



QFT-Plus 教育訓練

洪國彥 (Joe)



禾伸堂生技股份有限公司
Holy Stone Healthcare Co., Ltd.

Estimated TB incidence rates, 2021

台灣 : 30

Incidence per 100 000 population per year

0–9.9

10–49

50–99

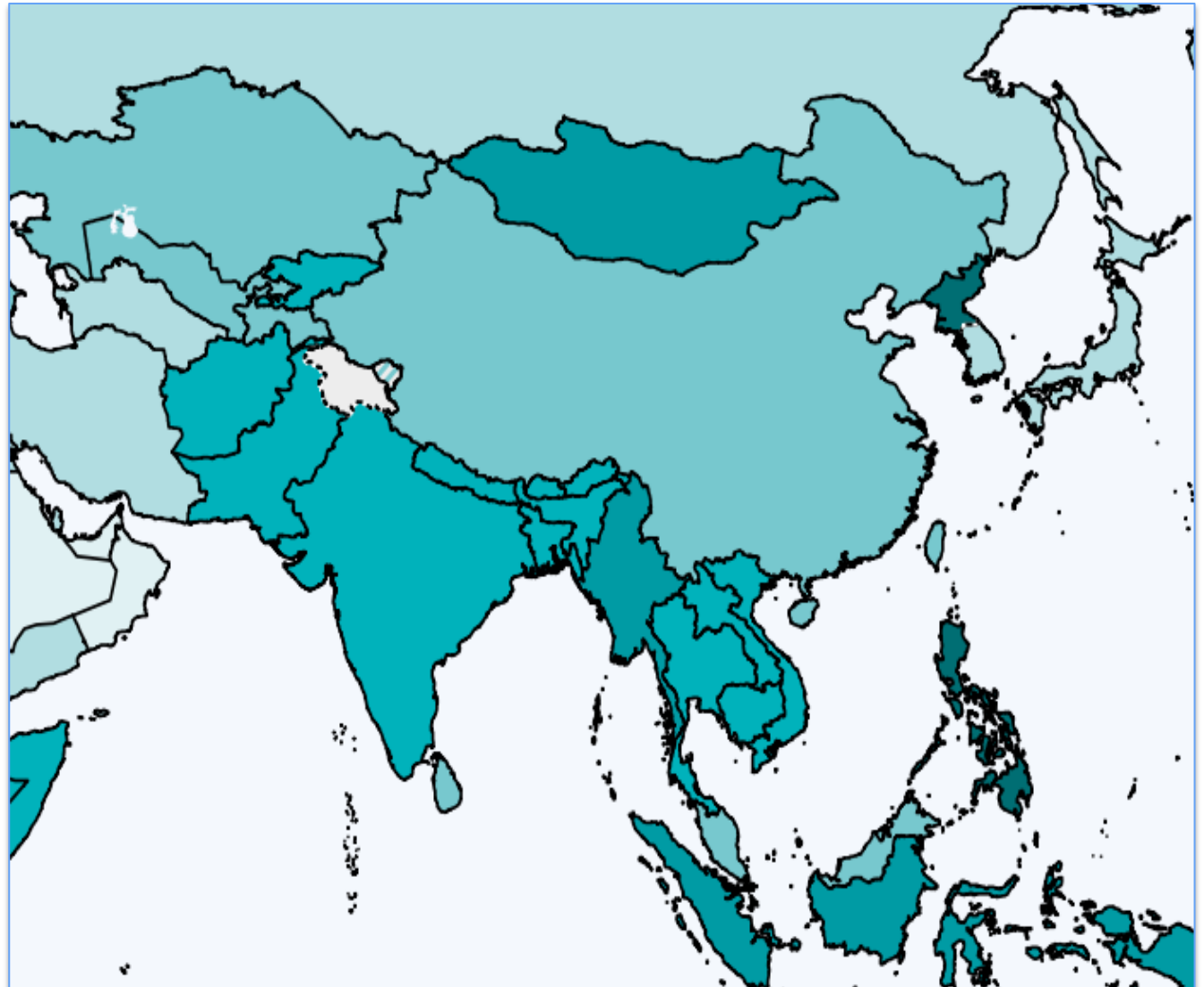
100–299

300–499

≥500

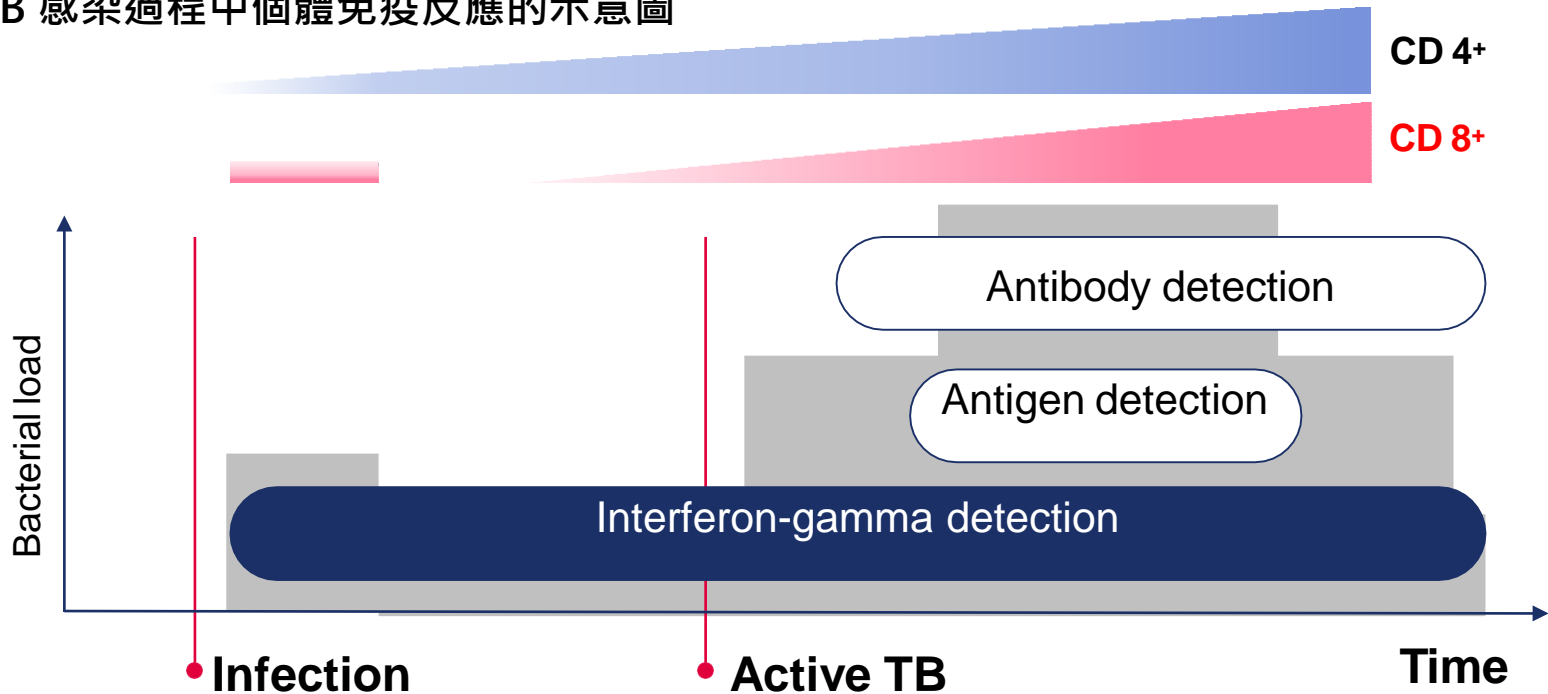
No data

Not applicable



潛伏結核感染 (LTBI)

MTB 感染過程中個體免疫反應的示意圖



Andersen P., et al., Trends Mol. Med. 2007;13:175-82

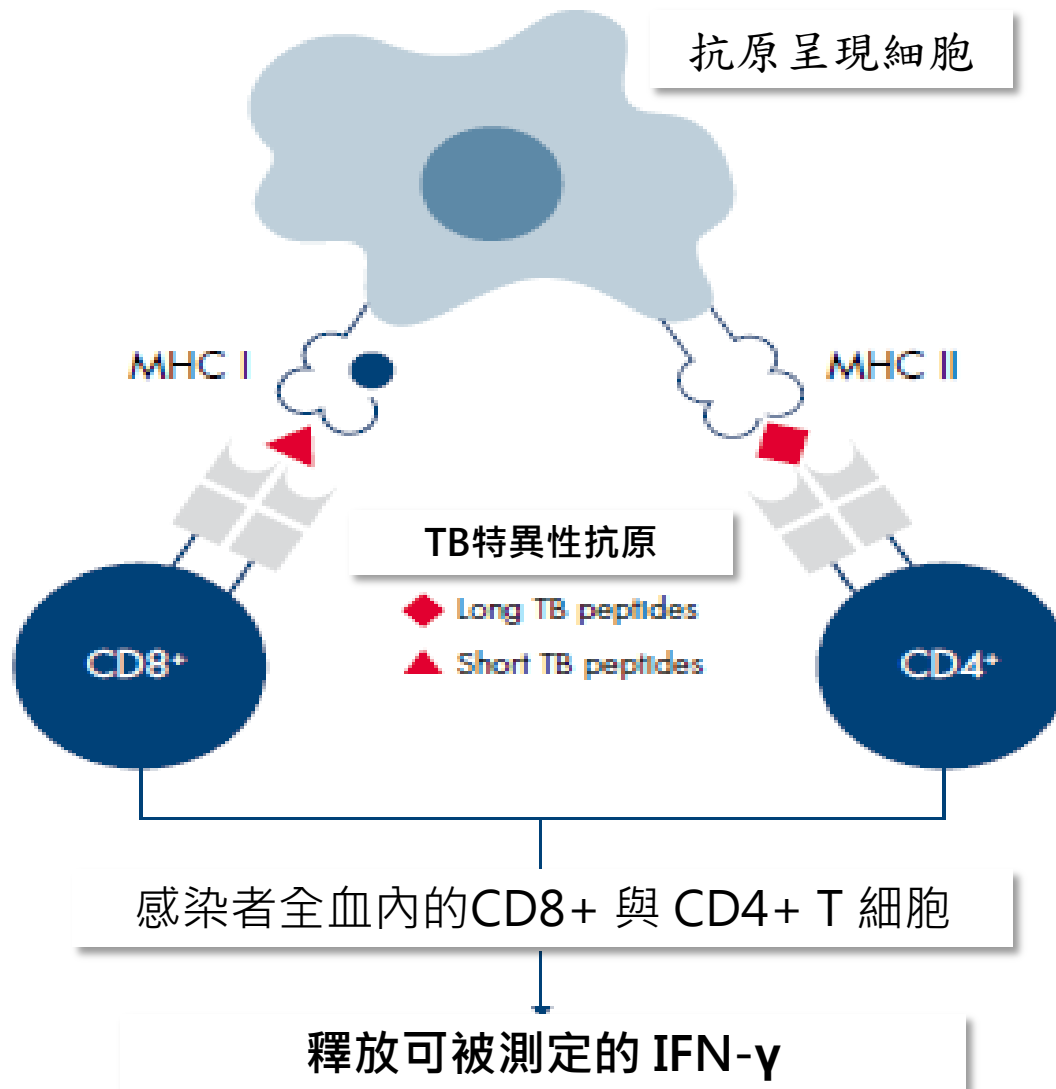
- 結核菌感染初期，大約95%的人會因自身免疫力而未發病，這種狀況稱為潛伏結核感染 (LTBI)，免疫力弱時可轉為開放性結核 (Active TB)
- 通常個體感染 MTB 後 2 週就可以測量到細胞介導免疫(CMI)反應
- 隨著體內細菌負荷的增加，MTB 特異性 CD8 T 細胞更容易被檢測到

LTBI檢驗工具：丙型干擾素釋放試驗 (IGRA)

- 曾經MTB感染的病人其T cell 與結核菌之抗原反應仍會產生丙型干擾素
- IGRA是藉由抽全血收集，並利用體外特異性結核菌抗原刺激全血中T cell 分泌丙型干擾素，並加以定量測定個體是否感染結核菌之技術



QFT原理：細胞媒介免疫反應 (CMI)



CD8 T細胞於TB免疫的角色

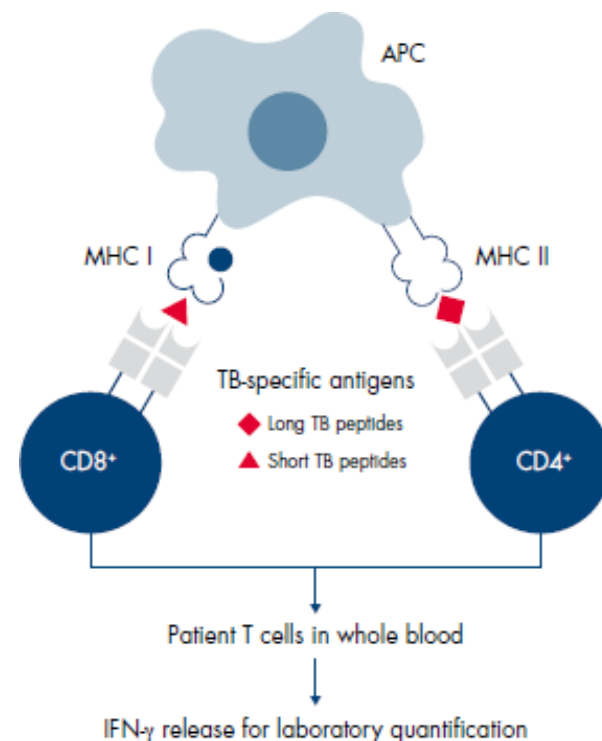
文獻發現>>

MTB-specific CD8 T 細胞分泌 IFN- γ 與其他因子有以下作用⁽¹⁻³⁾:

- 抑制結核桿菌生長
- 消滅被感染細胞
- 直接溶解胞內結核桿菌

MTB-specific CD8 T 細胞所產生IFN- γ

- 相較於LTBI，在開放性結核病患中更頻繁地被偵測到^(4,5)
- 與近期接觸TB相關⁽⁶⁾
- 在HIV 共感染與年輕孩童的TB患者上可以被偵測到^(7,8)
- 病人若進行抗結核病藥物治療，其量發現會減少⁽⁹⁾



References: 1. Turner, J. et al. (1996) *Immunology* **87**, 339. 2. Brookes, R.H. et al. (2003) *Eur. J. Immunol.* **33**, 3293. 3. Stenger, S. et al. (1998) *Science* **282**, 121. 4. Day, C.L. et al. (2011) *J. Immunol.* **187**, 2222. 5. Rozot, V. et al. (2013) *Eur. J. Immunol.* **43**, 1568. 6. Nikolova, M. et al. (2013) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **75**, 277. 7. Chiacchio, T. et al. (2014) *J. Infect.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.06.009>. 8. Lanicioni, C. et al. (2012) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 206. 9. Nyendak M. Et al. (2014) *PLoS ONE* **8**, e81564. Epub.

QFT-Plus 採血管介紹

Tube ID	Nil control	TB1 Antigen	TB2 Antigen	Mitogen control
Cells stimulated	none	CD4+ T-Cells	CD4+ & CD8+ T-Cells	All
Polypeptide Antigens		Long peptides (MHC class II) <ul style="list-style-type: none">• ESAT-6• CFP-10	Long peptides (MHC class II) <ul style="list-style-type: none">• ESAT-6• CFP-10 + Additional short peptides (MHC class I)	

檢體：離心後之血漿

- 前代QFT產品是三採血管，僅針對CD4+ T-cell的反應檢測
- QFT-PLUS則可同時檢測**CD4+ 與 CD8+ T-cell**反應，因此更靈敏。
- 用QFT-PLUS檢測可減少受試者因CD4+ T-cell數量少（如AIDS患者）或是免疫細胞活性較低（如高齡者）所導致的IGRA不確定性結果

QuantiFERON 胜肽抗原

Tuberculosis Complex	ESAT-6	CFP-10	Environmental strains	ESAT-6	CFP-10
M. tuberculosis	+	+	M. abcessus	-	-
M. africanum	+	+	M. avium	-	-
M. bovis	+	+	M. branderi	-	-
BCG substrain			M. celatum	-	-
gothenburg	-	-	M. chelonae	-	-
moreau	-	-	M. fortuitum	-	-
tice	-	-	M. gordonii	-	-
tokyo	-	-	M. intracellulare	-	-
danish	-	-	M. kansasii	+	+
glaxo	-	-	M. malmoense	-	-
montreal	-	-	M. marinum	+	+
pasteur	-	-	M. oenavense	-	-
			M. scrofulaceum	-	-
			M. smegmatis	-	-
			M. szulgai	+	+
			M. terrae	-	-
			M. vaccae	-	-
			M. xenopi	-	-

因為所有 BCG 菌株以及 *M. kansasii*、*M. szulgai* 和 *M. marinum* 以外大多數非結核性分枝桿菌(NTM)並無這些蛋白 (ESAT-6 和 CFP-10)，因此IGRA檢驗不受BCG及大多數NTM影響。

丙型干擾素釋放試驗(IGRA)試驗優點

- 全血測試，受試者僅需一次採血即可檢測
- 可陽性對照與陰性對照作為QC用途，減少人為判斷誤差
- 不受卡介苗接種影響
- 高敏感度與特異度
 - ✓ 敏感度(Sensitivity)¹：94.81%
 - ✓ 特異度(Specificity)¹：98.09%
- 2歲以上即適用丙型干擾素釋放試驗(IGRA)

QFT-Plus採血管與ELISA試劑保存

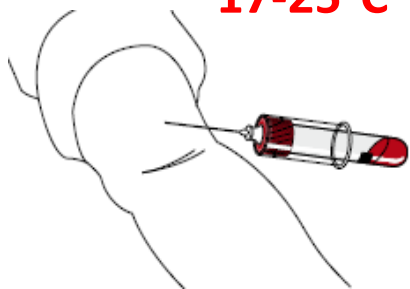
	採血管	ELISA 試劑
保存溫度	4-25°C	2-8°C
規格	4種採血管於1盒，每盒50人次	每盒 44人次
保存地點	通風良好，無日光直曬處	冰箱
效期	<ul style="list-style-type: none">管子上有標示(請隨時注意)外盒上有標示	外盒上有標示
備註	天氣炎熱時可放於冰箱中(未使用的)	收到貨後請盡速放入冰箱內保存



QFT 操作流程

採血

17-25°C



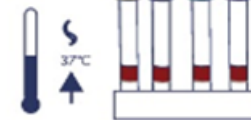
搖晃管身10次

17-27°C
0~16 hr



培養

37°C
16~24 hr

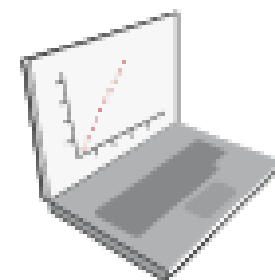
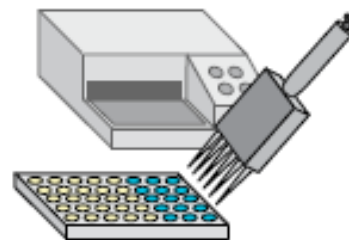
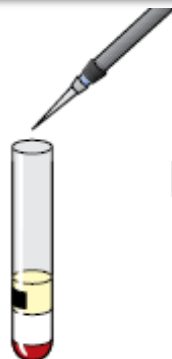
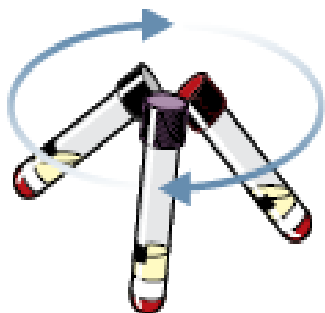


離心15分鐘

收集血漿

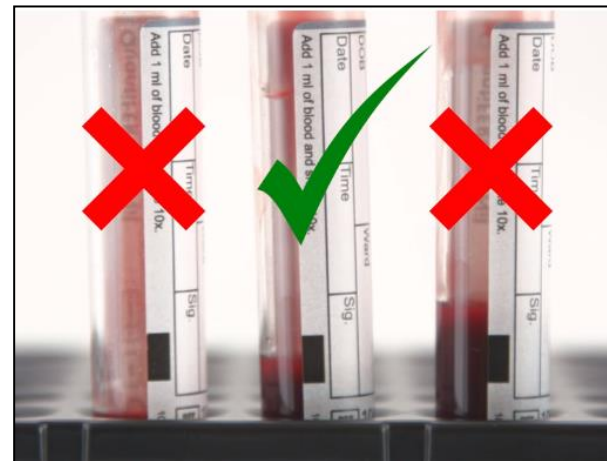
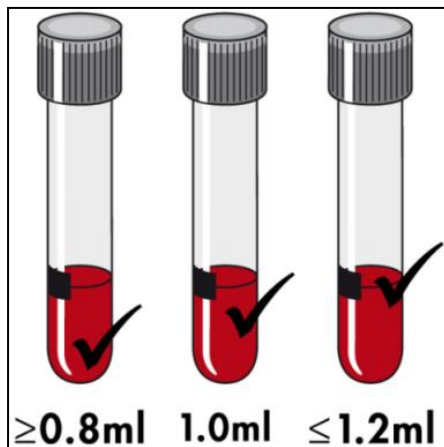
ELISA 檢測

結果分析



抽血順序與注意事項

- QFT-Plus 採血管: 灰, 綠, 黃, 紫
- 採血前若使用酒精棉球不會影響檢體
- 採血管在收集血液時, 採血管需於 17-25°C 狀態, 寒冷與炎熱天氣建議於室內空調環境內進行
- 每管收集 1mL 的全血
- 當血液已達到到管身標籤上的黑線標線上下限之間, 即為標準允收量 (0.8 至 1.2 mL)



採血-用針筒(Syringe)抽

- 空針筒，不含抗凝固劑
- 請至少拉 5 mL
- 如果無法一針抽完，請以1 mL為單位分血
- 打開蓋後，去掉針頭後，再將血液注入採血管中，鎖緊管蓋(有螺紋)
- 每管 1 mL 血液量
- 分血順序：灰，綠，黃、紫
- 不建議直接將針頭插入採血管，避免風險



採血-真空採血法

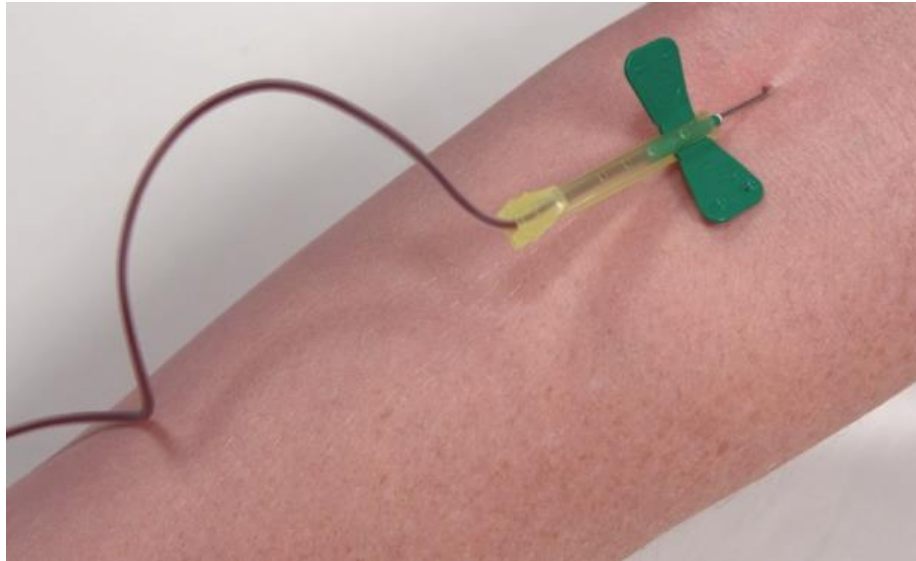


- 採血順序：灰，綠，黃、紫
- 使用 1 ml 採血管抽取血液速度較慢，採血管似乎已經接近完全填充時，將採血管保持在針頭持續 2-3 秒。這將可確保抽取足夠的血量
- 需注意避免停滯太久超過允收體積，注意血流速度。
- 若病人需同時抽取其他檢查的血液，QFT-Plus 四隻採血管可與其他抗凝血相關採血管排在一起抽。順序於前或是於後都可，只要QFT-Plus四隻採血管是排一起進行即可。

採血-蝴蝶針採血

若使用蝴蝶針採血，注意蝴蝶針管線先充滿血液，可確保接上QFT-Plus採血管後收集到足夠血量。

採血順序：灰，綠，黃、紫



需注意的檢體情形

- **凝結成塊的血漿檢體**

如果因血漿檢體長期儲存而發生纖維蛋白結塊，將檢體進行離心，讓結塊物質沉澱以利於吸取血漿。

- **脂血症的血漿檢體**

脂血症的檢體時應特別審慎注意，因為脂肪沉澱物會堵住移液吸管尖端。

4管採血完成需立即搖晃（重要步驟）

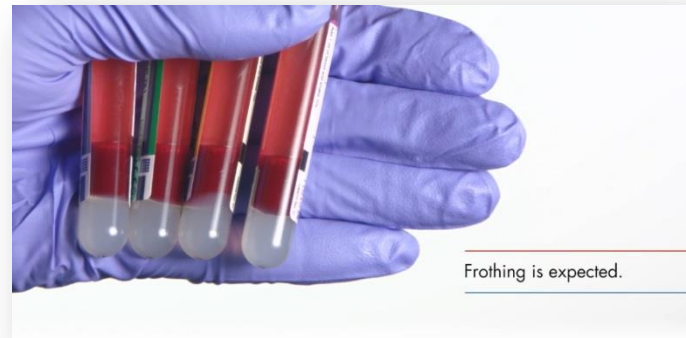
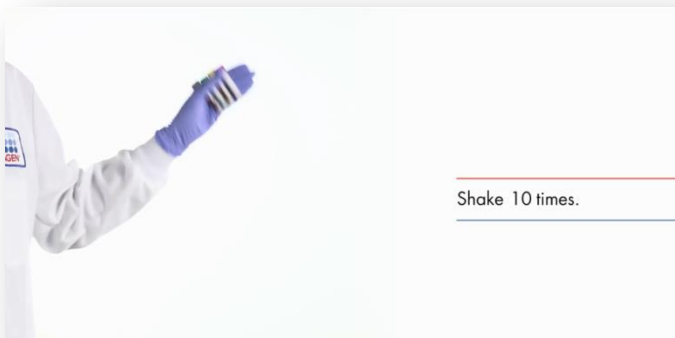
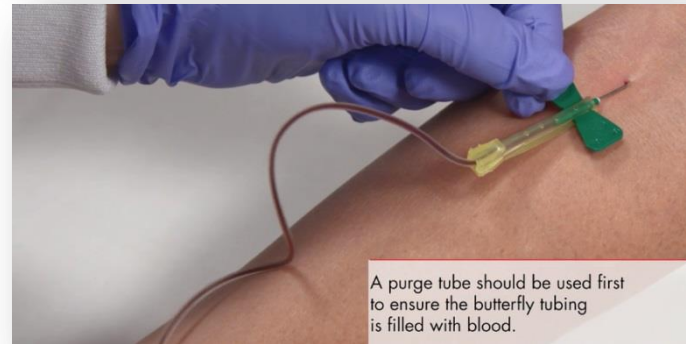
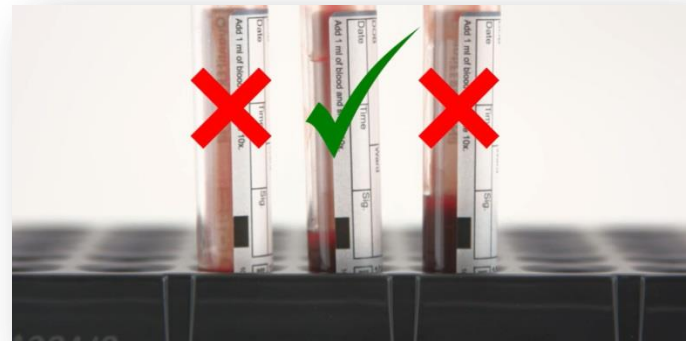
- 4管採血管一起持握，**立即**適當力度上下方向**搖晃10下**
- 為了讓管壁抗原充分溶解到全血內
- 讓血液佈滿整個採血管表面
- 搖晃後產生泡沫是正常現象
- **勿劇烈搖晃**

建議記錄血液收集的時間和日期。



點此觀賞QFT-Plus Blood Collection操作

影片截圖



未培養之含檢體採血管 保存與運送條件



17°C~27°C



最長 16 小時

勿離心



勿置冰上

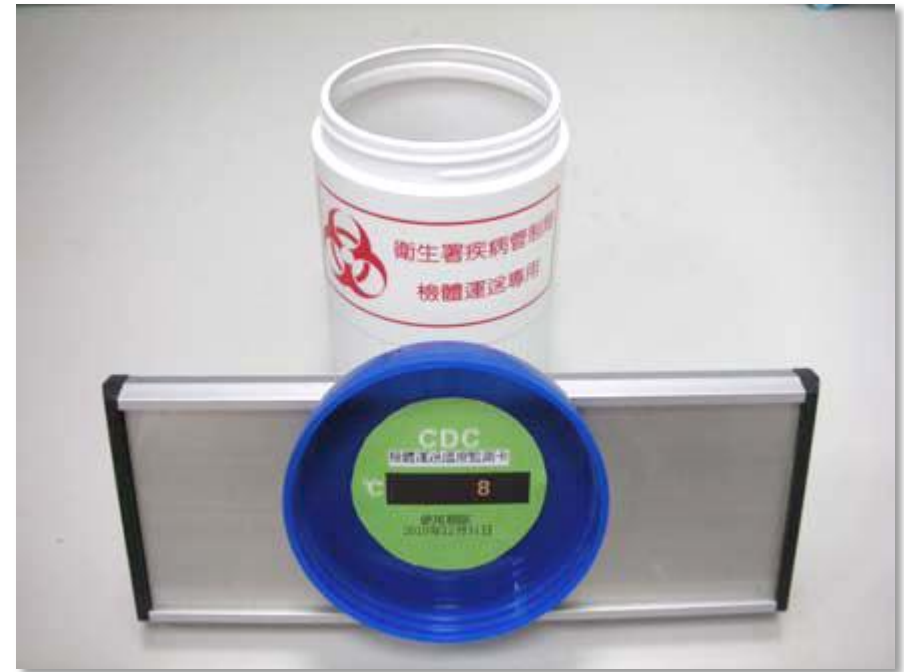


勿冷藏



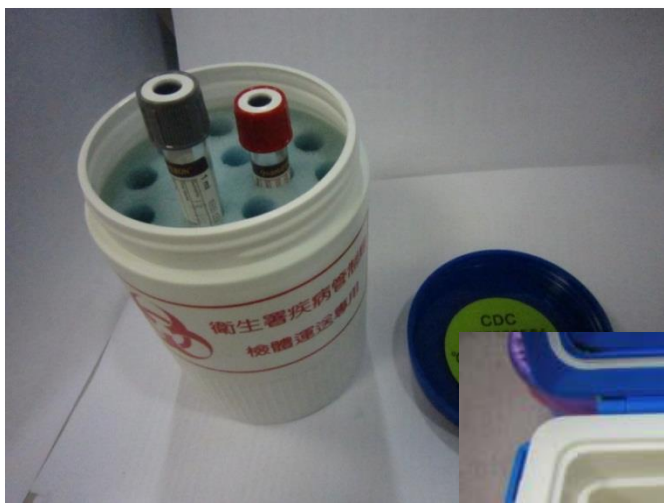
未培養檢體運送方式(1)

檢體運送箱及檢體容器，並將溫度監視片貼於檢體容器上蓋內側。



未培養檢體運送方式(2)

將檢體放入海綿檢體筒中，蓋緊檢體容器後放入檢體運送箱內。



確保未培養檢體
於17°C~27°C 運
送



- 天氣炎熱時放適當大小的冰寶控溫。
- 可先放置溫度計與冰寶一起測試，了解如何配置可使運送箱內為17°C~27°C

未培養檢體運送方式(3)

送驗單置於夾鏈袋密封，再置於檢體運送箱內

請記得標示
[已培養] 或
[尚未培養]



採血相關異常案例分享 (1)

- **採血管集血時溫度過低:** 收集全血時，採血管溫度應該處於17-25°C溫度範圍，過高與過低均會影響結果。因此請先讓採血管溫度**恢復室溫**
- **採血體積不足或是過高：** 因為管壁上披覆的抗原與1mL全血已經最佳化反應比例，採血體積不足或是過量接會影響結果正確性
- **採血後並未立即搖勻試管，** 該批受測結果觀察到很多Mitogen-Nil管數值偏低(<0.5 IU/mL)的**不確定性**

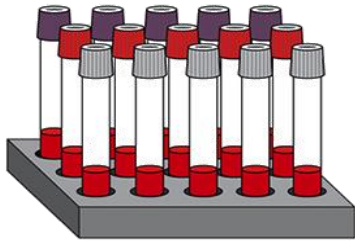
採血相關異常案例分享 (2)

- 採血後劇烈搖晃採血管身會導致採血管內膠體部分溶解，影響樣品
- 裝入採血管的血液即使還沒搖勻步驟，也**請勿互相混用**。因為溶解的抗原帶到其他管內，會影響結果正確性
- 請注意管蓋勿鎖回到不同顏色的管身，避免後續ELISA試驗樣品順序弄錯
- **採血後超過16小時才放入培養箱培養，增加不確定性比例**
- 進入培養箱前，**裝未培養檢體的採血管請勿冷藏**。否則會增加不確定性比例

檢體培養溫度&時間

- 盡快送到培養箱培養
- 37°C ; 16~24 小時

同進同出
本日16:00入
隔日12:00出



37°C



16~24 H

- 入培養箱前可再上下翻轉均勻採血管
- 直立擺放
- 靜置培養，培養時不可搖晃或滾動

培養相關異常案例分享

- 注意採血管培養時需**直立擺放**。建議不要因為空間不足橫放
- 在培養箱內需**靜止培養**，不可搖晃或是滾動培養
- 注意培養箱內的溫度是否均勻，**溫度是否已保持於37°C**
- 注意採血管的**培養時間不可超過24小時**，標準培養時間是16 ~ 24小時。超時會增加不確定性比例。

已培養檢體運送方式

同送痰方式 (4°C)

已培養檢體運送檢體運送箱內部配置建議圖)



- 離心之前，已經培養的採血管可保存在 4°C 至 27°C 之間**最多 3 天**

培養後採血管離心&採集血漿

- 以**2000-3000g RCF**離心**15分鐘**
- 離心後，僅限使用移液吸管進行採集血漿
- 採集血漿之前，請避免上下移取血漿及以任何方式混合血漿
- 如果膠體未能分開將血球與血漿分開，採血管應重新進行離心
- 血漿(上清液)可馬上用於ELISA 實驗



**2000~ 3000g (RCF)
15 min**



已培養並離心後所採集的血漿檢體保存 溫度與時間

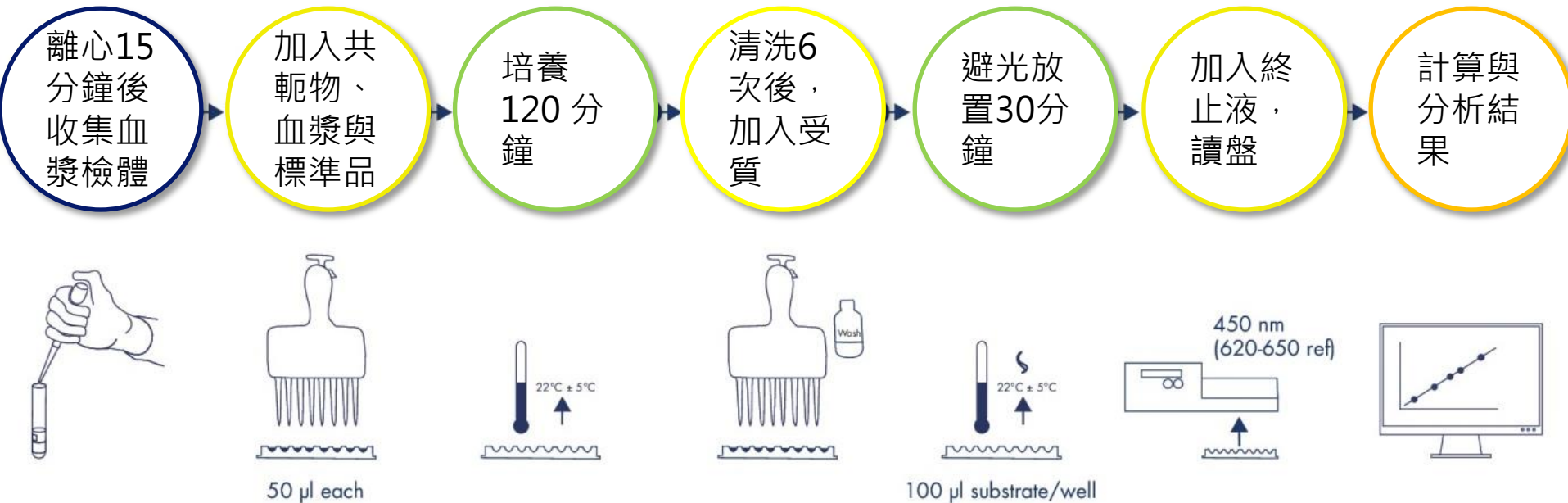
- 2°C 至 8°C 儲存最多 28 天。
- -20 °C 以下可長時間儲存 (最好低於 -70°C)
- 針對適當的檢測檢體，至少收集 150 µl 以上的血漿

ELISA試劑內容物



共軛物 100x 濃縮液以外的所有血漿檢體及試劑，使用之前必須恢復到室溫狀態

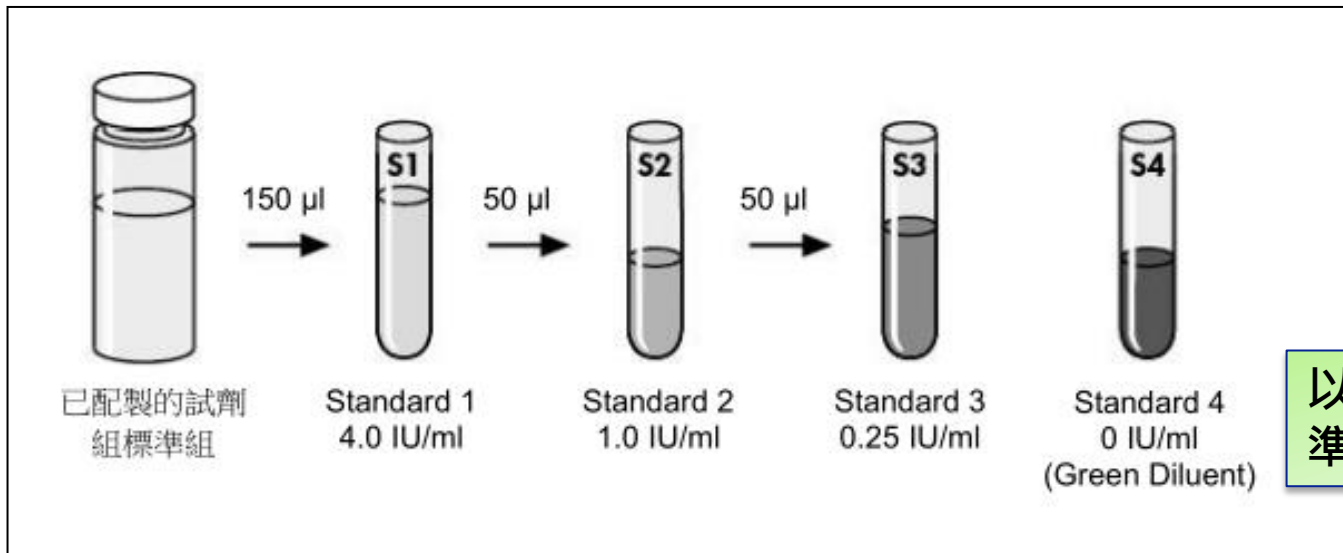
ELISA操作流程



- ✓ QFT-Plus ELISA實驗流程與第三代相同
- ✓ 人工情況下，開始一個 ELISA 微量盤到可讀盤約需 3 小時，操作時間 <1 小時
- ✓ 針對每個額外的微量盤，增加 10 至 15 分鐘

ELISA操作注意事項(1)

- 除了共軛物 100x 濃縮液以外的所有血漿檢體及試劑，**使用之前必須恢復到室溫狀態 ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)**。可回溫 60 分鐘以恢復到室溫。
- 每批號的ELISA 試劑，需參照該批標準品瓶身外標籤指示，加入指示量的去離子水或是蒸餾水來稀釋，確保完全溶解
- **每盤標準品組必須至少二重複**。每微量盤均需放入標準組二重複



以綠色稀釋液進行標準品的稀釋

ELISA操作注意事項(2)

- 尚未使用的 ELISA 微量盤條，重新密封在鋁箔袋內，並放回冷藏冰箱，其他試劑如未用到也應放回冰箱冷藏
- 已回溶的共軛物 100x 濃縮液，以**綠色稀釋液**置備操作作用的共軛物溶液

表 1：共軛物製備 (使用濃度)

微量盤條數	共軛物容量(100x 濃縮)	Green Diluent 容量
2	10 µl	1.0 ml
3	15 µl	1.5 ml
4	20 µl	2.0 ml
5	25 µl	2.5 ml
6	30 µl	3.0 ml
7	35 µl	3.5 ml
8	40 µl	4.0 ml
9	45 µl	4.5 ml
10	50 µl	5.0 ml
11	55 µl	5.5 ml
12	60 µl	6.0 ml

- 在清洗(Wash) 步驟，孔盤內每個凹槽需要400 uL的Wash buffer**清洗6次**，建議以自動化的微量盤清洗器進行。節省人力並可確保洗滌乾淨
- **注意配置後的溶液保存溫度與時間**

ELISA 試劑與溶液的儲存與時間

ELISA 溶液	儲溫	存放時間
ELISA kit	2°C - 8°C	參考盒外標籤上的效期
已回溶的試劑組標準液	2°C - 8°C	可保存最多 3 個月
已回溶的100X 濃縮共軛物	2°C - 8°C	可保存最多 3 個月
實驗操作濃度(working strength) 的共軛物	17°C - 27°C	配製 6 個小時內使用
實驗操作濃度(working strength) 的清洗緩衝液	17°C - 27°C	儲存在室溫中持續最多 2 週

ELISA 微量盤配置

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

僅可使用QFT-PLUS ELISA Kit 微量盤

紅框：標準品: S1 (Standard 1)、S2 (Standard 2)、S3 (Standard 3)、S4 (Standard 4) 每盤均需有兩組，作為標準曲線建立之用

藍框：檢體順序: Nil 管血漿、TB1管血漿、TB2管血漿、Mitogen管血漿

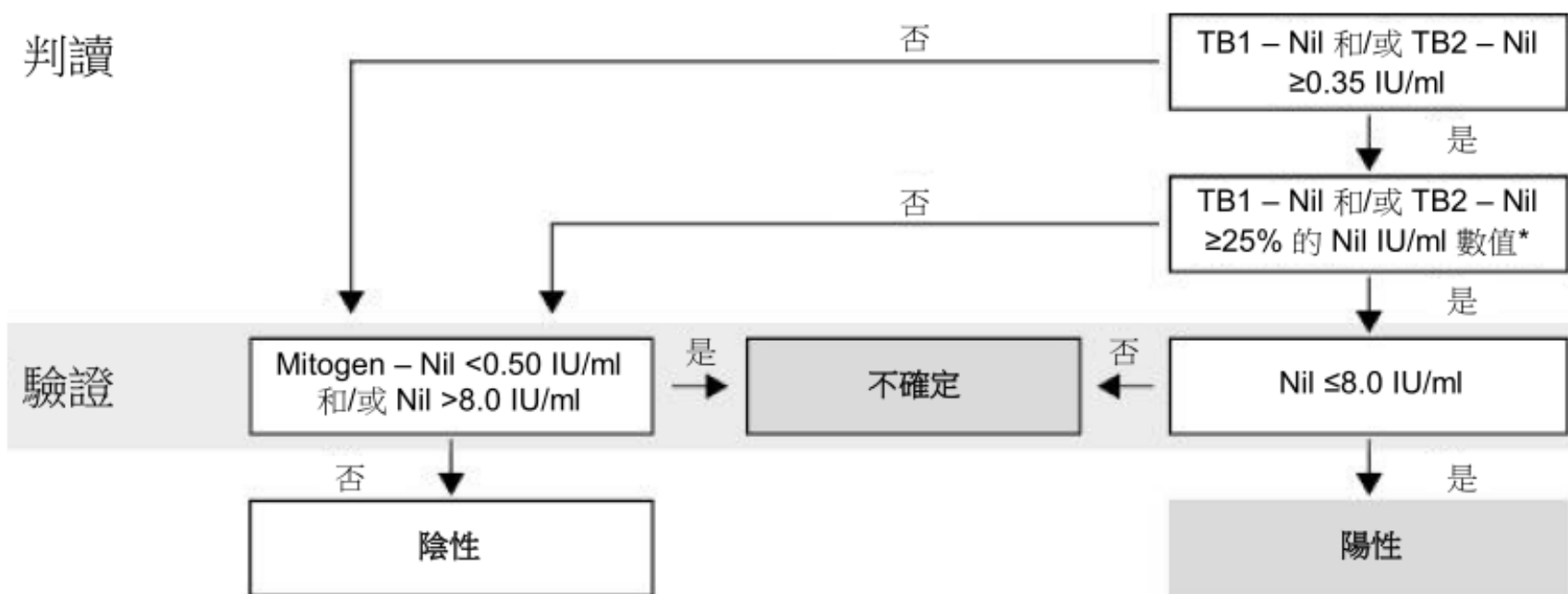
QFT-Plus 數值分析 – 判讀邏輯

- 當TB1管**或是**TB2管任一管減去Nil管的值 ≥ 0.35 IU/mL 且 TB1**或是**TB2管任一管減去Nil管的值 \geq Nil管讀值的25%；若 Nil值 ≤ 8.0 IU/mL，則檢驗結果均為陽性(positive)

表 4：QFT-Plus 檢測結果判讀

Nil (IU/ml)	TB1 減去 Nil (IU/ml)	TB2 減去 Nil (IU/ml)	Mitogen 減去 Nil (IU/ml)*	QFT-Plus 結果	報告/判讀
≤ 8.0	≥ 0.35 且 $\geq 25\%$ Nil 值	任何	任何	陽性 [†]	可能為結核分枝桿菌感染
	任何	≥ 0.35 且 $\geq 25\%$ Nil 值			
	< 0.35 或 ≥ 0.35 且 Nil 值 $< 25\%$	< 0.35 或 ≥ 0.35 且 Nil 值 $< 25\%$	≥ 0.50	陰性	不可能為結核分枝桿菌感染
	< 0.35 或 ≥ 0.35 且 $< 25\%$ Nil 值	< 0.35 或 ≥ 0.35 且 $< 25\%$ Nil 值	< 0.50	不確定 [‡]	無法判斷結核分枝桿菌感染的可能性
> 8.0 [§]	任何				

QFT-Plus 數值分析 – 判讀邏輯流程



QFT-Plus 軟體



QuantiFERON® -TB Gold Plus Results

Run Date: Monday 25 August 2014
 Operator:
 Run Number: Assay 1
 Kit Batch Number: XXXXXXXXX

Valid ELISA test run.

Results (IU/mL)								Result
Subject ID	Nil	TB1	TB2	Mitogen	TB1- Nil	TB2- Nil	Mitogen- Nil	
ID 1	0.32	0.03	0.49	> 10*	-0.29	0.17	> 10*	NEGATIVE
ID 2	0.04	0.09	0.13	> 10*	0.05	0.09	> 10*	NEGATIVE
ID 3	0.03	0.02	0.04	> 10*	-0.01	0.01	> 10*	NEGATIVE
ID 4	0.03	0.03	0.03	> 10*	0.00	0.00	> 10*	NEGATIVE
ID 5	0.21	0.03	0.02	> 10*	-0.18	-0.19	> 10*	NEGATIVE
ID 6	0.05	0.16	0.15	> 10*	0.11	0.10	> 10*	NEGATIVE
ID 7	0.04	7.69	7.14	> 10*	7.65	7.10	> 10*	POSITIVE
ID 8	0.05	0.07	0.09	> 10*	-0.01	0.01	> 10*	NEGATIVE
ID 9	0.21	0.04	0.03	> 10*	-0.17	-0.18	> 10*	NEGATIVE

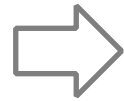
- 軟體操作方式與第三代的分析軟體完全相同
- 可以分析QFT-Plus ELISA結果，報告將以下數據呈現：

Nil, TB1, TB2, Mitogen, TB1- Nil, TB2- Nil, Mitogen- Nil, Result

判讀結果為不確定性的數值判讀

第一種:

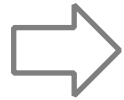
TB1-Nil 和/或 TB2-Nil **沒有**大於或是等於 **0.35 IU/ml**



Mitogen – Nil 小於 0.5 IU/ml

第二種:

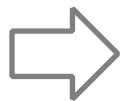
TB1-Nil 和/或 TB2-Nil **沒有**大於或是等於 **25%的Nil 數值**



Mitogen – Nil 小於 0.5 IU/ml

第三種:

不論 TB1-Nil 和/或 TB2-Nil 是什麼值



Nil > 8 IU/ml

此類為低 Mitogen 造成的不確定性。

=> 請醫師評估

此類為高 Nil 造成的不確定性。

=> 重抽

QFT 不確定結果可能原因

除前面操作原因造成，若是源自受檢測者本身身體因素如下：

- 少部分人免疫能力較弱
 - 服用Anti-TNF-alpha藥物
 - HIV病患
 - 化療的病人
- ➔ 低 Mitogen

山地鄉 Mitogen -Nil < 0.5 發生率約 2%，若有超過需注意是否有異常事件。
異常事件處理：請通報衛生局，廠商會依CDC指示到場協助評估。

- 病人體內循環IFN- γ
 - 濃度升高，可能有其他感染
 - (需是Nil、TB1、TB2、Mitogen 皆高)
- ➔ 高 Nil

註：在臨床試驗中，低於 0.25% 受試者出現 Nil > 8.0 IU/ml 的情形。
即高Nil 發生原因是源自身受測者身體因素者屬極低機率。

➤ 需要配合其他檢驗項目與病歷,由醫師評估

謝謝參加聆聽

Q & A



禾伸堂生技股份有限公司
Holy Stone Healthcare Co., Ltd.

問題諮詢窗口

洪國彥

02-87975966#276

joehung@hshc.com.tw

時間：上午9:00 ~ 下午5:00

若適逢外出有同事協助記錄問題