■	TB Antigen B (Gebrauchsfertig) enthält Li-Heparin und LIONEX-Antigen mit CD8+ Epitop (blauer Deckel)	TB B	1 Röhrchen	22 Röhrchen	2x 22 Röhrchen

Tabelle 2: Komponenten des **HUMAN IFN-γ ELISA**:

HUMAN IFN-γ ELISA:				
Farbe des Deckels		Σ REF	22 Tests **LIO-Feron 02_22**	2x 22 Tests **LIO-Feron 02_44**
	Mikrotiterplatte (Gebrauchsfertig) mit monoklonalem anti-human IFN-γ Fängerantikörper, versiegelt in Aluminiumverbundbeutel mit Trockenmittel, 12 x 8 Well Streifen	MTP	1 x	2 x
■	Rekombinanter humaner IFN-γ Standard (12,5 IU, lyophilisiert) (roter Deckel)	STA	2 x	4 x
■	Detektionsantikörperlösung (Gebrauchsfertig) mit monoklonalem anti-human IFN-γ Detektionsantikörper, Biotin-gekoppelt, enthält Casein (grüner Deckel)	DET	7 mL	14 mL
■	Konjugatlösung (Gebrauchsfertig) mit Streptavidin, HRP-gekoppelt (gelber Deckel)	CON	14 mL	24 mL
■	Substratlösung (Gebrauchsfertig) enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin* (TMB) (schwarzer Deckel)	TMB	14 mL	24 mL
□	Stopplösung (Gebrauchsfertig) enthält H2SO4* (weißer Deckel)	STO	7 mL	14 mL
■	Waschpuffer (10x Konzentrat) (schwarzer Deckel)	WB	100 mL	2x 100 mL
■	Inkubationspuffer (Gebrauchsfertig) enthält Bovine Serum Albumin (blauer Deckel)	IB	40 mL	40 mL
	Gebrauchsanweisung	i	1 x	1 x

* Lesen Sie den Abschnitt "*Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen*".

Zusätzlich erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

- Einmalhandschuhe; Behälter für Abfälle und potentiell kontaminierte Materialien
- Blutsammelröhrchen(Li-Heparin) mit Entnahmebesteck
- Behälter für die Verdünnung der Standards z.B. sterile 1,5 mL Plastikgefäße, und (optional) für die Plasmasammlung und Lagerung
- Inkubator 37°C (± 0,5 °C), CO_2 ist nicht notwendig
- Zentrifuge, geeignet für Blutsammelgefäße (RCF reichweite von 2000 bis 3000)
- Vortexer
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Bechergläser, Glasflaschen und/oder Meßzylinder für die Vorbereitung des 1 x Waschpuffers
- Kalibrierte Mikroliterpipetten und Einwegspitzen, geeignet für 50 µL bis 1000 µL
- Automatischer Washer für Mikrotiterplatten (96 well, empfohlen) oder kalibrierte Multikanalpipetten, geeignet für 50 µL bis 400 µL mit Einwegspitzen (optional)
- Laboruhr
- Mikrotiterplatten-Reader (450 nm)

Zeitbedarf für den Test

Der Zeitbedarf für die Testdurchführung des **LIOFeron®TB/LTBI** ist unten dargestellt.

HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES:	Pipettieren der Proben in die Röhrchen und Mischen: etwa 10 Minuten pro Probe. Die Inkubationsdauer ist 16 bis 24 Stunden (37°C ± 0,5 °C). Zeitbedarf für die Gewinnung der Plasmaproben: ca. 5 Minuten.
HUMAN IFN-γ ELISA:	Circa 3 h pro Mikrotiterplatte (22 Tests). < 1 h Laborarbeit, zusätzlich ca. 15 Minuten für jede weitere Mikrotiterplatte.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Nur in vitro-Diagnostik! Nicht für Eigenanwendung!

- Befolgen Sie die Anweisungen zur Testdurchführung und Interpretation der Ergebnisse sorgfältig!
- In Übereinstimmung mit der Guten Laborpraxis (GLP) sollten alle eingesetzten Laborgeräte regelmäßig auf Genauigkeit und Präzision überprüft und kalibriert werden.
- Nicht einnehmen oder verschlucken! Im Labor nicht Essen, Trinken oder Rauchen! Nicht ohne Schutzkleidung arbeiten (Einmalhandschuhe, Schutzbrille und Laborkittel)! Kontakt der Kit Reagenzien mit Haut, Augen oder Schleimhäuten vermeiden.
- Verwenden Sie alle Reagenzien innerhalb der Haltbarkeitsspanne (aufgedruckt auf den Etiketten).
- Bringen Sie alle Kitkomponenten auf Raumtemperatur (vorzugsweise 15-30°C) und mischen Sie die flüssigen Kit Komponenten vor Gebrauch durch vorsichtiges Schwenken. Lagern Sie den Testkit unmittelbar nach der Verwendung bei 2 - 8°C. Der Test ist empfindlich gegenüber Temperaturen über 30°C.
- Verwenden Sie nur frische Blutproben, die Antikoagulantien enthalten (Li-Heparin). Andere Körperflüssigkeiten als Li-Heparin Blut sind nicht validiert und können inkorrekte Ergebnisse hervorrufen! Lagern Sie Blutproben bei Raumtemperatur (vorzugsweise 15 - 30°C)! Blutproben nicht unter 15°C lagern! Das Blut nicht verwenden, wenn die Blutabnahme mehr als 16 h zurückliegt.
- Wir empfehlen, die Standards in Doppelbestimmungen zu messen. Für die Messung von humanen Plasmaproben sind Einzelbestimmungen möglich.
- Verwenden Sie keine Reagenzien unterschiedlicher Kits oder Chargen und mischen Sie keine Reagenzien unterschiedlicher Kits oder Chargen.
- Vermeiden Sie Kontaminationen von Reagenzien. Verwenden Sie nicht den gleichen Behälter für mehrere Proben!
- Arbeiten Sie unter sterilen Bedingungen um Kontamination der Proben zu vermeiden. Vermeiden Sie die Verwendung von trüben Proben, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese bakteriell kontaminiert sind. Verwenden Sie nur den klaren Überstand für die Zytokinmessung. Vermeiden Sie Kontamination durch rote Blutzellen beim Entnehmen des Überstandes. Trennen Sie die roten Blutzellen vom Plasma durch Zentrifugation wenn notwendig.
- Wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben vermeiden, da die Zytokine hierdurch denaturiert werden könnten.

- Vor dem Pipettieren die Testlösungen durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken durchmischen. Starkes Schütteln vermeiden (Schaumbildung!). In konstanten Intervallen pipettieren, damit alle Wells gleich behandelt werden.
- Vermeiden Sie die Berührung der Innenseite der Schraubdeckel mit den Fingern (Kontaminationsgefahr). Nur zum Einmalgebrauch. Nicht verwenden wenn die Behälter beschädigt sind oder offen (Schraubdeckel fehlt).
- Schützen Sie das TMB Substrat vor direkter Sonnenstrahlung.

Weitere Informationen erhalten Sie per E-Mail an sales@lionex.de, bitte fordern Sie ein **Sicherheitsdatenblatt (MSDS)** an.

ACHTUNG:
Behandeln Sie humanes Blut und Plasma als potentiell infektiös. Alle Kitkomponenten sollten als infektiös angesehen werden. Dekontaminieren und entsorgen Sie Reste der Kitreagenzien und humanen Blut- und Plasmaproben gemäß lokalen Vorschriften, z.B. durch Autoklavieren oder unter Verwendung einer desinfizierenden Lösung.

Gefahren- und Sicherheitshinweise

TMB **Substratlösung**
3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) enthält: N-Methyl-2-pyrrolidon. Gefahr! Kann das Kind im Mutterleib schädigen (H360D).
Alle Kit-Komponenten nur in einer zugelassenen Entsorgungsanlage entsorgen.
Bei Exposition: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

STO **Stopplösung**
Enthält: Schwefelsäure. Gefahr! Kann gegenüber Metallen korrosiv sein (H290). Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden (H314).
Alle Kit-Komponenten nur in einer zugelassenen Entsorgungsanlage entsorgen.
Bei Exposition: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

Probenentnahme und Vorbereitung

Der **LIOFeron®TB/LTBI** funktioniert am besten mit frischen Proben.

Es werden mindestens 4,5 mL menschliches Blut benötigt. Die Probe unter Standardlaborbedingungen (aseptisch, Vermeidung von Hämolyse) unter Verwendung von Li-Heparin-Blutentnahmeröhrchen entnehmen.

Wenn die Probe nicht unmittelbar nach der Blutentnahme in die **HUMAN BLOOD STIMULATIONS-TUBES** überführt werden kann, kann das Vollblut bis zu 16 Stunden bei 15 - 30°C gelagert werden.

Verwendung und Lagerung von Plasma nach der Blutstimulation

Wir empfehlen, das Plasma direkt nach der Zentrifugation aus den Röhrchen auf die ELISA-Platte zu pipettieren. Wir empfehlen, den **HUMAN IFN-γ ELISA** innerhalb weniger Tage nach der Blutstimulation durchzuführen.

Wenn der **HUMAN IFN-γ ELISA** nicht unmittelbar nach der Blutstimulation durchgeführt werden kann, können die Röhrchen bis zu 4 Tage bei 2 - 8°C gelagert werden.

Für eine längere Lagerung, trennen Sie menschliches Plasma von den roten Blutkörperchen und lagern Sie es bei 2 - 8°C (bis zu 28 Tage). Dies kann jedoch zu einer Verringerung der IFN-γ Konzentration führen. Separierte Plasmaproben können für längere Zeit unter -20°C gelagert werden. Eingefrorene Proben müssen vor dem Test aufgetaut und gut gemischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben!

Vorbereitung von Reagenzien

WB Waschpuffer (10 x Konzentrat):

Bringen Sie den WB Waschpuffer (10 x Konzentrat) auf Raumtemperatur (vorzugsweise 15 - 30°C) und mischen Sie den Puffer vorsichtig vor Gebrauch. Wenn Salzkristalle in der Flasche sind, das Konzentrat etwa 15 min bei 37°C erwärmen.

Vor Gebrauch mit destilliertem Wasser (1 + 9 Volumina) verdünnen, z.B. 100 mL WB Waschpuffer (10 x Konzentrat) + 900 mL destilliertes Wasser.

STA Rekombinanter humaner IFN-γ Standard (lyophilisiert):

Rekonstituieren Sie den IFN-γ Standard mit dem auf dem Etikett des Röhrchens angegebenen Volumen an IB Inkubationspuffer zu einer Stammlösung mit 12,5 IU/mL. Mischen Sie die Stammlösung nach Zugabe des Inkubationspuffers für mindestens 10 Sekunden gut durch (z.B. mit einem Vortexer).

Verdünnen Sie die Stammlösung wie im unten abgebildeten Pipettierschema und in der Tabelle angegeben weiter zu den Standardlösungen (S1 - S4; Abb. 1, Tabelle 3):

Tabelle 3: Vorbereitung der Standardlösungen S1 - S4.

Standard-lösung Nr.	konz. IFN-γ	Volumen Stammlösung oder Standardlösung	Volumen Inkubationspuffer	Gesamt-volumen
S1	**4 IU/mL**	80 µL der Stammlösung	170 µL	250 µL
S2	**1 IU/mL**	50 µL Standardlösung S1	150 µL	200 µL
S3	**0.25 IU/mL**	50 µL Standardlösung S2	150 µL	200 µL
S4 (Blindwert)	**0 IU/mL**	-	150 µL	150 µL

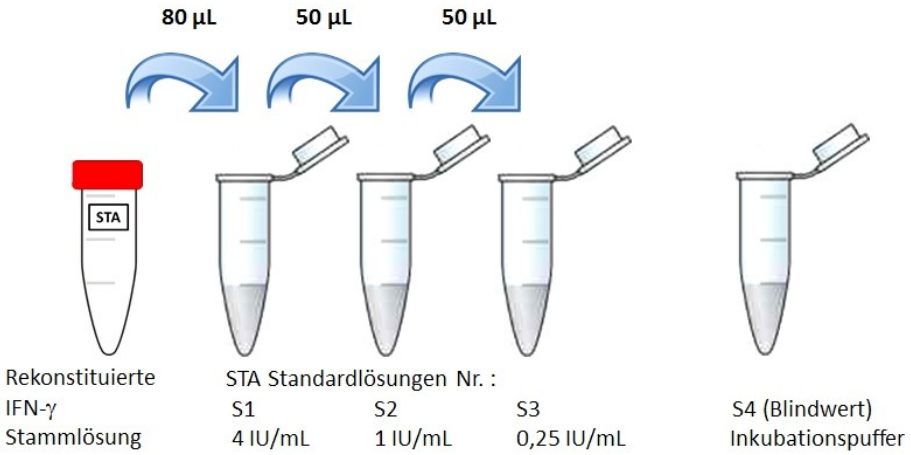


Abb. 1: IFN-γ Konzentrationen der hergestellten Standardlösungen S1 – S3.

Testdurchführung

HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES

Die Testdurchführung benötigt circa 10 Minuten für jede Probe. Inkubationszeit: 16 - 24 h.

1. Entnehmen Sie die Anzahl der zu verwendenden **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** NC, TB A, TB B und PC aus der Packung. Stellen sie die Röhrchen aufrecht in einen geeigneten Ständer. Beschriften Sie die **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** sorgfältig, z.B. mit einer Probennummer oder ID. Entfernen Sie die Deckel durch Hochziehen (nicht schrauben) und legen Sie die Deckel mit der Innenseite nach oben auf eine saubere, ebene Fläche.
2. Mischen Sie die Blutprobe im Li-Heparin Sammelröhrchen durch vorsichtiges Auf- und Abschwenken (etwa 10-mal). Pipettieren Sie jeweils 1 mL der Blutprobe in jedes **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBE** (NC, TB A, TB B und PC) und verschließen es. Achtung! Es gibt 2 Verschlussstellen. Bitte den Deckel ganz nach unten drücken!
3. Mischen sie jedes **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBE** mit je 1 mL Li-Heparin Blut vorsichtig durch zehnmaliges Invertieren. Starkes Schütteln dabei vermeiden, damit die Blutzellen nicht hämolysieren!
4. Stellen Sie den Ständer mit den **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** (gefüllt mit jeweils 1 mL Li-Heparin Blut) aufrecht in einen Inkubator bei 37°C (± 0,5 °C). Inkubieren Sie die Röhrchen für Minimum 16 Stunden. Maximale Inkubationsdauer ist 24 Stunden.
5. Abschließend den Ständer mit HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES aus dem 37 °C Inkubator entnehmen (ohne zu schütteln!). **Es ist möglich, das Plasma ohne Zentrifugation zu ernten, aber achten Sie darauf, eine Kontamination mit roten Blutkörperchen zu vermeiden.** Die roten Blutkörperchen werden durch das Gel vom Plasma getrennt.

   Wichtiger Hinweis: Bei Kontamination des Plasmas mit roten Blutzellen das menschliche Plasma durch Zentrifugation der Röhrchen für 15 Minuten bei 2000 bis 3000 RCF (g) ernten. Vermeiden Sie nach der Zentrifugation das Auf- und Abpipettieren oder das Mischen des Plasmas. Stets darauf achten, dass das Plasma auf der Oberfläche des Gels nicht mit roten Blutzellen durchmischt wird.

6. Die Plasmaproben sollen nur unter Verwendung einer Pipette geerntet werden. Das Plasma kann direkt von den **HUMAN BLOOD STIMULATIONS TUBES** in die **HUMAN IFN-γ ELISA**-Platte überführt werden. 50 µL des klaren Überstands aus den **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren und mit Schritt 5 des "*HUMAN IFN-γ ELISA-Testverfahrens*" fortfahren.

   Hinweis: Es ist möglich, eine automatisierte ELISA-Workstation zu verwenden.

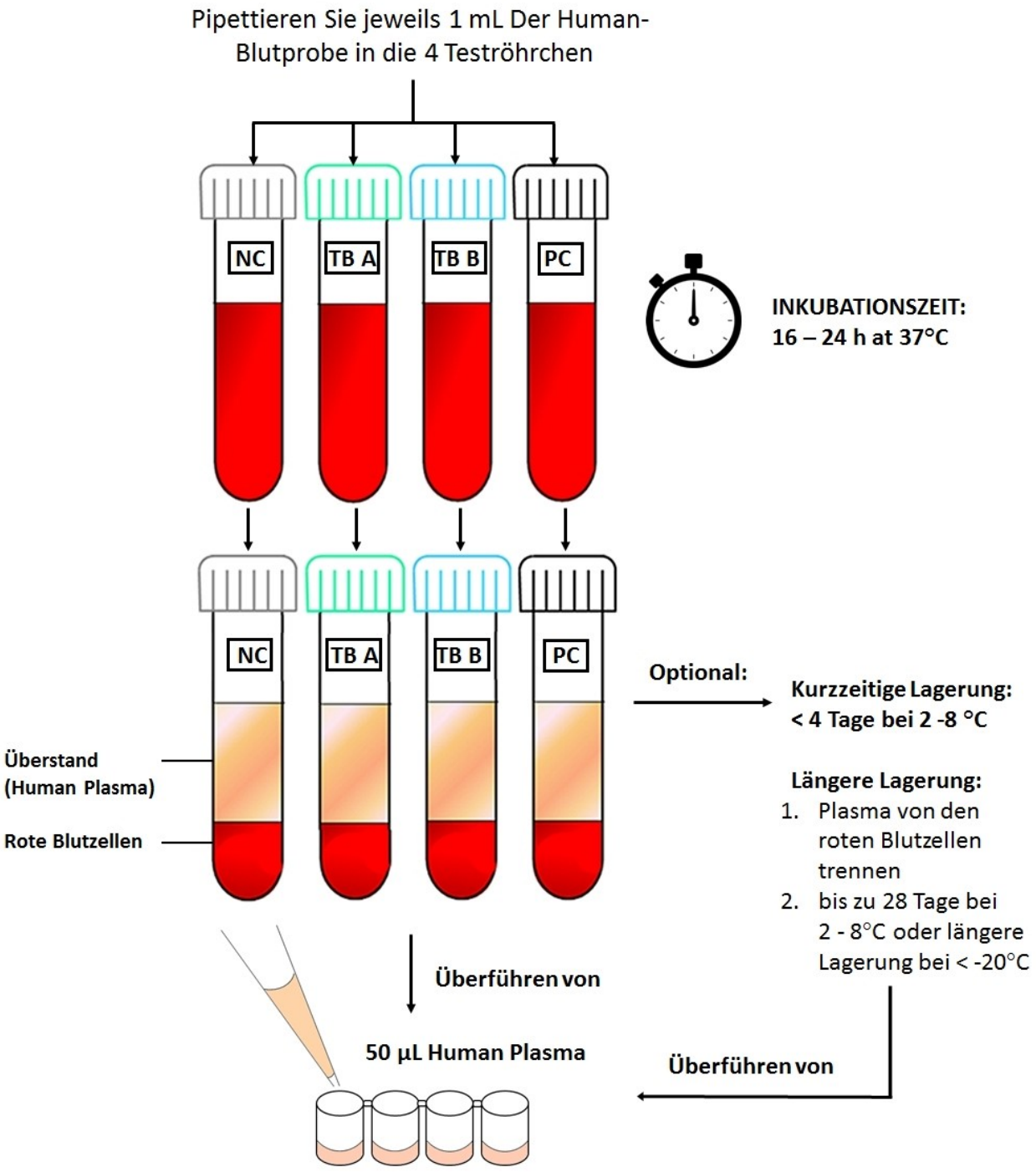


Abb. 2: Kurzanleitung zur Verwendung von **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES**. Die Plasma-Proben (Überstand) können direkt in die ELISA-Platte pipettiert werden. Es kann auch eine automatische ELISA-Workstation verwendet werden. Optional ist eine Lagerung bei 2 - 8°C bzw. < -20°C wie unter "Verwendung und Lagerung von Plasma nach der Blutstimulation" möglich.

HUMAN IFN-γ ELISA

Die Testdauer beträgt 3 Stunden.

1. Stellen Sie den vorbereiteten Waschpuffer und die Standards aus dem Abschnitt "Vorbereitung von Reagenzien" bereit.

2. Equilibrieren Sie alle Kit-Komponenten auf Raumtemperatur (15 - 30 °C, ca. 30 Minuten).

3. Entnehmen Sie die MTP Mikrotiterplatte aus dem Aluminiumbeutel und setzen Sie die erforderlichen Mikrotiterstreifen in die dafür vorgesehene Halterung ein. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen zurück in den Aluminiumbeutel bringen.

4. Pipettieren Sie 50 µL / Well jeder Probe, die vorbereiteten Standardlösungen Nr. S1 - S3 und den IB Inkubationspuffer als Blindprobe (S4) in die Vertiefungen. Die Standards und der Blindwert sollten doppelt gemessen werden, die Proben als Einzelbestimmungen. Die Proben und Standards können an jeder beliebigen Stelle auf die Mikrotiterplatte platziert werden, allerdings müssen diese immer von oben nach unten in der in Abbildung 3 vorgegebenen Reihenfolge pipettiert werden. Dies erleichtert die Analyse der Ergebnisse manuell oder durch eine Software. Gelagerte Plasmaproben vor der Verwendung gründlich mischen!

Oben → Unten (Pipettierrichtung)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 NC	3 NC	5 NC	7 NC	9 NC	S1		13 NC	15 NC	17 NC	19 NC	21 NC
B	1 TB A	3 TB A	5 TB A	7 TB A	9 TB A	S2		13 TB A	17 TB A	17 TB A	19 TB A	21 TB A
C	1 TB B	3 TB B	5 TB B	7 TB B	9 TB B	S3		13 TB B	15 TB B	17 TB B	19 TB B	21 TB B
D	1 PC	3 PC	5 PC	7 PC	9 PC	S4 (Blank)		13 PC	15 PC	17 PC	19 PC	21 PC
E	2 NC	4 NC	6 NC	8 NC	10 NC	11 NC	12 NC	14 NC	16 NC	18 NC	20 NC	22 NC
F	2 TB A	4 TB A	6 TB A	8 TB A	10 TB A	11 TB A	12 TB A	14 TB A	16 TB A	18 TB A	20 TB A	22 TB A
G	2 TB B	4 TB B	6 TB B	8 TB B	10 TB B	11 TB B	12 TB B	14 TB B	16 TB B	18 TB B	20 TB B	22 TB B
H	2 PC	4 PC	6 PC	8 PC	10 PC	11 PC	12 PC	14 PC	16 PC	18 PC	20 PC	22 PC

Die Proben und Standards können an jeder beliebigen Stelle auf die Mikrotiterplatte platziert werden, allerdings müssen diese immer von oben nach unten pipettiert werden!

Abb. 3: Beispiel Pipettierschema des **HUMAN IFN-γ ELISA**; Standardlösungen (S1 - S3) und Blindwert (S4) als Doppelbestimmungen; Nr. 1 - 22 als Einzelbestimmungen jeder Probe aus den **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** (NC, TB A, TB B und PC).

5. 50 µL / Well des DET Detektionsantikörperlösung hinzugeben. Decken Sie die Platte mit einem Mikrotiterplattendeckel ab und mischen Sie die Standards/Proben gründlich mit einem Mikroplattenschüttler für 60 Sekunden bei 500 bis 1000 U/min.

   INKUBATIONSZEIT: 1 Stunde (± 5 min) bei 15 - 30°C

6. Waschschritt: Die Wells der Platte leeren (entleeren oder absaugen) und 6 x 400 µL / Well mit verdünntem Waschpuffer waschen.

7. 100 µL / Well der CON Konjugatlösung pipettieren.

   INKUBATIONSZEIT: 1 Stunde (± 5 min) bei 15 - 30°C

8. Waschschritt: Die Wells der Platte leeren (entleeren oder absaugen) und 6 x 400 µL / Well mit verdünntem Waschpuffer waschen.

9. 100 µL / Well des TMB Substrates pipettieren.

   INKUBATIONSZEIT: 30 Minuten (± 1 min) bei 15 - 30°C im Dunkeln

10. Fügen Sie schnell 50 µL / Well der STO Stopplösung zu dem Substrat hinzu um die Reaktion zu beenden (Achtung! Nicht Waschen!).

11. Messen Sie die Absorption (OD) bei 450 nm (optionale Referenzwellenlänge: 620 nm). Die Farbe ist mindestens 60 Minuten stabil.

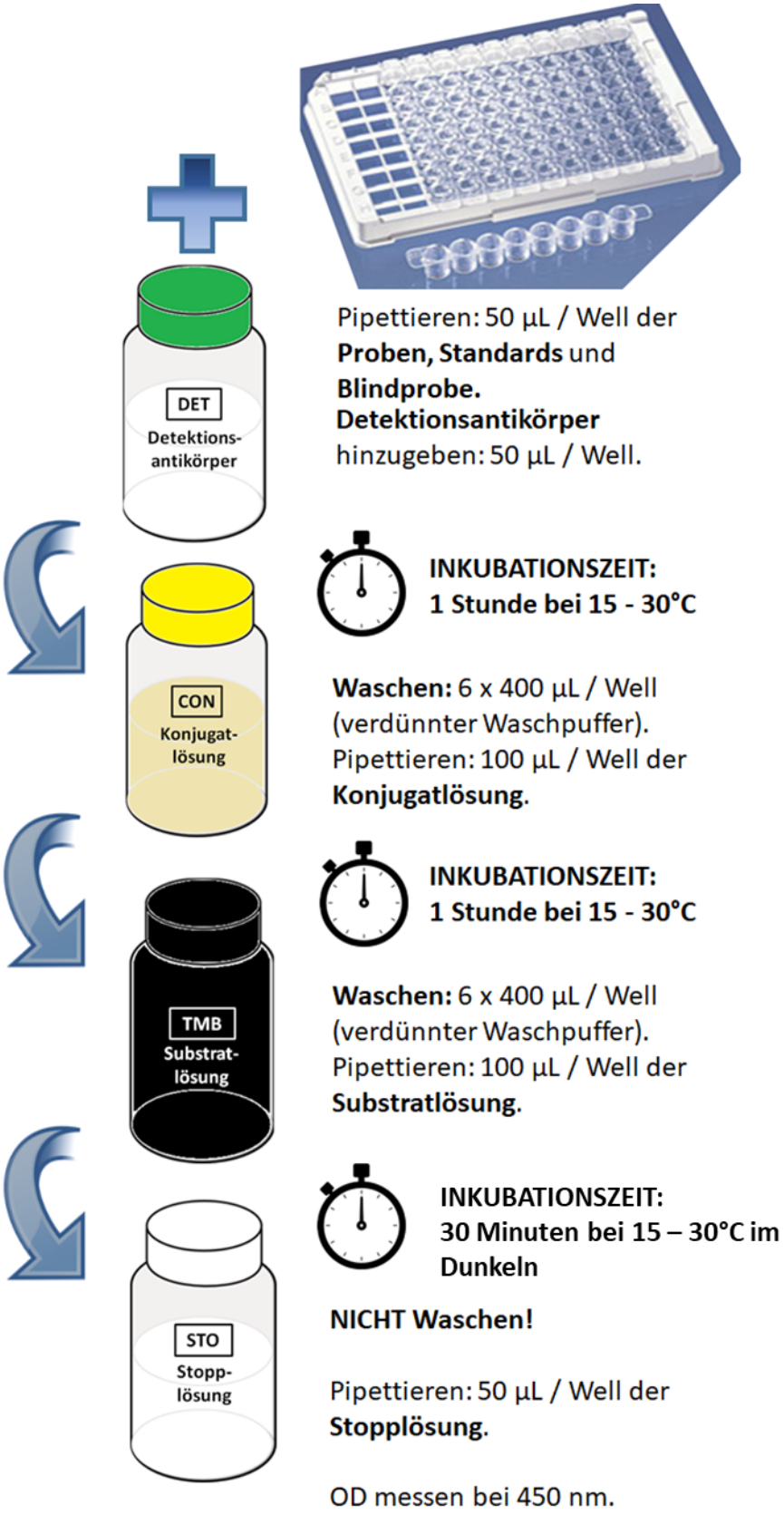


Abb. 4: Schematische Darstellung der Testprozedur des **HUMAN IFN-γ ELISA**.

Stabilität und Lagerbedingungen rekonstituierter Standard und anderer Kit Komponenten

HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES

- Bei 2 - 30°C lagern.
- Die Testkomponenten **NICHT** bei Temperaturen über 30°C lagern.

HUMAN IFN-γ ELISA

- Bei 2 - 8°C lagern.
- Alle Testkomponenten **NICHT EINFRIEREN**.
- Die Testkomponenten **NICHT** bei Temperaturen über 30°C lagern.
- Die TMB Substratlösung for direkter Sonnenstrahlung schützen.

Die MTP Mikrotiterplatte ist empfindlich gegenüber Feuchtigkeit. Nach dem ersten Öffnen ist die Mikrotiterplatte für 3 Monate stabil, wenn die restlichen Streifen verschlossen in dem Aluminiumbeutel bei 2-8°C zusammen mit dem Trockenmittelbeutel gelagert werden.

Nach Verdünnung des WB Waschpuffers (10 x Konzentrat) ist die verdünnte Lösung (1x Waschpuffer) bei 2 - 8°C für 1 Monat stabil. Für die Anleitung zur Vorbereitung des 1x Waschpuffers siehe " *Vorbereitung von Reagenzien"*.

Der rekonstituierte Standard STA (Stammlösung) ist bei 2 - 8°C für 2 Monate stabil. Notieren Sie das Datum der Rekonstitution auf dem Etikett des Standards STA. Für die Anleitung zur Vorbereitung der Stammlösung und von Standardlösung Nr. S1 -S4 siehe "*Vorbereitung von Reagenzien"*.

Das ungeöffnete Kit ist bis zum Verfallsdatum stabil. Das Verfallsdatum ist auf den Etiketten der Testkomponenten sowie auf dem Etikett der äußeren Verpackung angegeben. Nicht verwenden wenn Testkomponenten beschädigt oder geöffnet sind (z.B. kein Schraubdeckel vorhanden, Aluminiumbeutel beschädigt). Nach dem ersten Öffnen sind die flüssigen Testkomponenten für mindestens 3 Monate stabil, wenn die Flaschen nach jedem Gebrauch fest verschlossen werden.

HINWEIS: Wenn Präzipitate in der CON Konjugatlösung erscheinen, hat dies keine Auswirkungen auf das Ergebnis. Wenn Bläschen in den vertiefungen der unbenutzen Mikrotiterplatten sichtbar sind, hat dies keine Auswirkungen auf das Testergebnis.

Berechnung und Testinterpretation

Generieren Sie ein Diagramm mit logarithmischer Regressionslinie. Für die Berechnung der Referenzkurve empfehlen wir die Verwendung automatischer Computerprogramme.

Generierung der Standardkurve (x-y Diagramm)

Berechnen Sie die mittleren OD-Werte für die gemessenen Absorptionen für jede Standardlösung Nr. S1 - S3 und Blindwert (S4).

Erstellen Sie eine log (e) -log (e) -Standardkurve, indem Sie das log (e) der mittleren OD-Ergebnisse der Standardlösung Nr. S1 - S3 auf der vertikalen Achse (y-Achse) gegen den Logarithmus (e) der Konzentration von Cytokin (IFN-γ) auf der horizontalen Achse in IU / mL (x-Achse) auftragen. Lassen Sie den Nullstandard (Blindwert) unberücksichtigt.

Berechnen Sie die Linie für die Standardkurve durch Regressionsanalyse. Verwenden Sie die Standardkurve, um die IFN-γ-Konzentration (IU / mL) für jede der Plasmaproben unter Verwendung des OD-Werts jeder Probe zu bestimmen.

Diese Berechnungen können mit statistischer Software (z. B. Microsoft® Excel®) durchgeführt werden. Wir empfehlen die Verwendung dieser Software zur Berechnung der Regressionsanalyse, des Variationskoeffizienten (% CV) für die Standards und des Korrelationskoeffizienten (r) der Standardkurve.

HINWEIS: Die Differenz der jeweiligen Einzelwerte für S1 – S3 und dem Nullwert (S4) sollte 10% nicht überschreiten.

Im x-y-Diagramm mit Regressionsgerade wird der statistische Zusammenhang zwischen den beiden Variablen dargestellt (r). Die Regressionsgrade ist diejenige Gerade, die am besten den eingezeichneten Punkten entspricht. Die Geradengleichung wird vom Programm automatisch berechnet. Die Gleichung dieser Kurve ist unten im Regressionsfenster angegeben. Die Referenzkurve sollte möglichst eine gerade Linie sein (r > 0,980).

Berechnen Sie die Konzentration jeder gemessenen Probe (IU / mL) mithilfe der log (e) -Gleichung der Referenzkurve:

$$\ln(y) = a \times \ln(x) + b$$

Ändern Sie die Formel in y:

$$y = e^{(\ln(x) - b)/a}$$

Beispiel einer Regressionsgleichung:

y = konz. IFN-γ [IU/mL]	a = 1.1361
x = OD Probe	b = 1.3376

konz. IFN-γ [IU/mL] = EXP((LN(OD Probe)- 1.3376)/ 1.1361)

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokinmenge (IFN-γ), die von Antigen-stimulierten Blutzellen segregiert wurde:
Den für die Negativkontrolle NC berechneten Wert (konz. IFN-γ [IU / mL]) von dem für die Positivkontrolle PC beobachteten subtrahieren. Ebenso mit TB A und TB B (TB-Antigen-Fläschchen) verfahren. Berechnen Sie anschließend 25% des negativen Kontrollwerts.

Interpretation der Ergebnisse

Beachten Sie Anweisungen für die Interpretation der Ergebnisse sorgfältig (Tabelle 4)!

Tabelle 4: Interpretation der Testergebnisse.

NC Negativ-Kontrole [IU/mL]	TB A - NC TB Antigen A minus Negativ-Kontrolle [IU/mL]	TB B - NC TB Antigen B minus Negativ-Kontrolle [IU/mL]	PC - NC Positiv-Kontrolle minus Negativ-Kontrolle [IU/mL]	**Ergebnis**
≤ 8,00	< 0,35	< 0,35	≥ 0,50	**Negativ**
	≥ 0,35 and < 25 % des Negativ-Kontrollwerts	≥ 0,35 and < 25 % des Negativ-Kontrollwerts		
	< 0,35	≥ 0,35 and < 25 % des Negativ-Kontrollwerts		
	≥ 0,35 and < 25 % des Negativ-Kontrollwerts	< 0,35		
	≥ 0,35 and ≥ 25 % des Negativ-Kontrollwerts	Nicht relevant	Nicht relevant	**Positiv**
	Nicht relevant	≥ 0,35 and ≥ 25 % des Negativ-Kontrollwerts		
	< 0,35	< 0,35	< 0,50	**Unbestimmbar**
	≥ 0,35 and < 25 % des Negativ-Kontrollwerts	≥ 0,35 and < 25 % des Negativ-Kontrollwerts		
	< 0,35	≥ 0,35 and < 25 % des Negativ-Kontrollwerts		
	≥ 0,35 and < 25 % des Negativ-Kontrollwerts	< 0,35		
> 8,00	Nicht relevant	Nicht relevant	Nicht relevant	

Die Messwerte für die Positivkontrolle PC können außerhalb des oberen Bereichs des Mikrotiterplattenlesegeräts liegen. Dies hat keinen Einfluss auf das Testergebnis.

Personen mit Negativkontrollwerten (NC-Werten) von mehr als 8 IU / mL werden als unbestimmt eingestuft, da eine um 25% höhere Reaktion des TB-Antigens außerhalb des Assay-Messbereichs liegen kann.

Wenn die Ergebnisse unbestimmt sind, schlagen Sie im Abschnitt *„Anleitung zur Fehlerbehebung“* nach, um mögliche Ursachen zu ermitteln.

Qualitätskontrolle des Testergebnisses

Der **HUMAN IFN-γ ELISA** enthält eine interne Kontrolle. Die Standardlösungen gelten als interne Verfahrenskontrolle. Diese bestätigen das ausreichende Probenvolumen und die korrekte Durchführung des Testverfahrens. Das Testergebnis hängt von der Erstellung einer Standardkurve ab. Diese Standardkurve muß folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert OD von S1 (Standardlösung 1) > 0,6
- %CV für die Mittelwerte von S1 und S2 < 15%
- Variation der Meßwiederholungen der OD Werte für S3 und S4 (Blindwert) < 0,04
- Korrelationskoeffizient (*r*) für die Standardkurve > 0,98
- Mittelwert OD von S4 (Blindwert): dient als interne negative Verfahrenskontrolle und soll < 0,19 sein.

Einschränkungen: Die Referenzkurve sollte eine gerade Linie sein (r > 0,98). Die OD-Werte für die Standards müssen innerhalb der oben definierten akzeptablen Bereiche liegen (± 10%).

Wenn die oben genannten Kriterien nicht erfüllt sind, wird die Analyse der Testergebnisse beeinträchtigt und der Test ist ungültig. Unzureichendes Probenvolumen oder fehlerhafte Testdurchführung sind die wahrscheinlichsten Gründe dafür, dass die geforderten QC-Kriterien für den Test nicht erfüllt werden.

Wenn der oben genannte Grenzwert von S4 (Blank) überschritten wurde, sollte das Waschverfahren verbessert und/oder die Raumtemperatur während der Testdurchführung kontrolliert werden (die Raumtemperatur sollte 15 - 30°C betragen).

Überprüfen Sie erneut die Anweisungen zur Probenvorbereitung und zum Testverfahren und wiederholen Sie den Test mit einem neuen Mikrotiter-Streifen. Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den Hersteller oder Ihren Händler.

Einschränkungen

Befolgen Sie die Anweisungen zur Testdurchführung und die Interpretation der Ergebnisse sorgfältig! Unzureichendes Probenvolumen oder falsche Handhabung des Testverfahrens sind die wahrscheinlichsten Gründe dafür, dass die geforderten QC-Kriterien für den Test nicht erfüllt werden (siehe Abschnitt „*Qualitätskontrolle des Testergebnisses*“).

IGRAs sollten als Hilfestellung bei der Diagnose einer Infektion mit *M. tuberculosis* verwendet werden. Ein positives Testergebnis deutet darauf hin, dass eine Infektion mit *M. tuberculosis* wahrscheinlich ist. Ein negatives Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Infektion unwahrscheinlich ist. Bei einem unbestimmten Ergebnis muss der Test wiederholt werden oder ein anderes Verfahren hinzugezogen werden.

Die Ergebnisse des **LIOFeron®TB/LTBI** Tests sollten stets in Kombination mit dem klinischen Status der einzelnen Personen, den Ergebnissen anderer diagnostischer Tests und den epidemiologischen Hintergrundinformationen berücksichtigt werden.

Untypische Fälle können auftreten, wenn eine Infektion mit *M. tuberculosis* unwahrscheinlich ist und zudem die Prävalenz von NTM außerordentlich hoch ist.

Der Test wurde zum Nachweis von humanem IFN-γ in Plasma (Li-Heparin) entwickelt. Für den Nachweis von IFN-γ in anderen Körperflüssigkeiten als menschlichem Plasma wurde der Test nicht validiert und kann zu falschen Ergebnissen führen.

Die Blutprobe sollte nach der Entnahme bei Raumtemperatur (15 - 30 °C) gelagert und nicht verwendet werden, wenn die Probe älter als 16 Stunden nach der Venenpunktion ist. Blutprobe nicht einfrieren. Die Vitalität der Zellen kann nach falscher oder längerer Lagerung des Blutes nicht garantiert werden.

Für IFN-γ-Messungen sollte nur der klare Überstand (Humanplasma) verwendet werden. Vermeiden Sie während der Gewinnung des menschlichen Plasmas die Kontamination durch rote Blutkörperchen. Falls erforderlich, trennen Sie die roten Blutkörperchen durch Zentrifugation vom Plasma. Bakterienkontamination der Proben vermeiden!

Die Standardkurve sollte nicht extrapoliert werden, wenn die berechneten Werte nicht linear sind. Proben mit Extinktionswerten, die die höchste Standardkonzentration überschreiten, sollten bei höherer Verdünnung erneut analysiert werden. Zur weiteren Analyse können die Plasmaproben mit IB Inkubationspuffer verdünnt werden, z. 1:20 (50 µL Humanplasma in 950 µL IB Inkubationspuffer).

Ein hoher IFN-γ Spiegel im menschlichen Blut kann den Test stören und zu unbestimmten oder ungültigen Ergebnissen führen.

Interferierende Substanzen

Verwenden Sie nur frische Blutproben mit Antikoagulanzien (Li-Heparin). Verwenden Sie keine anderen Körperflüssigkeiten als menschliches Li-Heparin-Blut, da diese nicht validiert sind oder falsche Ergebnisse liefern können (z. B. hemmt Citratblut die Testleistung).
Die analytische Spezifität wurde durch Messung potentieller Störsubstanzen bestimmt. Dabei wurden Substanzen berücksichtigt, die zur Behandlung des Patienten verwendet werden könnten, die vom Patienten aufgenommen werden können, sowie Substanzen, die in bestimmten Probentypen vorkommen könnten. Die folgenden Substanzen, die in den unten genannten Konzentrationen getestet wurden, haben die Testergebnisse nicht beeinträchtigt:

Azetaminophen	20 mg/dL
Azetylsalizylsäure	20 mg/dL
Ascorbinsäure	20 mg/dL
Bilirubin	60 mg/dL
Koffein	20 mg/dL
Glucose	2000 mg/dL
Haemoglobin	500 mg/dL
Lithium-Heparin	3 mg/dL
Tetracyclin	20 mg/dL
Natrium-Heparin	3 mg/dL

Hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden, da bekannt ist, dass Bestandteile der roten Blutkörperchen ins Plasma gelangen und potenziell das Testergebnis stören können.

Eine übermäßige Menge an Lipiden in einer Probe kann physikalisch-chemischen Inhomogenität auslösen. Darüber hinaus kann eine hohe Konzentration von Lipiden möglicherweise das Bindungsverhalten von Zytokinen verändern und so die Ergebnisse verfälschen. Daher dürfen lipämische Proben nicht verwendet werden.

Jüngste oder aktuelle Behandlung von TB kann zu falschen Ergebnissen führen. Der Zytokinspiegel im Blut kann nach der Behandlung schnell sinken und in den Blutproben des Patienten so niedrig sein, dass auch bei einer Infektion oder Krankheit kein erhöhter Zytokinspiegel nachgewiesen werden kann.

Bitte beachten Sie, dass falsch-positive Testergebnisse durch die Interferenz heterophiler Antikörper verursacht werden können. Heterophile Antikörper kommen üblicherweise im menschlichen Plasma von Probanden mit verschiedenen Krankheiten vor, die nicht mit diesem Test untersucht werden können.

Natriumazid und andere nukleophile Substanzen (z. B. als Konservierungsmittel für verschiedene Puffer verwendet) stören die Aktivität der Meerrettichperoxidase. Vermeiden Sie daher die Verwendung von Waschpuffern oder anderen Lösungen, die solche störenden Substanzen enthalten können. Aufgrund von Extrapolationen oder Abweichungen vom Verfahren können unzuverlässige oder unbestimmte Ergebnisse auftreten.

Leistungsmerkmale

Messbereich des HUMAN IFN-γ ELISA

Quantifizierungsgrenze (LoQ), Nachweisgrenze (LoD) und Blindgrenze (LoB) des **LIOFeron®TB/LTBI** wurden durch Berechnung aus Blindwerten bestimmt (23 Wiederholungen, verschiedene Chargen und Personen an verschiedenen Tagen). Die folgenden Werte werden aus den gemessenen Daten berechnet:

LoQ = 0.2860 IU/mL LoD = 0.1360 IU/mL LoB = 0.0936 IU/mL

Vergleichsstudien

Zur Bestimmung der Übereinstimmung des **LIOFeron®TB/LTBI** mit der Referenzmethode (QuantiFERON®TB-Gold Plus (Qiagen)) wurden 135 Proben gemessen. Die Übereinstimmung von **LIOFeron®TB/LTBI** mit der Referenzmethode betrug 96,00% für die positive Gruppe und 98,82% für die negative Gruppe (Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleichsstudie **LIOFeron®TB/LTBI** versus QuantiFERON®TB-Gold Plus (Qiagen).

Methode		QuantiFERON® TB Gold Plus*	
		positiv	negativ
LIOFeron® TB/LTBI	negativ	2	84
	positiv	48	1
Gesamtergebnisse:		50	85
Übereinstimmung:		96,00 %	98,82 %

*Qiagen

Sensitivität und Spezifität

Die analytische Sensitivität wurde durch Messung von gespikten Proben mit unterschiedlicher Konzentration von IFN-γ innerhalb desselben Assays bestimmt (jeweils 5 Wiederholungen). Diese betrug etwa 0,0625 IU / mL.

Klinische Sensitivität und Spezifität

Soweit möglich wurden auch die Ergebnisse von **LIOFeron®TB/LTBI** mit der finalen Diagnose verglichen. Insgesamt wurden 294 Proben mit bekannter Diagnose berücksichtigt. Bei den Negativproben war die Übereinstimmung 97,61% (gesunde Personen, HIV- und NTM-Patienten, 251 Proben). Bei den Positivproben war die Übereinstimmung 97,67% (TB und LTBI, 43 Proben) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersichtstabelle für die Ergebnisse von **LIOFeron®TB/LTBI** im Vergleich zur klinischen Diagnose. Abkürzungen: TB = Tuberkulose, NTM = andere Mykobakterien als TB, LTBI = latente TB.

Probengruppe	positiv	negativ	Gesamtzahl	Übereinstimmung
positiv (TB + LTBI)	42	1	43	**97,67 %**
negativ (HIV, NTM +, gesund)	6	245	251	**97,61 %**

Leistungsmerkmale

Richtigkeit: Zur Demonstration der Linearität von **LIOFeron®TB/LTBI** wurden 17 mit unterschiedlichen Konzentrationen an IFN-γ gespikte Proben (Plasmapool) nach dem Zufallsprinzip zusammen mit dem nicht gespikten Plasmapool (= Null-Plasma) auf der Mikrotiterplatte platziert (jeweils 5 Wiederholungen). Die berechneten Ergebnisse (IU / mL) wurden gegen die erwarteten Ergebnisse aufgetragen. Durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten r (r = 0,9953, Abbildung 5) wurde bestätigt, dass der Assay bis zu 4 IU / mL linear ist. Für Konzentrationen bis zu 8,0 IU / mL war der Assay annähernd linear (r = 0,9824).

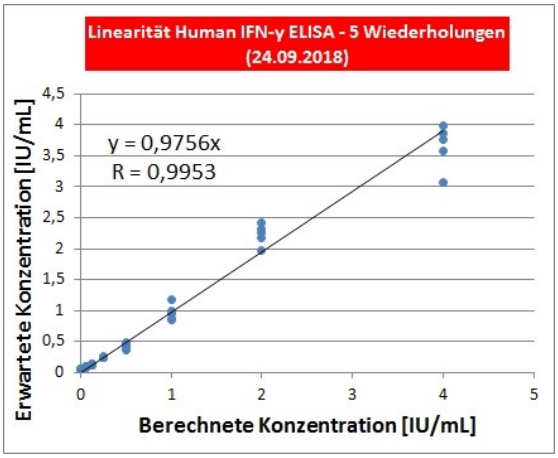


Abb. 5: **LIOFeron®TB/LTBI**: Nachweis der Linearität des Assays zwischen 0 und 4 IU / mL. Der Korrelationskoeffizient R betrug 0,9953.

High Dose Hook Effekt: Humanes Plasma wurde mit IFN-γ in Konzentrationen von bis zu 10.000 IU / mL versetzt und mit dem **HUMAN IFN-γ ELISA** gemäß den Anleitungen in der Gebrauchsanweisungen gemessen. Bei Konzentrationen von bis zu 10.000 IU / mL wurde kein Hook-Effekt beobachtet.

Präzision: Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden Intra- und Inter-Assay-Variationen sowie Inter-Operator-Variationen und Charge-zu-Charge Variationen mittels der Messung von Proben mit unterschiedlicher Reaktivität ermittelt.

Die **Inter-Assay Variation** wurde durch wiederholte Messungen von 3 Proben mit unterschiedlicher Reaktivität durch 3 verschiedene Chargen an 10 verschiedenen Tagen (negative-, schwach positive-und positive Probe) bestimmt. Die Inter-Assay-Ungenauigkeit (CV (%)) betrug 11,73% für die schwach positive und 11,9% für die positive Probe. Für die negative Probe (= Nullprobe) betrug die Ungenauigkeit 27,39%. Dieses hohe Maß an Variation wurde aufgrund des niedrigen Levels der IFN-γ-Konzentration erwartet. Die Variation um eine niedrige Konzentration ist für gewöhnlich größer als bei höheren Konzentrationen.

Die **Intra-Assay Variation** wurde durch wiederholte Messungen von Proben mit unterschiedlicher Reaktivität bestimmt (3 Proben mit unterschiedlicher Reaktivität: negative-, schwach positive- und positive Probe; 20 Wiederholungen). Die **Intra-Assay-Ungenauigkeit** lag zwischen 4,35% und 10,11% (CV).

Die **Chargenbedingte Variation** wurde durch die Messung verschiedener Proben mit 3 verschiedenen Chargen bestimmt. Die Ungenauigkeit lag zwischen 2,52% und 19,05%. Wie erwartet wurde für die Proben mit niedriger Konzentration ein höherer CV (%) von mehr als 10% beobachtet. Bei niedrigen Konzentrationen ist die Ungenauigkeit bekanntermaßen höher als bei höheren. Der für alle Proben berechnete mittlere CV (%) betrug 8,37%.

Zur Bestimmung der Inter-Operator Variation wurden 53 Proben mit unterschiedlicher Reaktivität von 3 verschiedenen **Personen** an verschiedenen Tagen gemessen. Die **Anwenderbedingten** Abweichungen zwischen den gemessenen OD-Werten lagen zwischen 1,465% und 31,673%. Für niedrige Werte (IU / mL <0,35) betrug der mittlere CV (%) 22,195%. Für die Werte über dem Cutoff (IU / mL >0,350 <8,0) betrug der mittlere CV (%) 12,759%.

Technische Information

Unbestimmte Ergebnisse

Ist das Testergebnis unbestimmt, kann sich dieses auf den Immunstatus der getesteten Patienten beziehen, dies kann aber auch technischen Faktoren als Ursache haben:

- Die Lagertemperaturbedingungen für Vollblut wurde nicht eingehalten (empfohlen: 15 – 30 °C).
- Die **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** wurden nach dem Füllen mit Blut nicht ausreichend gemischt (mindestens 10 x sanft invertieren).
- Die Zeitspanne zwischen Venenpunktion und Inkubation der mit Blut gefüllten **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** bei 37 °C war zu lang (> 16 h).
- Fehlerhafte Waschprozedur beim **HUMAN IFN-γ ELISA**
- Es ist bekannt, dass die Rate der „Unbestimmbaren“ Ergebnisse bei Immunsupprimierten Patienten höher sein kann als in anderen Gruppen[26].

Geronnenes Human Plasma

Während längerer Lagerung von Plasmaproben produzieren Fibrinproteine Gerinnsel, die durch Zentrifugation der Plasmaproben sedimentiert werden sollten, um das Pipettieren der erforderlichen Plasmavolumina zu erleichtern.

Anleitung zur Fehlerbehebung

Diese Anleitung zur Fehlerbehebung kann hilfreich sein, um eventuell auftretende Probleme zu beseitigen. Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den Hersteller oder Ihren Händler vor Ort (siehe Rückseite).

Tabelle 7: **HUMAN IFN-γ ELISA** Anleitung zur Fehlerbehebung.

Unspezifische Farbentwicklung oder hoher Hintergrund	
Mögliche Ursache	**Was ist zu tun**
Unvollständiges Waschen der Mikrotiterplatte	Waschen Sie die Platte mindestens 6 mal mit 400 µL / Well mit verdünntem WB Waschpuffer (1x).
Verfallsdatum des Kits oder einer der Komponenten ist abgelaufen	Verwenden Sie die Kit-Komponenten vor dem Verfallsdatum. Beachten Sie die Haltbarkeit der rekonstituierte STA Standardlösung und geöffneten MTP Mikrotiterplatte (siehe „Stabilität und Lagerbedingungen rekonstituierter Standard und anderer Kit Komponenten“).
Inkubationstemperatur ist zu hoch	Der ELISA sollte bei Raumtemperatur (15 - 30 °C) inkubiert werden.
Mischen oder Verdünnen vergessen	Stellen Sie sicher, dass jeder Schritt abgeschlossen ist. Überprüfen Sie erneut die Anweisungen zur Probenvorbereitung und zum Testverfahren und wiederholen Sie den Test mit einem neuen Mikrotiterstreifen.
Kreuzkontamination	Seien Sie vorsichtig beim Pipettieren der Proben und Lösungen. Wenn die TMB Substratlösung bläulich erscheint nicht verwenden und ordnungsgemäß entsorgen. Achten Sie darauf, saubere Reagenzien- und Probenbehälter zu verwenden. Mischen Sie das Humanplasma nach dem Zentrifugieren der **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** nicht, um eine Kontamination der Probe mit dem Gel zu vermeiden.
Niedrige OD-Werte der Standards	
Mögliche Ursache	**Was ist zu tun**
Pipettierfehler	Pipetten sollten kalibriert und gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet werden.
Verfallsdatum des Kits oder einer der Komponenten ist abgelaufen	Verwenden Sie die Kit-Komponenten vor dem Verfallsdatum. Beachten Sie die Haltbarkeit der rekonstituierte STA Standardlösung und geöffneten MTP Mikrotiterplatte (siehe „Stabilität und Lagerbedingungen rekonstituierter Standard und anderer Kit Komponenten“).
Inkubationstemperatur ist zu niedrig	Der ELISA sollte bei Raumtemperatur (15 - 30 °C) inkubiert werden.
Verdünnungsfehler beim Ansetzen der Standards	Stellen Sie sicher, dass die Verdünnungen des STA Standards gemäß den Gebrauchsanweisungen hergestellt wurden
Inkubationszeit ist zu kurz	Die Inkubationszeit der Mischung aus Plasmaproben + DET Detektionsantikörperlösung beträgt 1 Stunde (60 Minuten). Die Inkubationszeit der CON Konjugatlösung beträgt 1 Stunde (60 Minuten). Die Inkubationszeit der TMB Substratlösung beträgt 30 Minuten.
Reagenzien sind zu kalt	Alle Reagenzien sollten auf Raumtemperatur (15 - 30 °C) erwärmt werden.
Falscher Filter im Meßgerät verwendet	Die Platte sollte innerhalb von 60 Minuten nach Zugabe der STO Stopplösung bei 450 nm (optionale Referenzwellenlänge: 620 nm) ausgelesen werden.
Standardkurve nicht linear oder hohe Variation der Doppelbestimmungen	
Mögliche Ursache	**Was ist zu tun**
Verdünnungsfehler beim Ansetzen der Standards	Stellen Sie sicher, dass die Verdünnungen des STA Standards gemäß den Gebrauchsanweisungen hergestellt wurden
Unvollständiges Waschen der Mikrotiterplatte	Waschen Sie die Platte mindestens 6 Mal mit 400 µL / Well mit verdünntem WB Waschpuffer (1x).
Unzureichendes Mischen	Mischen Sie die STA Standard-Stammlösung während der Rekonstitution 10 Sekunden lang am Vortexer. Achten Sie darauf, die Standardlösungen S1 - S3 vor dem nächsten Verdünnungsschritt und der Zugabe zur Mikrotiterplatte gründlich zu mischen.

Inkontinuität der Pipettiertechnik oder Unterbrechung des Tests	Das Pipettieren von Proben- und Standardlösungen sollte kontinuierlich durchgeführt werden. Alle Reagenzien sollten vor Beginn des Assay-Verfahrens vorbereitet werden.

Literatur

[1] Behrman, A; Buchta, WG; Budnick, LD; Hodgson, MJ; Raymond, LW; Russi, M; Spillmann, SJ; Swift, MD (Aug 2013). "Protecting Health Care Workers From Tuberculosis, 2013: ACOEM Medical Center Occupational Health Section Task Force on Tuberculosis and Health Care Workers.". Journal of occupational and environmental medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine 55 (8): 985–8. doi:10.1097/JOM.0b013e3182a0d7cd. PMID 23887706.

[2] Bellete, B; Coberly, J; Barnes, GL; Ko, C; Chaisson, RE; Comstock, GW; Bishai, WR (Jun 1, 2002). "Evaluation of a whole-blood interferon-gamma release assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in 2 study populations.". Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 34 (11): 1449–56. doi:10.1086/340397. PMID 12015690.

[3] CDC, Centers for Disease Control and Prevention CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People: Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States. MMWR 2010; 59 (No.RR-5): https://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/testing/igra.htm.

[4] Cecilia S. Lindestam Arlehamn,David Lewinsohn, Alessandro Sette, and Deborah Lewinsohn: Antigens for CD4 and CD8 T Cells in Tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 Jul; 4(7): a018465, 1-15. doi: 10.1101/cshperspect.a018465.

[5] "Cytokine" in John Lackie. A Dictionary of Biomedicine. Oxford University Press. 2010. ISBN 9780199549351.

[6] "Cytokine" in Stedman's Medical Dictionary, 28th ed. Wolters Kluwer Health, Lippincott, Williams & Wilkins (2006) http://en.wikipedia.org/wiki/Interferon_gamma.

[7] Diel, R; Loddenkemper, R; Meywald-Walter, K; Niemann, S; Nienhaus, A (May 15, 2008). "Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*.". American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 177 (10): 1164–70. doi:10.1164/rccm.200711-1613OC. PMID 18276940.

[8] Elena Chiappini, Chiara Della Bella, Francesca Bonsignori, Sara Sollai, Amedeo Amedei, Luisa Galli, Elena Niccolai, Gianfranco Del Prete, Mahavir Singh, Mario M. D'Elios, and Maurizio de Martino: Potential Role of *M. tuberculosis* Specific IFN-γ and IL-2 ELISPOT Assays in Discriminating Children with Active or Latent Tuberculosis. PLoS One. 2012; 7(9): e46041. Published online Sep 28, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046041

[9]"Entrez Gene: IFNGR2".

[10] Franken, WP; Timmermans, JF; Prins, C; Slootman, EJ; Dreverman, J; Bruins, H; van Dissel, JT; Arend, SM (Apr 2007). "Comparison of Mantoux and QuantiFERON TB Gold tests for diagnosis of latent tuberculosis infection in Army personnel.". Clinical and vaccine immunology : CVI 14 (4): 477–80. doi:10.1128/CVI.00463-06. PMC 1865601. PMID 17301213.

[11] Gerald H. Mazurek, M.D., Margarita E. Villarino, M.D. "Guidelines for Using the QuantiFERON-TB Test for Diagnosing Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection". Retrieved 2007-06-01.

[12] Gray PW, Goeddel DV (August 1982). "Structure of the human immune interferon gene". Nature 298 (5877): 859–63. doi:10.1038/298859a0. PMID 6180322.

[13] Green JA, Cooperband SR, Kibrick S (1969). "Immune specific induction of interferon production in cultures of human blood lymphocytes". Science 164 (3886): 1415–1417. doi:10.1126/science.164.3886.1415. PMID 5783715.

[14] Horst Ibelgaufts. Cytokines in Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia Version 31.4 (Spring/Summer 2013 Edition).

[15] Mazurek, GH; LoBue, PA; Daley, CL; Bernardo, J; Lardizabal, AA; Bishai, WR; Iademarco, MF; Rothel, JS (Oct 10, 2001). "Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection.". JAMA: the Journal of the American Medical Association 286 (14): 1740–7. doi:10.1001/jama.286.14.1740. PMID 11594899.

[16] Milstone, LM; Waksman BH (1970). "Release of virus inhibitor from tuberculin-sensitized peritoneal cells stimulated by antigen". J Immunol 105 (5): 1068–1071. PMID 4321289.

[17] Pottumarthy, S; Morris, AJ; Harrison, AC; Wells, VC (Oct 1999). "Evaluation of the tuberculin gamma interferon assay: potential to replace the Mantoux skin test.". Journal of clinical microbiology 37 (10): 3229–32. PMC 85534. PMID 10488182.

[18] Schoenborn JR, Wilson CB (2007). "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses". Adv. Immunol. 96: 41–101. doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2. PMID 17981204.

[19] Streeton, JA; Desem, N; Jones, SL (Jun 1998). "Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection.". The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 2 (6): 443–50. PMID 9626600.

[20] Thanassi, Wendy; Noda, Art; Hernandez, Beatriz; Newell, Jeffery; Terpeluk, Paul; Marder, David; Yesavage, Jerome A. (2012). "Delineating a Retesting Zone Using Receiver Operating Characteristic Analysis on Serial QuantiFERON Tuberculosis Test Results in US Healthcare Workers". Pulmonary Medicine 2012: 1–7. doi:10.1155/2012/291294.

[21] Wheelock, EF, Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. Science 149, 310-311, 1965. It was also shown to be produced in human lymphocytes.

[22] WHO (2018). "Latent TB Infection: Updated and consolidated guidelines for programmatic management". WHO/CDS/TB/2018.4, ISBN 978-92-4-155023-9, Page 1-74 (www.who.int/tb/publications/2018/latent-tuberculosis-infection/en/)

[23] Zwerling, A; Benedetti, A; Cojocariu, M; McIntosh, F; Pietrangelo, F; Behr, MA; Schwartzman, K; Menzies, D; Pai, M (2013). "Repeat IGRA testing in Canadian health workers: conversions or unexplained variability?". PLoS ONE 8 (1): e54748. doi:10.1371/journal.pone.0054748. PMID 23382955.

[24] Global tuberculosis report 2018; WHO http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

[25] Tamara Davenne and Helen McShane. Why don't we have an effective tuberculosis vaccine yet? Expert Rev Vaccines. 2016 Aug 2; 15(8): 1009–1013. Published online 2016 May 3. doi: 10.1586/14760584.2016.1170599 PMCID: PMC4950406. PMID: 27010255

[26] Indeterminate results of a tuberculosis-specific interferon-γ release assay in immunocompromised patients. Eur Respir J 2010; 35: 1179–1191. DOI: 10.1183/09031936.00122109.CopyrightERS Journals Ltd 2010.

[27] Chiara Della Bella, Michele Spinicci, Heba F. Mustafa Alnwaisri, Eduard Arkadievich Shuralev, Alessandro Bartoloni, Mario Milco D'Elios. LIOFeron®TB/LTBI: A novel and reliable test for LTBI and tuberculosis. December 23, 2019DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.12.012

Symbole

IVD	Nur für die in-vitro Diagnostik	2°C–8°C	Lagerung bei 2 - 8°C
CE	Konform mit der IVD-Richtlinie 98/79/EG	2°C–30°C	Lagerung bei 2 - 30°C
GTIN	Globale Handelsartikelnummer		Gebrauchsanweisung beachten
REF	Katalognummer		Nur für Einmalgebrauch
LOT	Chargenbezeichnung		Nicht verwenden, wenn die äußere Packung beschädigt ist
	Hersteller		Vor Feuchtigkeit schützen
Σ	Für <x> Bestimmungen		Vor Sonnenlicht schützen
	Verfallsdatum, Verwendbar bis		

PC	Positivkontrolle	TB A	TB Antigen A
NC	Negativkontrolle	TB B	TB Antigen B
MTP	Mikrotiterplatte	TMB	Substratlösung
STA	Rekombinanter humaner IFN-γ-Standard	STO	Stopplösung
DET	Detektionsantikörperlösung	WB	Waschpuffer, 10x Konzentrat
CON	Konjugatlösung	IB	Inkubationspuffer

Kontaktinformation

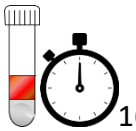
Für weitere Informationen und technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an

sales@lionex.de
Oder rufen Sie folgene Nummer an: + 49 (0) 531 - 260 12 66
Oder konsultieren Sie unsere Webseite: www.lionex.de

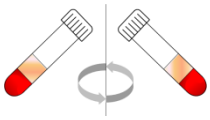
Kurzbeschreibung des Testverfahrens

Schritt 1 - HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES

Entnahme von Vollblut aus der Vene: Unter Standard-Laborbedingungen (aseptisch, Hämolyse vermeiden) mindestens **4,5 mL** menschliches Blut mit einem **Li-Heparin**-Blutentnahmeröhrchen entnehmen.



Das Li-Heparin-Blutentnahmeröhrchen mindestens 10 x vorsichtig invertieren. 1 ml der Blutprobe in jedes **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBE** NC, TB A, TB B und PC und **10 x vorsichtig invertieren**. Stellen Sie die **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** sofort aufrecht in einen Inkubator und Inkubieren Sie diese für **16 - 24 Stunden lang bei 37 °C (± 0,5 °C)**.

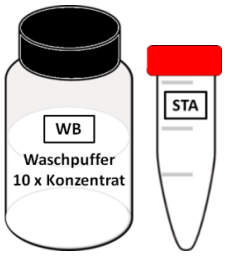


Gewinnen Sie das Humanplasma durch Zentrifugation der Röhrchen für **15 Minuten** bei **2000 bis 3000 RCF (g).** Die roten Blutkörperchen sammeln sich im Gelpfropfen, der die Zellen vom Plasma trennt.

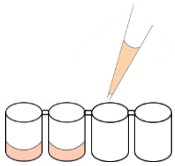
Übertragen Sie jeweils 50 µL des klaren Überstands (Humanplasma) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte und fahren mit Arbeitsschritt 5 der "HUMAN IFN-γ ELISA Testdurchführung" fort. Optionally können die Proben wie in "Verwendung und Lagerung von Plasma nach der Blutstimulation" gelagert werden. **Vermeiden Sie eine Verunreinigung mit Roten Blutzellen!**

Schritt 2 - HUMAN IFN-γ ELISA

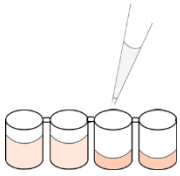
Alle Kitkomponenten auf **Raumtemperatur (15 - 30 °C)** bringen.



Waschpuffer (10 x Konzentrat) mit destilliertem Wasser auf 1 x Waschpuffer verdünnen. Rekonstituieren Sie den STA **rekombinanten humanen IFN-γ-Standard** zu einer 12,5 IU / mL Stammlösung durch Zugabe des auf dem Etikett angegebenen Volumens an IB Inkubationspuffers und mischen Sie diesen durch kräftiges Schütteln (z. B. 10 Sekunden Vortexen). Bereiten Sie weitere Standardlösungen **S1 - S4** vor (siehe Abschnitt „*Vorbereitung der Reagenzien*").

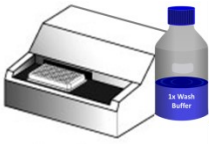


Pipettieren Sie 50 µL jeder Probe sowie der vorbereiteten STA Standardlösungen **S1 - S3** und den IB Inkubationspuffer als **Blindprobe (S4)** in die Wells der MTP Mikrotiterplatte. Gelagertes Plasma muss kurz vor Gebrauch gemischt werden. Die **Standards und der Blindwert** sollten **doppelt** gemessen werden, die Proben als **Einzelbestimmungen**.

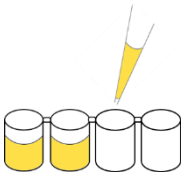


Pipettieren Sie 50 µL / Well DET **Detektionsantikörperlösung** in die Wells der MTP Mikrotiterplatte. Mischen Sie die Standards/Proben gründlich mit einem Mikroplattenschüttler für 60 Sekunden bei 500 bis 1000 U/min.

INKUBATIONSDAUER: **1 Stunde (± 5 min) bei 15 - 30°C**

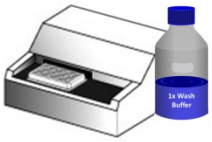


Waschen Sie die MTP Mikrotiterplatte **6 x 400 µL / Well** mit **verdünntem (1 x) Waschpuffer**.

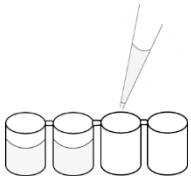


Pipettieren Sie 100 µL CON **Konjugatlösung** in die Wells der MTP Mikrotiterplatte.

INKUBATIONSDAUER: **1 Stunde (± 5 min) bei 15 - 30°C**

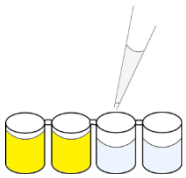


Waschen Sie die MTP Mikrotiterplatte **6 x 400 µl / Well** mit **verdünntem (1 x) Waschpuffer**.



Pipettieren Sie 100 µL TMB **Substratlösung** in die Wells der MTP Mikrotiterplatte.

INKUBATIONSDAUER: **30 Minuten (± 1 min) bei 15 - 30°C im Dunkeln**



Schnell in jedes Well der MTP Mikrotiterplatte **50 µL der** STO **Stopplösung** zur Substratlösung hinzugeben, um die Substratreaktion zu beenden (nicht Waschen!).

Messen Sie die Absorption (OD) bei 450 nm (optionale Referenzwellenlänge: 620 nm). Die Farbe ist mindestens 60 Minuten stabil.

Analysieren Sie die Ergebnisse (**Software** oder manuell, indem Sie die Gebrauchsanweisung befolgen).

Hinweis: Bitte konsultieren Sie www.lionex.de für spezifische Software.

Warenzeichen:

LIONEX®, LIOFeron®, Microsoft®, Excel® (Microsoft), QuantiFERON® (Qiagen)

Begrenzte Lizenzvereinbarung für LIOFeron®TB/LTBI - 2-Komponenten-Kit, bestehend aus HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES und HUMAN IFN-γ ELISA.

Die Verwendung dieses Produkts bedeutet die Zustimmung eines Käufers oder Benutzers des Produkts zu den folgenden Bedingungen:

1. Das Produkt darf nur gemäß den Anweisungen im Kit und den Kitkomponenten verwendet werden. Die LIONEX GmbH gewährt keine Lizenz für die enthaltenen Komponenten dieses Kits oder für Komponenten, die nicht in diesem Kit enthalten sind (außer wie in der Anleitung und im Kit beschrieben) oder geistige Fähigkeiten.

2. Abgesehen von ausdrücklichen Lizenzen gewährt die LIONEX GmbH keine Garantie für das Kit und / oder seine Verwendung (en), verstößt also nicht gegen die Regeln und verletzt nicht die Rechte Dritter.

3. Das Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet werden. Diese dürfen auch nicht anders verarbeitet oder weiterverkauft werden, sofern von der LIONEX GmbH nichts anderes bestimmt ist.

4. Die LIONEX GmbH lehnt insbesondere alle anderen Lizenzen ab, die anders als ausdrücklich angegeben vermerkt oder bezeichnet sind.

5. Der Käufer und der Benutzer des Kits erklären sich damit einverstanden, niemandem zu gestatten, irgendwelche Schritte zu unternehmen, die zu einer oben verbotenen Tat führen oder diese erleichtern könnten. Die LIONEX GmbH kann die Verbote dieser beschränkten Lizenzvereinbarung vor jedem Gericht ausführen und alle Ermittlungs- und Gerichtskosten, Anwaltsgebühren, bei jeder Aktion zur Ausführung dieser beschränkten Lizenzvereinbarung oder eines der geistigen Eigentumsrechte, die sich auf das Kit beziehen, zurückfordern und die Kit-Komponenten

Aktuelle Lizenzbestimmungen finden Sie unter www.lionex.de.

©2020, LIONEX GmbH, alle Rechte vorbehalten.

Hersteller:

LIONEX GmbH

Salzdahlumer Strasse 196, Geb. 1A
38126 Braunschweig, GERMANY
Tel.: +49 (0) 531 - 260 12 66
Fax: +49 (0) 531 - 618 06 54
Web: www.lionex.de

Vertrieb:

Address label
of distributor