



LIOFeron® TB/LTBI

HUMAN IFN- γ ELISA Gebrauchsanweisung



22 Tests



LIO-Feron 02_22



44 Tests



LIO-Feron 02_44

Interferon Gamma Release Assay zum Nachweis einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*.



In-vitro-Diagnostikum



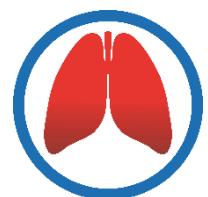
LIONEX GmbH

Salzdahlumer Straße 196, Geb. 1A
38126 Braunschweig, Deutschland



www.lionex.de
sales@lionex.de

Revision DE_A / 250902



Änderungshistorie des Dokuments

Datum	Revision	Änderung
2025-09-02	DE_A	Allgemeine Überarbeitung zur Anpassung an die Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika

Für weitere Informationen und technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an:

LIONEX GmbH

Salzdahlumer Straße 196, Gebäude 1A

38126 Braunschweig, GERMANY

Telefon: +49 (0) 531 - 260 12 66

Telefax: +49 (0) 531 - 618 06 54

E-Mail: sales@lionex.de

Web: www.lionex.de

Inhalt

Vorgesehene Anwendung	1
Informationen zur Tuberkulose	2
Anwendungsfeld	3
Testprinzip	4
Im Kit enthaltene Komponenten	6
Kontrollen und Kalibratoren	7
Zusätzlich erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien	7
Zeitbedarf für den Test	8
HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES	8
HUMAN IFN- γ ELISA	8
Stabilität und Lagerung	9
Lagerbedingungen der Kitkomponenten	9
Lagerung und Handhabung der Proben	9
Geöffnete Komponenten und rekonstituierte Standards	10
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	11
Gefahren- und Sicherheitshinweise	13
Probenentnahme und ELISA-Vorbereitung	14
Verwendung und Lagerung von Plasma nach der Blutstimulation	14
Vorbereitung von Reagenzien	15
Testdurchführung	17
HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES	17
HUMAN IFN- γ ELISA	20
Berechnung und Testinterpretation	23
Generierung der Standardkurve mittels x-y Diagramm	23
Berechnung der IFN- γ -Konzentration aus den OD-Werten	24
Qualitätskontrolle des Testergebnisses	25
Interpretation der Ergebnisse	27
Einschränkungen	29

Technische Information	31
Unbestimmte Ergebnisse	31
Geronnenes Human Plasma	31
Interferierende Substanzen	32
Leistungsmerkmale	34
Messbereich des HUMAN IFN- γ ELISA	34
Vergleichsstudien	34
Sensitivität und Spezifität	35
Klinische Sensitivität und Spezifität	35
Leistungsmerkmale	35
Anleitung zur Fehlerbehebung	38
Literatur	41
Symbole	43
Kurzbeschreibung des Testverfahrens	44
Schritt 1 - HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES	44
Schritt 2 - HUMAN IFN- γ ELISA	45

Vorgesehene Anwendung

LIOFeron® TB/LTBI ist ein In-vitro-Diagnostikum zur quantitativen Bestimmung von Interferon Gamma (IFN- γ) in menschlichem Blut nach Stimulation mit spezifischen Antigenen von *Mycobacterium tuberculosis*.

Der Test ist für die Diagnose einer latenten Tuberkulose-Infektion (LTBI) geeignet, kann jedoch nicht zwischen aktiver und latenter Tuberkulose unterscheiden. Ein positives Ergebnis allein ist gemäß den WHO consolidated guidelines on tuberculosis (Version 2022) nicht ausreichend zur eindeutigen Diagnose und sollte durch andere Tests wie organbezogene Bildgebung, bakteriologische und mikrobiologische Verfahren bestätigt werden.

LIOFeron® TB/LTBI ist ein 2-Komponenten-Kit, bestehend aus den Komponenten **HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES** und **HUMAN IFN- γ ELISA**.

Der Test ist ausschließlich für den professionellen Einsatz in der In-vitro-Diagnostik bestimmt. Der Test ist NICHT für die Eigenanwendung.

Informationen zur Tuberkulose

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 Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gehört die TB weltweit zu den zehn häufigsten Todesursachen und führt wahrscheinlich die Liste der infektionsbedingten Todesursachen wie vor der COVID-19 Pandemie wieder an. Im Jahr 2023 verursachte die TB circa 1,25 Millionen Todesfälle (Variation von 1,13-1,37 Millionen), davon 1,09 Millionen bei HIV-negativen Patienten und zusätzlich etwa 161.000 Todesfälle bei HIV-positiven Patienten. Jährlich kommt es nach Schätzungen zu mehr als 10,0 Millionen neuen TB-Fällen (Variation von 10,1-11,7 Millionen), mit steigender Tendenz in den letzten Jahren²⁴. 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 2023 weltweit 400.000 MDR-TB Fälle nachgewiesen und gemeldet²⁴.

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 inaktiv²⁵.

Anwendungsfeld

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-Lymphozyten von Patienten, die mit *M. tuberculosis* infiziert sind, erkennen mykobakterielle Antigene und lösen eine Zytokinproduktion aus, z.B. IFN- γ ^{9, 12-14}. Der Interferon-Gamma Release Assays (IGRA) **LIOFeron® TB/LTBI** ist ein qualitativer Test, der auf der quantitativen Bestimmung von IFN- γ basiert und hilfreich für die Diagnose von aktiver und latenter TB sein kann. IGRAs können jedoch nicht zwischen aktiver und latenter TB unterscheiden.

IGRAs 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.

Weitere Anwendungsfelder können der aktuellen Version der WHO consolidated guidelines on tuberculosis entnommen werden.

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, dass humane Blutzellen bei Exposition zu spezifischen *M. tuberculosis* Antigenen IFN- γ bilden.

LIOFeron® TB/LTBI enthält zwei verschiedene TB-Antigen Röhrchen, TB A und TB B. TB A enthält die Antigene ESAT6, CFP10 und TB 7.7, 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}.

Pro Test 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-, Positiv- 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) hinzu pipettiert 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 Waschschrift wird die Konjugatlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert und die Platte wird erneut inkubiert. Nach einem finalen Waschschrift 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 einer Wellenlänge von 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.

Im Kit enthaltene Komponenten

HUMAN IFN- γ ELISA:

Komponente	Symbol Deckelfarbe	Enthaltene Menge	
	 REF	22 Tests LIO-Feron 02_22	44 Tests LIO-Feron 02_44
Mikrotiterplattenstreifen (je 8 Vertiefungen) mit monoklonalem anti-human IFN- γ Fängerantikörper	MTP 	12 Streifen ($\cong$ 1 Platte)	24 Streifen ($\cong$ 2 Platten)
Rekombinanter humaner IFN- γ Standard (12,5 IU, lyophilisiert)	STA 	2x	4x
Detektionsantikörperlösung mit monoklonalem anti-human IFN- γ Detektionsantikörper, Biotin-gekoppelt, enthält Casein	DET 	7 mL	14 mL
Konjugatlösung mit Streptavidin, HRP-gekoppelt	CON 	14 mL	24 mL
Substratlösung, enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)*	TMB 	14 mL	24 mL
Stopplösung, enthält H ₂ SO ₄ *	STO 	7 mL	14 mL
Waschpuffer (10x Konzentrat)	WB 	100 mL	2x 100 mL
Inkubationspuffer, enthält Bovine Serum Albumin	IB 	40 mL	40 mL
Gebrauchsanweisung		1x	1x

* Lesen Sie den Abschnitt "Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen".

Kontrollen und Kalibratoren

Der im Kit enthaltene rekombinante humane IFN- γ -Standard wurde gegen einen Standard des NIBSC (REF: 82/587) geprüft. Der Standard dient als interne Qualitätskontrolle (s. Abschnitt "*Qualitätskontrolle des Testergebnisses*").

Zusätzlich erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

- LIOFeron® TB/LTBI HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES (REF LIO-Feron 01_22)
- Behälter für die Verdünnung der Standards z.B. sterile 1,5 mL Plastikgefäße, und (optional) für die Plasmasammlung und Lagerung
- Inkubator 37 °C ($\pm$ 0,5 °C), CO₂ ist nicht notwendig
- Zentrifuge, geeignet für Blutsammelgefäße (RCF-Reichweite von 2000 bis 3000)
- Vortex-Mischer
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser
- Bechergläser, Glasflaschen und/oder Messzylinder für die Vorbereitung des 1x Waschpuffers
- Kalibrierte Mikroliterpipetten und Einwegspitzen, geeignet für 50 μ L bis 1000 μ L
- Automatischer Washer für Mikrotiterplatten (96 well, empfohlen) oder kalibrierte Multikanalpipetten, geeignet für 50 μ L bis 400 μ L mit Einwegspitzen (optional)
- Laboruhr
- Mikrotiterplatten-Reader (450 nm)

Zeitbedarf für den Test

Die minimale Zeitspanne von der Probenentnahme bis zum Ergebnis beträgt ca. 20 Stunden. Der Großteil des Zeitbedarfs beträgt dabei die Inkubation der HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES. Es wird empfohlen, wenn möglich mehrere Tests parallel durchzuführen, da so der Zeitbedarf pro Test geringer ausfällt.

HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES

Pipettieren der Proben in die Röhrchen: ca. 10 Minuten pro Probe

Inkubationsdauer: 16 bis 24 Stunden (37 °C ± 0,5 °C)

Gewinnung der Plasmaproben: ca. 5 Minuten

HUMAN IFN- γ ELISA

Für eine Mikrotiterplatte: Circa 3 h (22 Tests, < 1 h Laborarbeit)
zusätzlich ca. 15 Minuten für jede weitere
Mikrotiterplatte

Stabilität und Lagerung

Lagerbedingungen der Kitkomponenten

Lagern Sie die Kits bzw. die einzelnen Komponenten gemäß der auf den jeweiligen Etiketten angegebenen Temperaturen. Frieren Sie die Testkomponenten niemals ein oder setzen Sie Temperaturen von mehr als 30 °C aus. Beachten Sie die aufgedruckten Verfallsdaten. Verwenden Sie keine abgelaufenen oder falsch gelagerten Komponenten. Verwenden Sie keine beschädigten oder unverschlossenen Komponenten.

Lagern Sie das ELISA Kit bei 2 – 8 °C.

Schützen Sie die TMB Substratlösung vor direkter Lichteinstrahlung.

Lagerung und Handhabung der Proben

Hinweise und Informationen zur Lagerung und Handhabung der Proben entnehmen Sie bitte dem Abschnitt *Probenentnahme und ELISA-Vorbereitung*.

Geöffnete Komponenten und rekonstituierte Standards

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. Die einzelnen Mikrotiterplattenstreifen sind ausschließlich für den einmaligen Gebrauch bestimmt.

Nach Verdünnung des **WB** Waschpuffers (10x Konzentrat) ist die verdünnte Lösung (1x Waschpuffer) bei 2 – 8 °C für 1 Monat stabil.

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.

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 unbenutzten Mikrotiterplatten sichtbar sind, hat dies keine Auswirkungen auf das Testergebnis.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die in vitro-Diagnostik! Nicht zur 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 Kitkomponenten vor Gebrauch durch vorsichtiges Schwenken. Lagern Sie das Testkit unmittelbar nach der Verwendung bei 2 – 8 °C. Der Test ist empfindlich gegenüber Temperaturen über 30 °C.
- Verwenden Sie nur frische Blutproben, die Li-Heparin als Antikoagulans enthalten. 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 Stunden zurückliegt.
- Messen sie die Standards in Doppelbestimmung. 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 aseptischen 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 IFN- γ -Messung. 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 IFN- γ hierdurch denaturiert werden könnte.
- Vor dem Pipettieren die Testlösungen durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken durchmischen. Starkes Schütteln vermeiden (Schaumbildung!). In konstanten Intervallen pipettieren, damit alle Wells gleichbehandelt werden.
- Vermeiden Sie die Berührung der Innenseite der Schraubdeckel mit den Fingern (Kontaminationsgefahr). Nur zum Einmalgebrauch. Nicht verwenden, wenn die Behälter beschädigt oder offen sind.
- Schützen Sie die **TMB** Substratlösung vor direkter Lichteinstrahlung.
- Sollte es mit dem Kit zu schweren Vorkommnissen (vgl. Art. 2 Nr. 68 Verordnung (EU) 2017-746 IVDR) kommen, melden Sie dies unverzüglich dem Hersteller und ihrer zuständigen lokalen Behörde.

Für weitere Informationen wenden Sie sich per E-Mail an sales@lionex.de.

MSDS sind zum Download auf www.lionex.de erhältlich.

**ACHTUNG:**

Behandeln Sie humanes Blut und Plasma als potenziell infektiös!

Entsorgen Sie Reste von humanen Blut- und Plasmaproben sowie Materialien, die mit diesen in Kontakt gekommen sind, gemäß lokalen Vorschriften.

Gefahren- und Sicherheitshinweise



TMB Substratlösung

Enthält: 2-Pyrrolidon. Achtung! Gefahr!

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

Entsorgung gemäß den behördlichen Vorschriften.

Bei Exposition: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.



STO Stopplösung

Enthält: Schwefelsäure. Achtung!

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H315 Verursacht Hautreizungen.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

Entsorgung gemäß den behördlichen Vorschriften.

Bei Exposition: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

Probenentnahme und ELISA-Vorbereitung

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

Es werden mindestens 4,5 mL menschliches Blut benötigt. Die Probe unter Standardlaborbedingungen (aseptisch, Vermeidung von Hämolyse) unter Verwendung von Li-Heparin-Blutentnahmeröhrchen entnehmen. Lassen Sie die Venenpunktion nur von entsprechend qualifiziertem Personal durchführen. Beachten Sie gesetzliche Vorgaben und Anforderungen an die Blutentnahme.

Wenn die Probe nicht unmittelbar nach der Blutentnahme in die HUMAN BLOOD STIMULATION 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 und den HUMAN IFN- γ ELISA 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 das Plasma von den roten Blutkörperchen und lagern 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 (10x Konzentrat):

Bringen Sie den **WB** Waschpuffer (10x 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 (10x 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 Vortex-Mischer), bis das Protein vollständig zurückgelöst ist. Wir empfehlen, das Röhrchen dann für 10 – 30 min bei Raumtemperatur ruhen zu lassen.

Verdünnen Sie die Stammlösung wie im auf der nächsten Seite abgebildeten und in der Tabelle 1 angegebenen Pipettierschema weiter zu den Standardlösungen (S1 - S4; Abb. 1, Tabelle 1).

Tabelle 1: Vorbereitung der Standardlösungen S1 - S4

Standard- lösung Nr.	konz. IFN- γ	Volumen Stammlösung oder Standardlösung	Volumen Inkubationspuffer	Gesamt- volumen
S1	4 IU/mL	80 μ L der Stammlösung	170 μ L	250 μ L
S2	1 IU/mL	50 μ L Standardlösung S1	150 μ L	200 μ L
S3	0,25 IU/mL	50 μ L Standardlösung S2	150 μ L	200 μ L
S4 (Blindwert)	0 IU/mL	-	150 μ L	150 μ L

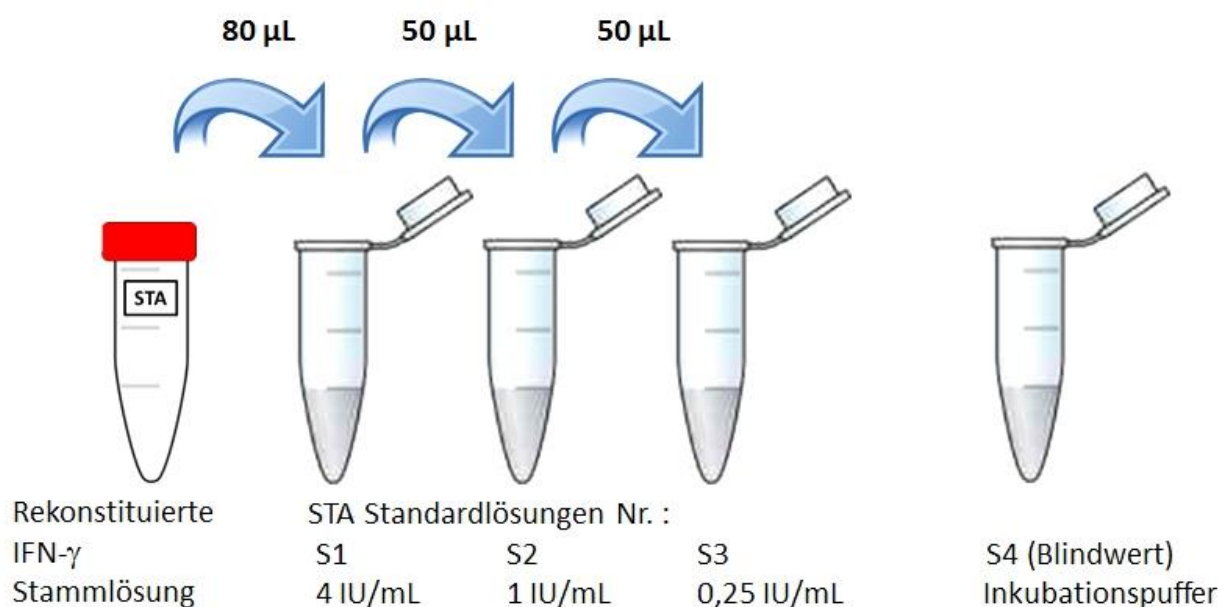


Abbildung 1: IFN- γ Konzentrationen der hergestellten Standardlösungen S1 – S3

Testdurchführung

HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES

Die Testdurchführung benötigt circa 10 Minuten für jede Probe.

Inkubationszeit: 16 - 24 Stunden

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 Blutentnahmeröhrchen durch vorsichtiges Auf- und Abschwenken (ca. 10-mal) vor jedem Pipettierschritt. Pipettieren Sie jeweils 1 mL der Blutprobe in jedes HUMAN BLOOD STIMULATION TUBE (**NC**, **TB A**, **TB B** und **PC**) und verschließen diese. Achtung! Es gibt 2 Verschlussstellen. Drücken Sie den Deckel ganz nach unten!
3. Mischen Sie jedes HUMAN BLOOD STIMULATION TUBE mit je 1 mL 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 ($\pm 0,5$ °C). Inkubieren Sie die Röhrchen für mindestens 16 Stunden. Maximale Inkubationsdauer ist 24 Stunden.

5. Abschließend den Ständer mit den 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, die Röhrchen vor der Ernte des menschlichen Plasmas für 15 Minuten bei 2000 bis 3000 RCF (g) zentrifugieren. Vermeiden Sie nach der Zentrifugation das Auf- und Abpipettieren oder das Mischen des Plasmas. Stets darauf achten, dass das Plasma nicht mit den auf der Oberfläche des Gels befindlichen 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 μ L 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.

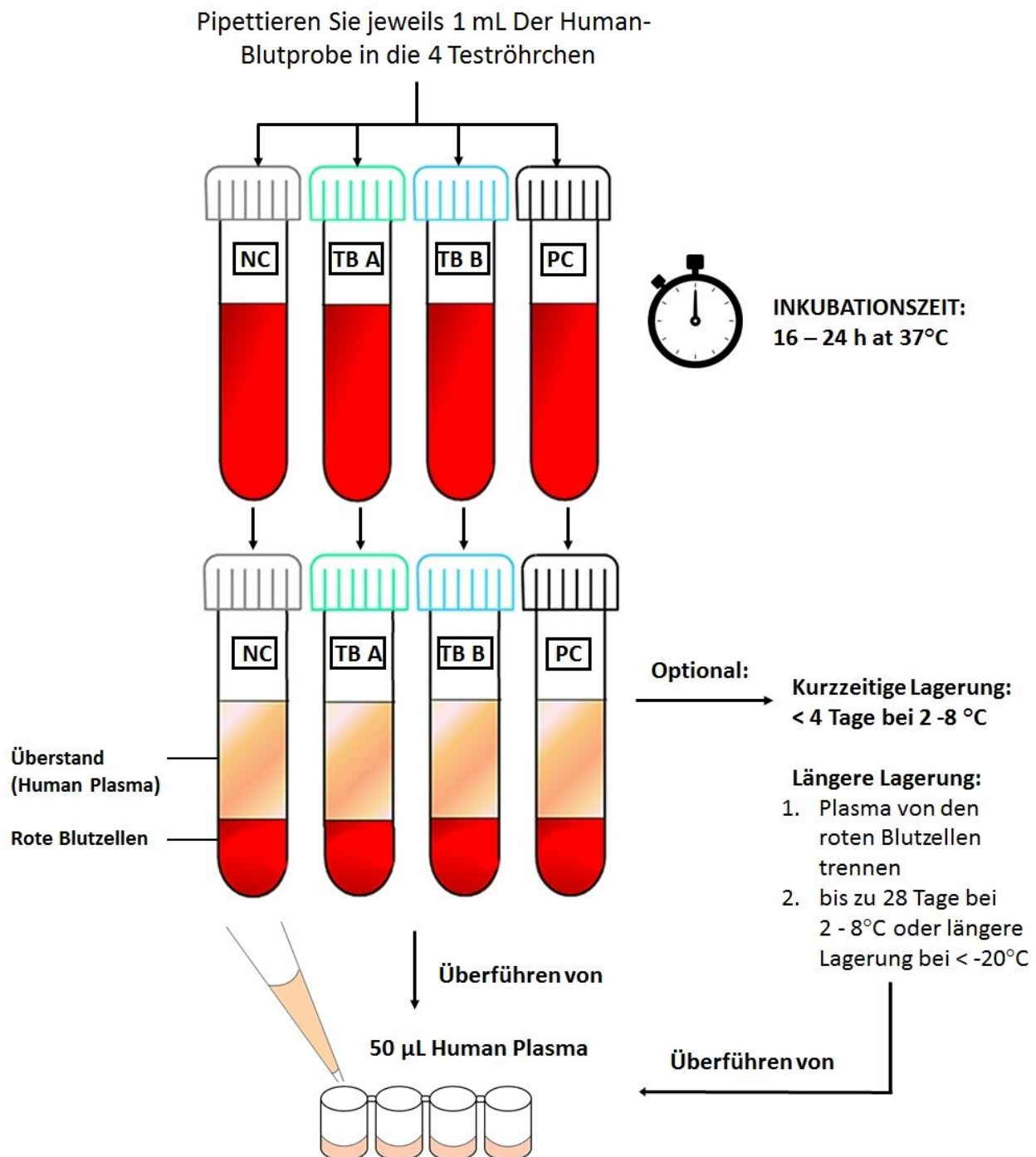


Abbildung 2: Kurzanleitung zur Verwendung der HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES

HUMAN IFN- γ ELISA

Die Testdurchführung benötigt ca. 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 legen.
4. Pipettieren Sie 50 μ L jeder Probe, 50 μ L der vorbereiteten Standardlösungen Nr. S1 - S3 und des **IB** Inkubationspuffers als Blindprobe (S4) in die entsprechenden Vertiefungen. Die Standards und der Blindwert müssen doppelt gemessen werden, die Proben können auch als Einzelbestimmungen gemessen werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 NC	3 NC	5 NC	7 NC	9 NC	S1 S2 S3 S4 (Blank)		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			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			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			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

Abbildung 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**)

Hinweis: Das Pipettierschema kann beliebig gewählt werden, jedoch empfehlen wir das Beispielschema aus Abbildung 3 zu verwenden.

5. Pro Vertiefung 50 µL der **DET** Detektionsantikörperlösung hinzugeben. Decken Sie die Platte mit einem Mikrotiterplattendeckel ab. Mischen Sie die Standards/Proben gründlich mit einem Mikrotiterplattenschüttler für mindestens 60 Sekunden bei 500 bis 1000 U/min. Lassen Sie anschließend die Platte inkubieren.

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

6. Waschschritt: Die Wells der Platte leeren (entleeren oder absaugen) und 6x 400 µL / Well mit verdünntem Waschpuffer waschen.
7. 100 µL / Well der **CON** Konjugatlösung pipettieren und dann inkubieren lassen.

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 und inkubieren lassen.

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

10. Fügen Sie schnell 50 µL der **STO** Stopplösung pro Well 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.

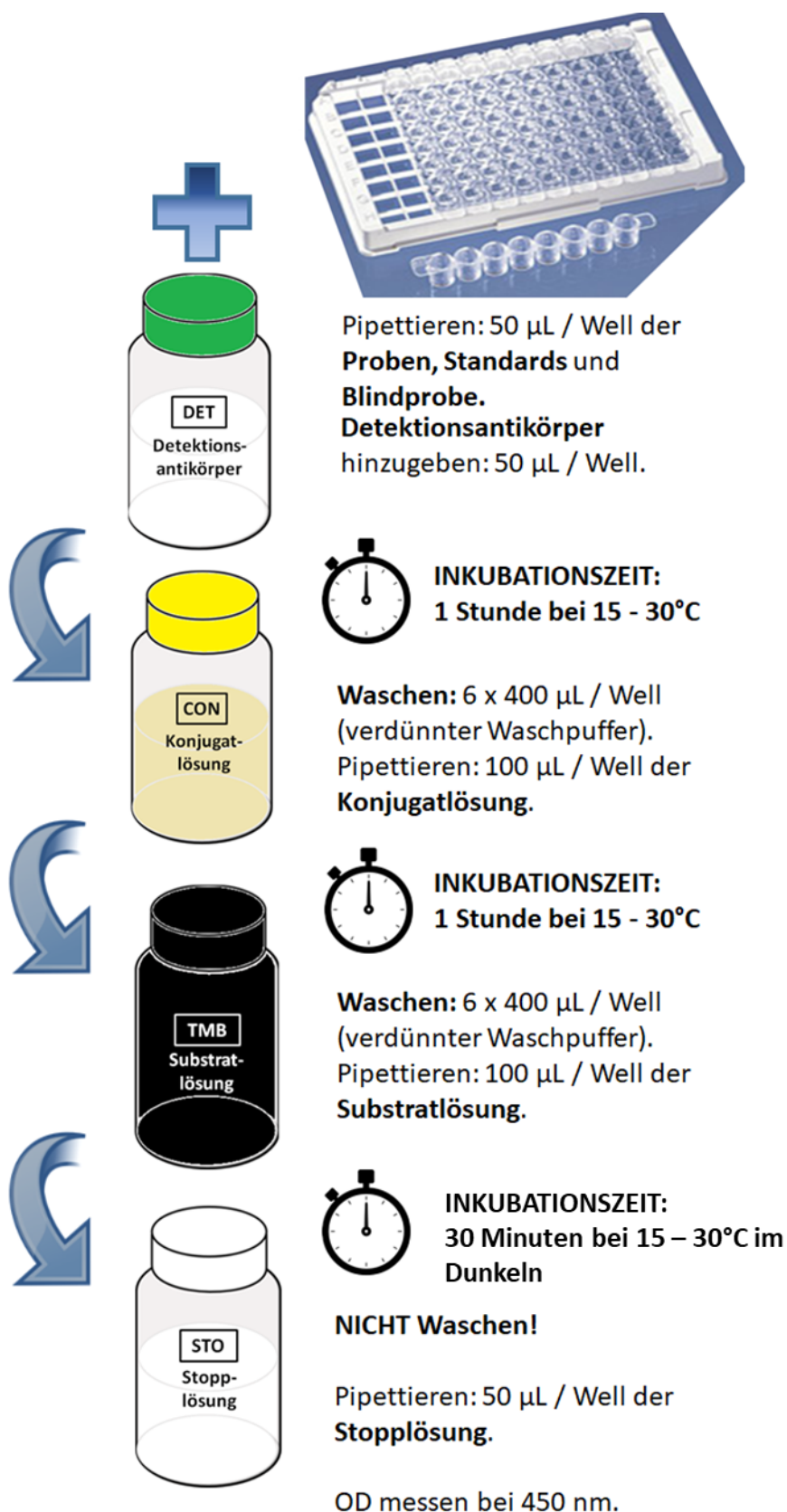


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Testprozedur des HUMAN IFN- γ ELISA

Berechnung und Testinterpretation

Für die Berechnung der Referenzkurve empfehlen wir die Verwendung automatischer Computerprogramme. Diese Berechnungen können z.B. mit statistischer Software wie Microsoft® Excel® durchgeführt werden. Wir empfehlen die Verwendung dieser Software zur Berechnung der Regressionsanalyse, des Variationskoeffizienten CV (%) für die Standards und des Determinationskoeffizienten (R^2) beziehungsweise des Korrelationskoeffizienten (R) der Standardkurve.

Generierung der Standardkurve mittels x-y Diagramm

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

Erstellen Sie eine ln-ln-Standardkurve, indem Sie den natürlichen Logarithmus ($\log_e$ bzw. ln) der mittleren OD-Werte der Standardlösungen S1 - S3 auf der vertikalen Achse (y-Achse) gegen den natürlichen Logarithmus der IFN- γ -Konzentration ($C_{\text{IFN-}\gamma}$) der Standardlösungen auf der horizontalen Achse in IU/mL (x-Achse) auftragen. Lassen Sie den Nullstandard (Blindwert) hierbei unberücksichtigt.

Berechnen Sie die Gerade 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 der jeweiligen Probe zu bestimmen. In einem x-y-Diagramm entspricht die Trendlinie der Standardkurve und die entsprechende Funktion sowie der Determinationskoeffizient können im Diagramm angezeigt werden.

HINWEIS: Die Differenz der jeweiligen Einzelwerte für S1 – S4 sollte 10% nicht überschreiten.

Tabelle 2: Beispiel für die Umrechnungsschritte zur Berechnung der Standardkurve

Standard	Konzentration [IU/mL]	ln($c_{\text{IFN-}\gamma}$)	OD-Werte	OD-Mittelwert	ln(OD)
S1	4	1,386	3,051 3,114	3,0825	1,126
S2	1	0	1,036 1,085	1,0605	0,059
S3	0,25	-1,386	0,293 0,311	0,302	-1,197

Berechnung der IFN- γ -Konzentration aus den OD-Werten

Die entsprechende Funktionsgleichung der Standardkurve sollte folgende Form haben:

$$y = a \times x + b \quad (1)$$

Dabei entspricht x dem natürlichen Logarithmus der IFN- γ -Konzentration und y dem natürlichen Logarithmus der OD-Werte.

$$\ln(OD) = a \times \ln(c_{\text{IFN-}\gamma}) + b \quad (2)$$

Um mit dieser Gleichung die IFN- γ -Konzentration aus den OD-Messwerten zu berechnen muss die Gleichung entsprechend nach x beziehungsweise nach der Konzentration umgestellt werden.

$$x = e^{\frac{\ln(y)-b}{a}} \quad \text{bzw.} \quad c_{\text{IFN-}\gamma} = e^{\frac{\ln(OD)-b}{a}} \quad (3)$$

Zur quantitativen Bestimmung der IFN- γ -Menge, die von Antigen-stimulierten Blutzellen abgesondert wurde, müssen anschließend die errechneten Werten für die Röhrchen TB A **TB A** und TB B **TB B** sowie die Positiv-Kontrolle **PC** um den Wert der Negativ-Kontrolle **NC** bereinigt werden (vgl. Tabelle 3). Zur Interpretation des Tests wird ebenso der 25%-Wert der Negativ-Kontrolle benötigt.

Tabelle 3: Beispielrechnung zum Erhalt der bereinigten IFN- γ Konzentration

Probe	OD-Wert	IFN- γ -Konzentration	IFN- γ -Konzentration bereinigt
NC	0,206	0,153	
TB A	1,511	1,381	1,228
TB B	1,558	1,440	1,287
PC	1,744	1,680	1,527

Qualitätskontrolle des Testergebnisses

Der HUMAN IFN- γ ELISA enthält eine interne Kontrolle. Die Standardlösungen gelten als interne Verfahrenskontrolle. Diese bestätigen die korrekte Durchführung des Testverfahrens. Das Testergebnis hängt von der Erstellung der Standardkurve ab. Die Messwerte für die Standards und die daraus generierte Standardkurve müssen folgende Kriterien erfüllen:

- OD-Mittelwert von S1 muss $> 0,60$ sein
- CV (%) der Messwertwiederholungen für S1 und S2 muss $< 15\%$ sein
- Variation der Messwiederholungen der OD-Werte für S3 und S4 (Blindwert) $< 0,04$
- Determinationskoeffizient (R^2) für die Standardkurve $> 0,9604$ bzw. Korrelationskoeffizient (R) $> 0,98$
- OD-Mittelwert von S4 (Blindwert) dient als interne negative Verfahrenskontrolle und soll $< 0,19$ sein

Wenn diese 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 Kriterien nicht erfüllt werden.

Wenn der oben genannte Grenzwert von S4 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 sowie der Anleitung zur Fehlerbehebung und wiederholen Sie den Test mit einem neuen Mikrotiter-Streifen. Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den Hersteller oder Ihren Händler.

Interpretation der Ergebnisse

Die Daten zur Auswertung des LIOFeron® TB/LTBI ELISA werden in Tabelle 4 dargestellt. Eine schematische Vorgehensweise zur Interpretation des Testergebnis ist in Abbildung 5 gezeigt. Beachten Sie, dass von den Werten für TB A, TB B und Positiv-Kontrolle, der Wert der Negativ-Kontrolle abgezogen werden muss.

Tabelle 4: Interpretation der Testergebnisse

Ergebnis	Control -	TB A	TB B	Control +
	Negativ-Kontrolle [IU/mL]	TB A minus Negativ- Kontrolle [IU/mL]	TB B minus Negativ- Kontrolle [IU/mL]	Positiv-Kontrolle minus Negativ- Kontrolle [IU/mL]
Positiv	≤ 8,00	TB A und/oder TB B (anderes nicht relevant) ≥ 0,35 und ≥ 25% des Negativ-Kontrolle-Werts		nicht relevant
Negativ	≤ 8,00	≥ 0,35 und < 25% des Negativ-Kontrolle-Werts	≥ 0,35 und < 25% des Negativ-Kontrolle-Werts	≥ 0,50
		< 0,35	≥ 0,35 und < 25% des Negativ-Kontrolle-Werts	
		≥ 0,35 und < 25% des Negativ-Kontrolle-Werts	< 0,35	
		< 0,35	< 0,35	
Unbestimmt	≤ 8,00	≥ 0,35 und < 25% des Negativ-Kontrolle-Werts	≥ 0,35 und < 25% des Negativ-Kontrolle-Werts	< 0,50
		< 0,35	≥ 0,35 und < 25% des Negativ-Kontrolle-Werts	
		≥ 0,35 und < 25% des Negativ-Kontrolle-Werts	< 0,35	
		< 0,35	< 0,35	
	> 8,00	nicht relevant	nicht relevant	nicht relevant

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

Personen mit Negativ-Kontrolle-Werten **NC** 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.

Bei ‚Unbestimmt‘ Ergebnissen, schlagen Sie im Abschnitt „Anleitung zur Fehlerbehebung“ nach, um mögliche Ursachen zu ermitteln.

Das Ergebnis eines IGRA allein ist nicht ausreichend zur Diagnose einer TB-Infektion und sollten stets in Kombination mit dem klinischen Status der einzelnen Personen, den Ergebnissen anderer diagnostischer Tests und den epidemiologischen Hintergrundinformationen berücksichtigt werden.

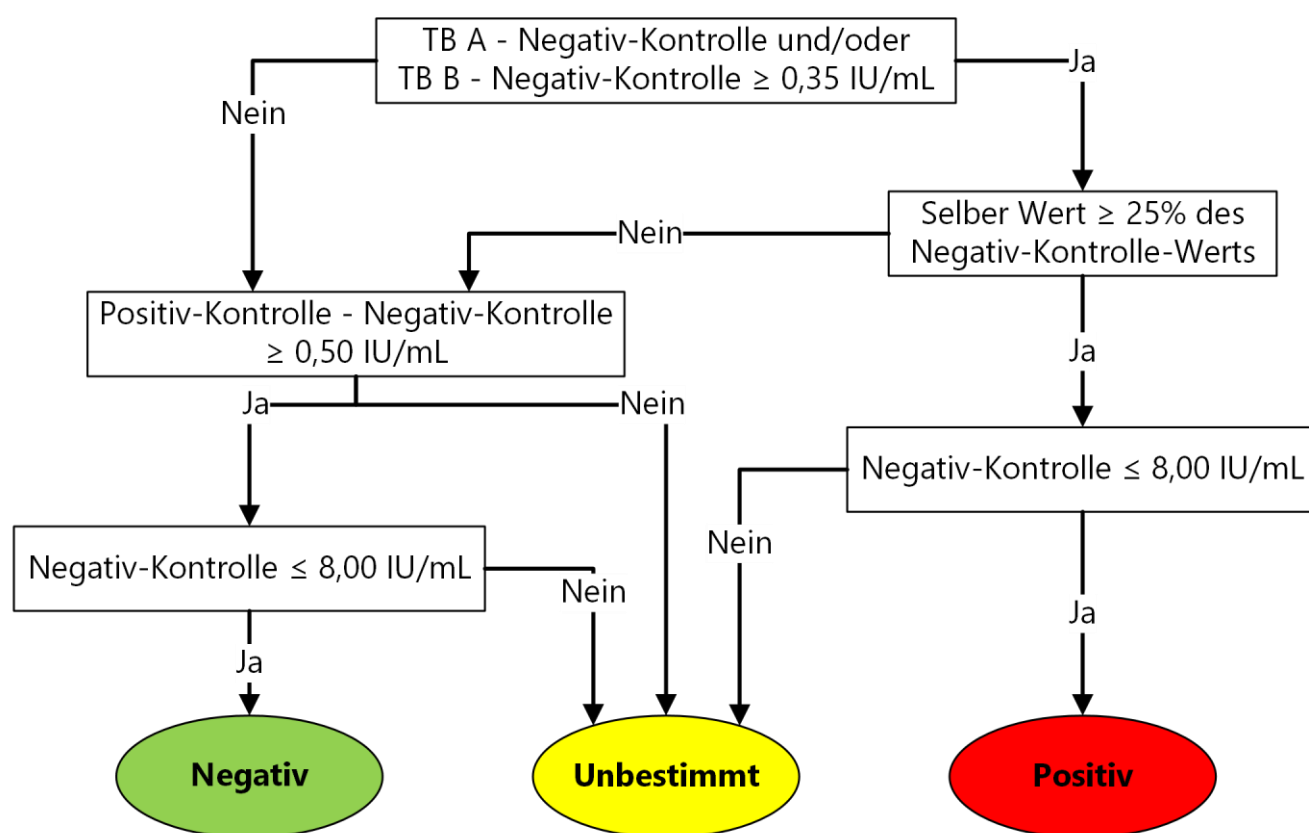


Abbildung 5: Auswertungsschema für den LIOFeron® TB/LTBI ELISA

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-heparinisiert) 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.B. 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 Ergebnissen führen. Bei IGRAs können Reversion und Konversion auftreten. Verschiedene Faktoren können Reversion beeinflussen, z.B. die Patientenmedikation. Bei wiederholter Durchführung können dynamische Veränderungen auftreten, die nicht mit dem klinischen Zustand der Patienten in Zusammenhang stehen. Diese Schwankungen, die auch bei Patienten unter Biologika-Behandlung beobachtet werden, erleichtern die Interpretation der Ergebnisse nicht. Eine sorgfältige klinische Beurteilung wird benötigt um Behandlungsentscheidungen bei Patienten, die regelmäßig IGRAs unterzogen werden, zu treffen²⁸.

Technische Information

Unbestimmte Ergebnisse

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

- Die Lagertemperaturbedingungen für Vollblut wurden 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 Stunden).
- 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 Gruppen²⁶.

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.

Interferierende Substanzen

Verwenden Sie nur frische Blutproben mit Li-Heparin als Antikoagulans. 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 potenzieller 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 Probenotypen vorkommen könnten. Die folgenden Substanzen, die in den unten genannten Konzentrationen getestet wurden, haben die Testergebnisse nicht beeinträchtigt:

Acetaminophen	20 mg/dL
Acetylsalicylsäure	20 mg/dL
Ascorbinsäure	20 mg/dL
Bilirubin	60 mg/dL
Koffein	20 mg/dL
Glucose	2000 mg/dL
Hämoglobin	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-chemische 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.

Kürzliche oder laufende 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

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

Abkürzungen: TB = Tuberkulose, NTM = nicht-tuberkulöse Mykobakterien, LTBI = latente TB

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 6) 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 ($R = 0,9824$).

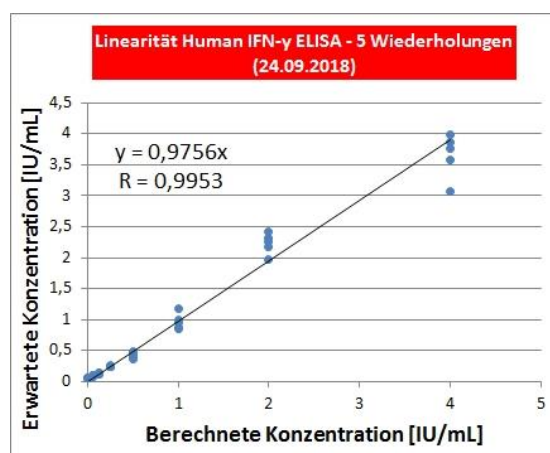


Abbildung 6: LIOFeron® TB/LTBI: Nachweis der Linearität des Assays zwischen 0 und 4 IU/mL

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 Gebrauchsanweisung 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.

Inter-Assay Variation: Bestimmt durch wiederholte Messungen von 3 Proben mit unterschiedlicher Reaktivität durch 3 verschiedene Chargen an 10 verschiedenen Tagen (negative-, schwach positive- und positive Probe). 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.

Intra-Assay Variation: Bestimmt durch wiederholte Messungen von Proben mit unterschiedlicher Reaktivität (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 (%)).

Chargenbedingte Variation: Bestimmt durch die Messung verschiedener Proben mit 3 verschiedenen Chargen. 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%.

Inter-Operator Variation: 53 Proben mit unterschiedlicher Reaktivität wurden 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%.

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.

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 μ L verdünntem WB Waschpuffer (1x) pro Well.
Verfallsdatum des Kits oder einer der Komponenten ist abgelaufen	Verwenden Sie die Kit-Komponenten vor dem Verfallsdatum. Beachten Sie die Haltbarkeit der rekonstituierten STA Standardlösung und geöffneten MTP Mikrotiterplatte (siehe „Stabilität und Lagerung“).
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. Bläulich erscheinende TMB Substratlösung 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 rekonstituierten STA Standardlösung und geöffneten MTP Mikrotiterplatte (siehe „Stabilität und Lagerung“).
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 60 Minuten. Die Inkubationszeit der CON Konjugatlösung beträgt ebenfalls 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.

Determinationskoeffizient der Standardkurve zu gering 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] Belle, 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: Antigenes 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'Elia, 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; Slietman, EJ; Dreveman, 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:10.1128/00463-06. 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] Pottumathy, 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 2024; 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'Elis. 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>
- [28] Della Bella, Chiara, et al. "Performance evaluation of the LIOFeron®_{TB/LTBI} IGRA for screening of paediatric LTBI and tuberculosis." European Journal of Pediatrics 184.2 (2025): 147

Symbole



Nur für die in-vitro Diagnostik



Konform mit der IVD-Richtlinie 98/79/EG



Globale Handelsartikelnummer



Katalognummer



Chargenbezeichnung



Hersteller



Für <x> Bestimmungen



Verfallsdatum, Verwendbar bis



Lagerung bei 2 – 8 °C



Lagerung bei 2 – 30 °C



Gebrauchsanweisung beachten



Nur für Einmalgebrauch



Nicht verwenden, wenn die äußere Packung beschädigt ist



Vor Feuchtigkeit schützen



Vor Sonnenlicht schützen



Positivkontrolle



Negativkontrolle



TB Antigen A



TB Antigen B



Mikrotiterplatte



Rekombinanter humaner IFN-γ-Standard



Detektionsantikörperlösung



Konjugatlösung



Substratlösung



Stopplösung



Waschpuffer, 10x Konzentrat



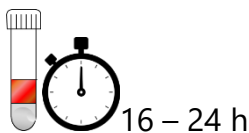
Inkubationspuffer

Kurzbeschreibung des Testverfahrens

Schritt 1 - HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES

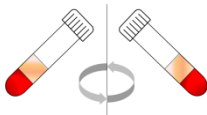


Entnahme von Vollblut aus der Vene: Unter Standard-Laborbedingungen (aseptisch, Hämolyse vermeiden) mindestens **4,5 mL** menschliches Blut mit einem **Li-Heparin**-Blutentnahmeröhrchen entnehmen.

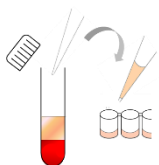


16 – 24 h

Das Li-Heparin-Blutentnahmeröhrchen mindestens 10x vorsichtig invertieren. 1 mL der Blutprobe in jedes HUMAN BLOOD STIMULATION TUBE **NC**, **TB A**, **TB B** und **PC** pipettieren und 10x vorsichtig invertieren. Stellen Sie die HUMAN BLOOD STIMULATION TUBES sofort aufrecht in einen Inkubator und inkubieren Sie diese **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.



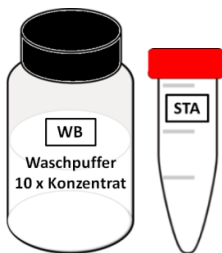
Übertragen Sie jeweils 50 µL des klaren Überstands (Humanplasma) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte und fahren mit Arbeitsschritt 5 der "HUMAN IFN-γ ELISA Testdurchführung" (Schritt 4 der Kurzbeschreibung des HUMAN IFN-γ ELISA) fort. Optional können die Proben wie in "Verwendung und Lagerung von Plasma nach der Blutstimulation" gelagert werden.

Vermeiden Sie eine Verunreinigung mit roten Blutzellen!

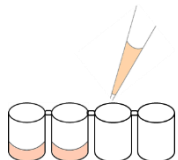
Schritt 2 - HUMAN IFN- γ ELISA



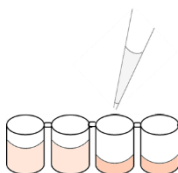
Alle Kitkomponenten auf **Raumtemperatur** (15 – 30 °C) bringen.



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** Inkubationspuffer und mischen Sie diesen durch kräftiges Schütteln (z. B. 10 Sekunden vortexen). Den rekonstituierten Standard mindestens 5 min bei RT ruhen lassen. Bereiten Sie die weiteren Standardlösungen **S1 - S4** vor (siehe Abschnitt „Vorbereitung von Reagenzien“).



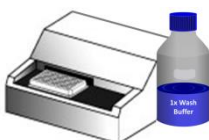
Pipettieren Sie **50 μ L** jeder Probe sowie der vorbereiteten **STA** Standardlösungen **S1 - S3** und den **IB** Inkubationspuffer als **Blindprobe (S4)** in die Wells der **MTP** Mikrotiterplatte. Gelagertes Plasma muss kurz vor Gebrauch gemischt werden. Die **Standards und der Blindwert** müssen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



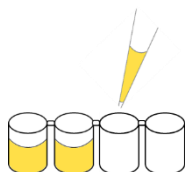
Pipettieren Sie **50 μ L** **DET Detektionsantikörperlösung** in jedes Well der **MTP** Mikrotiterplatte. Mischen Sie die Standards und Proben gründlich mit einem Mikroplattenschüttler für **60 Sekunden** bei **500 bis 1000 U/min**.



INKUBATIONSDAUER: 1 Stunde ($\pm$ 5 min) bei 15 – 30 °C



Waschen Sie die **MTP** Mikrotiterplatte **6 x** mit **400 μ L verdünntem (1 x) Waschpuffer** pro Well.



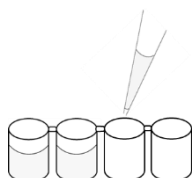
Pipettieren Sie **100 µL** **CON** **Konjugatlösung** in die Wells der **MTP** Mikrotiterplatte.



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



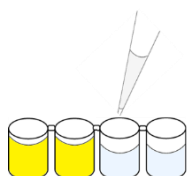
Waschen Sie die **MTP** Mikrotiterplatte **6 x** mit **400 µL verdünntem (1 x) Waschpuffer** pro Well.



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) und auch nicht für geistiges Eigentum.
2. Abgesehen von ausdrücklichen Lizenzen gewährt die LIONEX GmbH keine Garantie dafür, dass das Kit und / oder seine Verwendung (-en) nicht gegen Rechte von Dritten verstößt.
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 und die Kit-Komponenten, zurückfordern

Aktuelle Lizenzbestimmungen finden Sie unter www.lionex.de.

©2025, LIONEX GmbH, alle Rechte vorbehalten.

