



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

“克肺癆®” 結核菌感染診斷試管組 QuantiFERON®-TB Gold In-Tube

【實驗室操作—常見問題集】 Frequently Asked Questions - Technical Professionals

“克肺癆®結核菌感染診斷試管組”
供體外診斷使用
使用前請務必詳閱原廠之使用說明書並遵照指示使用

禾伸堂生技股份有限公司
台北市 114 內湖區環山路 2 段 56 號 1 樓
電話：(02) 8797 5966 傳真：(02) 2627 9729



QuantiFERON®-TB Gold In-Tube: 操作 FAQs

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT) 是體外診斷試劑，使用全血檢體，協助診斷是否有感染結核菌群。QFT 的操作可分為四個步驟：

步驟一：以 QFT 採血管**採血**

步驟二：血液檢體於 37°C 進行**培養**(incubation)16-24 小時，檢體中的白血球將會產生 IFN- γ

步驟三：進行 **ELISA** 檢測血漿中的 IFN- γ

步驟四：使用 QuantiFERON®-TB Gold Analysis Software **分析資料**

步驟一：採血

Q: 採血管中的血沒有達到管壁的黑色標誌處，這樣會有影響嗎?

A: 管壁的標誌表示血量達到 1 ml，採血管經確效可抽取 0.8 - 1.2 ml 血量。如果管中血量遠低於標誌處，建議取得足夠血量。

Q: 採血後混合的步驟很重要嗎?

A: 振搖採血管的目的是讓管內的結核菌抗原能均勻分布於血液中，讓白血球吞噬與呈現(presenting)給 T 細胞，導致 IFN- γ 的分泌。因此這個步驟非常重要，混合不佳可導致抗原反應過低，得到錯誤的結果。

採血後應充分振搖採血管約十次，讓血液接觸到管內所有表面，確保血液與採血管內容物充分混合，起泡不會影響檢驗。應採取血液處理的常規預防措施。

Q: 採血管運送過程中可以放平嗎?

A: 可以，但是必須先振搖採血管。如果沒有立即培養(incubation)，在開始培養之前還要再次振搖採血管。培養時應正放，蓋朝上。

Q: 採血後到培養前，應在甚麼溫度下運送/保存採血管?

A: 請於室溫下運送/保存採血管，建議 17°C-27°C 之間。不要放入冰箱中，或置於冰塊上。

步驟二：血液培養與血漿採取

Q: 如果沒有在採血後 16 個小時內開始 37°C 培養的話?



A: 仿單內註明採血後必須在 16 個小時內開始 37°C 培養，血液檢體超過 16 個小時才開始培養可能因為細胞死亡，導致 IFN- γ 反應降低，敏感性喪失與錯誤的結果。

Q: 培養時可不可以放平採血管？

A: 不可以。採血管培養時應正放，蓋朝上置入 37°C 培養箱。

Q: 採取血漿之前是否一定要離心採血管？

A: 雖然推薦的作法是要離心幫助血漿血球分離，實際上是未經離心而採取血漿，但是應避免吸到血球。

Q: 培養完成後採血管一拿出培養箱是否要馬上離心？

A: 在培養完成後，採血管可以保存於 2°C - 27°C 中長達三天，然後再離心與採取血漿。

Q: 採血管離心之後，下面的膠狀物(gel plug)仍在原處，我要怎麼辦？

A: 在 37°C 培養後，採血管以 2000-3000 RCF (g) 離心 15 分鐘，使血球血漿分離。膠狀物應該會在離心後隔開血球血漿，如果沒有，應該以更高的速度再次離心。

Q: 血漿的顏色與正常的不同，這樣沒問題嗎？

A: 採血管中的血漿看起來會比正常的要紅，這樣是正常的。注意血漿的顏色，即使沒有紅血球參雜，可能從幾乎無色到帶有黃色到淡棕色等。有些血漿甚至是不透明的。目前並未發現這些差異對於檢驗結果有任何影響。

Q: 採取血漿時需要在第二級生物安全櫃內操作嗎？

A: 理想狀態下，所有血液相關的操作都應該在生物安全櫃內進行，來減少感染的風險(如 HIV 或 B 肝病毒)。然而，只要使用無菌技術，可以在生物安全櫃之外來採取血漿。應遵守實驗室安全規範，包含穿戴防護衣物如長袍、手套、口罩與護目鏡等。

Q: 採取血漿時應該採取多少量？很重要嗎？

A: 最少大約 100 μ l 就足夠了，因為作 ELISA 只需要 50 μ l。如果打算測兩次，大約 200 μ l 就足夠。不同人的血漿量會有變化，一般而言可以得到 300 μ l 以上的血漿。確效研究顯示血漿中的 IFN- γ 分布均勻，採取血漿的量不會有影響。

QFT 可以使用自動化系統從採血管中直接採樣血漿，避免節省人工操作。



Q: 爲了盡量節省成本，我希望每次累積到一盤的數量才進行 ELISA，採取的血漿能長久儲存嗎?

A: 採取的血漿，或者離心後的採血管中的血漿，可以保存在 4°C 達 28 天。或者 -20°C 下可放更久。血漿放在 -70°C 下比較不會結塊(纖維蛋白凝塊)。如果沒有要保存很久，建議冷藏而不要冷凍，以免發生結塊。

Q: 如果血漿在 -20°C 下保存，發生了結塊的現象，我要怎麼辦?

A: 在產品仿單中，關於血漿樣品的結塊有說明如何處理。在解凍後，如果有結塊的樣品可能要離心，讓結塊沉澱。

Q: 採取的血漿需要用 microtube 來保存嗎? 可不可保存在 ELISA plate 中?

A: 可以用 ELISA plate (uncoated) 來保存血漿，但是不管用哪一種保存，都要封口，以避免蒸發。

步驟三：人類 IFN- γ ELISA

Q: Kit standard, Conjugate 100X Concentrate, Wash Buffer 的安定性?

A: Kit standard, 配製好的 IFN- γ standard 可於 2°C -8°C 保存三個月，應標示配製日期。Standard 使用前應置於室溫下 17°C-27°C 一小時回溫後再使用。

Conjugate 100X Concentrate 配製之後應於三個月內使用，未用完應丟棄。Conjugate 100X Concentrate 與 Green Diluent 混合後的 working strength conjugate 應該在六小時內使用。未使用的 Conjugate 100X Concentrate 應該立即放回 2°C -8°C。

Working strength Wash Buffer 可於室溫下 17°C-27°C 儲存兩週。

Q: QFT 的 ELISA plate 可以在從冰箱拿出來後馬上使用嗎?

A: 不可以，應置於室溫下回溫一小時後再打開鋁箔包。

Q: 需要用自動化的 plate washer 嗎?

A: 不用，雖然推薦使用自動化的 plate washer，可以按照產品仿單的說明手動進行清洗。

Q: 做 ELISA 時清洗的過程對結果有沒有影響?

A: 如同大多數的 ELISA，不充足或不正確的清洗是 QFT 的 ELISA 步驟最常導致

禾伸堂生技股份有限公司

台北市 114 內湖區環山路 2 段 56 號 1 樓

電話：(02) 8797 5966 傳真：(02) 2627 9729



誤差的原因。如果你有這樣的問題，檢查下列：

- 如果在清洗過程起泡，表示流速需要調整(通常降低)來避免起泡。
- Wash Buffer 的量要達到每個 well 的最上端(最理想的是液體在每個 well 的上緣成凸起)
- 確定每個 well 都有足夠且一樣多的 Wash Buffer。
- 仿單建議至少有六次充分的清洗，然而可以多洗幾次而不會影響到檢驗結果。
- 建議每次清洗至少要浸 5 秒鐘。

Q: 我的結果不如預期，問題可能出在哪裡？

A: 一般 ELISA 會遇到的問題，可能的原因與適當的解決方式列於下表：

產生特定以外的顏色

可能原因	解決方式
Plate 清洗不完全	以每個 well 400 μ l wash buffer 至少清洗六次，不同的 washer 可能需要更多次。至少要浸 5 秒鐘。
不同 well 間交互污染	Pipetting 與混合樣品時應謹慎
成份過期	確保 kit 在有效期限內使用。確保配製 standard 與 Conjugate 100X Concentrate 在三個月內使用。
成份受到汙染	避免汙染

背景值偏高

可能原因	解決方式
Plate 清洗不完全	以每個 well 400 μ l wash buffer 至少清洗六次，不同的 washer 可能需要更多次。至少要浸 5 秒鐘。
配製/稀釋 conjugate 有誤	Conjugate 100X Concentrate 應以 300 ml 蒸餾水配製。Conjugate 100X Concentrate 應按照包裝所附仿單與 Green Diluent 以 1 比 100 稀釋成 Working strength Conjugate
培養溫度太高	ELISA 的培養應在室溫下(17°C-27°C)進行
成份過期	確保 standard 與 Conjugate 100X Concentrate 在配製後三個月內使用。
酵素受質 enzyme substrate 被汙染	如果 substrate 有藍色應丟棄。確保使用乾淨的試劑槽。



吸收值偏低

可能原因	解決方式
Standard 稀釋錯誤	確保 Kit Standard 按照仿單進行正確的稀釋
Pipetting 錯誤	確保 Pipetting 體積正確
wash buffer 稀釋錯誤	確保 wash buffer 濃縮液以 1 比 20 倍稀釋來準備 Working strength wash buffer
培養溫度太低	ELISA 的培養應在室溫下(17°C-27°C)進行
培養時間太短	含有 conjugate, standard, 與檢體的 plate 應培養 120 ± 5 分鐘。enzyme substrate 溶液在 plate 上培養 30 分鐘
使用了錯誤的 plate reader 濾片	Plate 應以 450 nm 讀取, reference filter 介於 620 到 650 nm 間
試劑溫度太低	所有的試劑, 除了 conjugate concentrate, 在進行分析前都要先回到室溫。大約需要一個小時。
Kit 或成份過期	確保 kit 在有效期限內使用。確保配製 standard 與 Conjugate 100X Concentrate 在三個月內使用。

Standard curve 不佳

可能原因	解決方式
Plate 清洗不完全	以每個 well 400 μ l wash buffer 至少清洗六次, 不同的 washer 可能需要更多次。至少要浸 5 秒鐘。
Standard 稀釋錯誤	確保 Kit Standard 按照仿單進行正確的稀釋

重複測試的變異性過高

可能原因	解決方式
混合不良	試劑在加到 plate 之前充分的混合, 可上下搖動或旋轉試劑的容器
Plate 清洗不完全	以每個 well 400 μ l wash buffer 至少清洗六次, 不同的 washer 可能需要更多次。至少要浸 5 秒鐘。
Pipetting 不一致或分析過程中有中斷	樣品與 standard 應以連續性加入

步驟四：資料分析

Q: 我的 Nil 控制組數值非常高, 問題可能出在哪裡?



A: 大多數情形下，從 Nil 控制組的 IFN- γ 濃度範圍預期會低於 8 IU/ml，如果 Nil 組的數值遠高於此，此結果可能有操作方面的錯誤。應考慮是否重新檢測，必要時患者的兩次血漿樣品都要檢測。如果 Nil 組結果仍然很高，而且血漿樣品也不可能有污染，那麼可以確認 Nil 組結果是有效的。每次檢測後，可以檢查所有的 Nil 組數值，確認他們是否落在/接近預期範圍。

Q: 某位患者的 TB Antigen 數值非常高，可能超過 plate reader 的偵測上限，這樣是否正常?

A: 某些人的 TB Antigen IFN- γ 濃度會高於 plate reader 的上限，這樣的情形對於測試的解釋並沒有影響，只要這些人的 Nil 數值低於 8 IU/ml。

Q: IFN- γ 的測量值是否和肺結核感染的階段/程度有直接的關聯?

A: 並沒有。只要患者的 TB Antigen 反應比 Nil 高出至少 0.35 IU/ml，而且大於或等於 Nil 數值的 1/4，就表示患者很可能有結核菌感染。對抗原的反應與感染的階段或程度、患者的免疫反應、或患者惡化為開放性疾病的可能性沒有關聯。

Q: 有沒有簡單的方式來計算與解釋 QFT 的檢測結果?

A: 仿單中提供了 QFT 檢驗的資料分析與檢測的解釋方法。QFT 的結果可以使用試算表(例如 MS Excel)之類的軟體來計算。

另外建議使用原廠提供的軟體(QuantiFERON[®]-TB Gold Analysis Software)來分析檢驗的原始資料，並計算患者 QFT 檢驗結果。QuantiFERON[®]-TB Gold Analysis Software 可以直接把 microplate reader 軟體(或者是任何試算表軟體)中的原始資料(OD 值)轉移。此軟體會進行：

- 計算標準曲線(standard curve)
- 品質管制，檢查標準曲線的重複性與曲線
- 從標準曲線計算出所有檢體的 IFN- γ 濃度
- 報告每一位患者的檢驗結果，根據 QFT 仿單中結果詮釋的原則