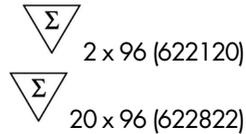


Abril 2019

# Bula do QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus (QFT<sup>®</sup>-Plus) ELISA



Versão 1

**IVD**

Para utilização em diagnóstico in vitro

Respostas do teste de medição de IFN- $\gamma$  aos antígenos péptidos de ESAT-6 e CFP-10 no sangue total



**REF**

622120, 622822



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
Alemanha

R6 **MAT**

1083163PT

# Índice

Utilização prevista .....	5
Resumo e explicação do teste .....	5
Princípios do ensaio .....	7
Tempo necessário para execução do ensaio .....	10
Componentes e armazenamento .....	11
Materiais necessários, mas não fornecidos .....	13
Armazenamento e manuseamento de amostras .....	14
Tubos de colheita de sangue .....	14
Reagentes do kit.....	14
Reagentes reconstituídos e não utilizados.....	14
Avisos e precauções .....	15
Avisos.....	15
Precauções.....	16
Colheita e manuseamento de amostras .....	19
Instruções de utilização .....	25
Etapa 1 – Incubação do sangue e colheita do plasma.....	25
Etapa 2 – IFN- $\gamma$ ELISA .....	26
Cálculos e interpretação do teste.....	31
Geração de curva padrão.....	31
Controlo de qualidade do teste.....	32
Interpretação de resultados.....	32

---

Limitações .....	35
Características de desempenho .....	36
Estudos clínicos .....	36
Características de desempenho dos ensaios .....	42
Informações técnicas .....	47
Resultados indeterminados .....	47
Amostras de plasma coaguladas .....	47
Guia de resolução de problemas .....	48
Referências .....	50
Símbolos .....	59
Informações de contacto .....	60
Procedimento abreviado do teste .....	61
Fase 1 – incubação do sangue .....	61
Etapa 2 – IFN- $\gamma$ ELISA .....	61
Alterações significativas .....	63
Histórico de revisões do documento .....	63



## Utilização prevista

O ensaio QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) é um teste de diagnóstico *in vitro* que utiliza um cocktail de péptidos, que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10 para estimular células em sangue total heparinizado. A deteção do interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizada para identificar respostas *in vitro* aos antígenos péptidos associados com a infeção por *Mycobacterium tuberculosis*.

O QFT-Plus é um teste indireto para infeção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e destina-se a utilização conjunta com a avaliação de riscos, radiografia e outras avaliações médicas e de diagnóstico.

## Resumo e explicação do teste

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por infeção por organismos do complexo *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), que tipicamente se espalham para novos hospedeiros através de núcleo de gotículas transportado por via aérea a partir de pacientes com tuberculose respiratória. Um indivíduo recém-infetado pode ficar doente com tuberculose em poucas semanas ou meses, mas a maioria dos indivíduos infetados permanece bem. A infeção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI), uma doença não infecciosa assintomática, persiste em alguns, que poderão desenvolver tuberculose meses ou anos mais tarde. O principal objetivo de diagnosticar a infeção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI) é o de considerar tratamento médico para prevenir a tuberculose. Até há pouco tempo, o teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) era o único método disponível para diagnosticar a infeção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI). A sensibilidade cutânea à tuberculina desenvolve-se entre 2 a 10 semanas após a infeção. Contudo, alguns indivíduos infetados, incluindo aqueles com uma série de patologias que prejudiquem as funções imunitárias, mas também outros que não as tenham, não respondem à tuberculina. Por outro lado, alguns indivíduos com baixa probabilidade de estarem infetados com *M. tuberculosis*

---

apresentam sensibilidade à tuberculina e denotam testes cutâneos de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) positivos após a vacinação com bacilo Calmette-Guérin (BCG), infecção com outra micobactéria que não do complexo *M. tuberculosis*, ou por outros fatores indeterminados.

Deve distinguir-se a infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI) da tuberculose, uma doença de notificação obrigatória que normalmente envolve os pulmões e o trato respiratório inferior, embora outros sistemas orgânicos também possam ser afetados. A tuberculose é diagnosticada através de resultados de historial clínico, físico, radiológico, histológico e micobacteriano.

O QFT-Plus é um teste de respostas imunitárias mediadas por células (cell-mediated immune, CMI) a antígenos péptidos que simulam proteínas micobacterianas. Estas proteínas, ESAT-6 e CFP-10, estão ausentes de todas as estirpes de BCG e da maioria das micobactérias não tuberculosas à exceção de *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1). Normalmente, os indivíduos infetados com organismos do complexo MTB possuem linfócitos no sangue que reconhecem estes e outros antígenos micobacterianos. Este processo de reconhecimento envolve a produção e secreção da citocina IFN- $\gamma$ . A deteção e subsequente quantificação de IFN- $\gamma$  constitui a base deste teste.

Os antígenos utilizados no QFT-Plus são um cocktail de péptidos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10. Vários estudos demonstram que estes antígenos péptidos estimulam a resposta de IFN- $\gamma$  nas células T de indivíduos infetados com *M. tuberculosis*, mas, normalmente não em pessoas não infetadas ou vacinadas com BCG, sem a doença ou risco de infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI) (1–32). Porém, os tratamentos médicos ou as doenças que prejudicam as funções imunitárias podem potencialmente reduzir as respostas de IFN- $\gamma$ . Os pacientes com certas infeções micobacterianas poderão também responder a ESAT-6 e CFP-10, uma vez que os genes que codificam estas proteínas estão presentes em *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1, 23). O QFT-Plus é um teste de infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI) e uma ajuda útil para diagnosticar uma infecção do complexo *M. tuberculosis* em pacientes doentes. Um resultado positivo suporta o diagnóstico de tuberculose, mas infeções

por outra micobactéria (por ex., *M. kansasii*) podem também levar a resultados positivos. São necessárias outras avaliações clínicas ou de diagnóstico para confirmar ou excluir a tuberculose.

O QFT-Plus possui dois tubos de antígeno de TB distintos: TB Antigen Tube 1 (TB1) e TB Antigen Tube 2 (TB2). Ambos os tubos contêm antígenos péptidos dos antígenos associados ao complexo MTB, ESAT-6 e CFP-10. Ao passo que o tubo TB1 contém péptidos de ESAT-6 e CFP-10 que são concebidos para induzir respostas CMI de linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup>, o tubo TB2 contém um conjunto adicional de péptidos que visam a indução de respostas imunitárias mediadas por células (Cell-Mediated Immune, CMI) de linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>. Na história natural da infecção com MTB, as células T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel fundamental no controlo imunológico através da secreção de citocina IFN- $\gamma$ . As evidências atuais suportam um papel das células T CD8<sup>+</sup> na defesa do hospedeiro contra a MTB produzindo IFN- $\gamma$  e outros fatores solúveis, que ativam macrófagos para suprimir o crescimento da MTB, destruir células infetadas ou lisar a MTB intracelular diretamente (33–35). As células CD8<sup>+</sup> específicas de MTB foram detetadas em indivíduos com infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI) e com TB ativa em que podem ser frequentemente encontradas células CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  (36–38). Além disso, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos de ESAT-6 e CFP-10 são descritos como sendo detetados mais frequentemente em indivíduos com TB ativa comparativamente a infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI) e podem estar associados a exposição recente a MTB (39–41). Foram ainda detetadas células T CD8<sup>+</sup> específicas de MTB produtoras de IFN- $\gamma$  com indivíduos com TB ativa com coinfeção por HIV (42, 43) e em crianças com tuberculose (44).

## Princípios do ensaio

O ensaio QFT-Plus utiliza tubos de colheita de sangue especializados, que são utilizados para colher sangue total. A incubação do sangue ocorre em tubos durante 16 a 24 horas, após as quais o plasma é colhido e testado para presença de IFN- $\gamma$  produzido em resposta aos antígenos péptidos.

O teste QFT-Plus é desempenhado em duas etapas. Em primeiro lugar, o sangue total é colhido para cada um dos QFT-Plus Blood Collection Tubes, que incluem um tubo Nil, um

---

tubo TB1, um tubo TB2 e um tubo Mitogen. Em alternativa, o sangue pode ser colhido num único tubo genérico de colheita de sangue contendo heparina de lítio ou sódio como anticoagulante e, em seguida, transferido para os tubos QFT-Plus.

O tubo Mitogen é utilizado com o teste QFT-Plus como um controlo positivo. Isto poderá ser importante caso existam dúvidas quanto ao estado imunitário do indivíduo. O tubo Mitogen serve também de controlo para um manuseamento e incubação corretos do sangue.

Os tubos QFT-Plus são agitados para misturar o antígeno com o sangue e devem, logo que possível, ser incubados a 37 °C no prazo de 16 horas após a colheita. Após um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é removido e a quantidade de IFN- $\gamma$  (UI/ml) é medida pelo ELISA. O QFT-Plus ELISA utiliza uma solução padrão de IFN- $\gamma$  humano recombinante, que tenha sido testada em relação a uma preparação de IFN- $\gamma$  de referência (Ref. NIH: Gxg01-902-535). Os resultados da amostra de teste são indicados em Unidades Internacionais (UI) relativamente à curva padrão preparada testando a diluição da solução padrão fornecida com o kit.

Anticorpos heterófilos (por ex., anticorpo antirrato humano) em soro ou plasma de certos indivíduos são uma causa conhecida de interferência com imunoenaios. O efeito dos anticorpos heterófilos no QFT-Plus ELISA é minimizado pela adição de soro normal de rato no Diluente verde e a utilização de fragmentos de anticorpo monoclonal F(ab')<sub>2</sub> como o anticorpo de captura do IFN- $\gamma$  no revestimento da microplaca.

Um ensaio QFT-Plus é considerado positivo para uma resposta de IFN- $\gamma$  a qualquer dos tubos de antígeno de TB que esteja significativamente acima do valor de Nil de IFN- $\gamma$  em UI/ml. A amostra de plasma do tubo Mitogen serve como um controlo positivo de IFN- $\gamma$  para cada amostra testada. Uma resposta baixa a Mitogen (< 0,5 UI/ml) indica um resultado indeterminado quando uma amostra sanguínea também tiver uma resposta negativa aos antígenos de TB. Este padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, atividade reduzida dos linfócitos devido a manuseamento inadequado da amostra, enchimento/mistura incorreta do tubo Mitogen ou incapacidade de os linfócitos do paciente gerarem IFN- $\gamma$ . Elevados níveis

---

de IFN- $\gamma$  na amostra de Nil podem ocorrer com a presença de anticorpos heterófilos ou para a secreção de IFN- $\gamma$  intrínseca. O tubo Nil ajusta-se aos efeitos de fundo (por ex., níveis excessivos de IFN- $\gamma$  circulante ou presença de anticorpos heterófilos). O nível de IFN- $\gamma$  do tubo Nil é subtraído ao nível de IFN- $\gamma$  dos tubos de antígeno de TB e do tubo Mitogen.

---

## Tempo necessário para execução do ensaio

O tempo necessário para executar o QFT-Plus ELISA é estimado em baixo, o tempo de teste de várias amostras quando em lote é também indicado:

Incubação a 37 °C de tubos de sangue: 16 a 24 horas

ELISA: Aprox. 3 horas para uma placa ELISA  
(22 indivíduos)  
< 1 hora de trabalho  
Adicionar 10 a 15 minutos para cada placa extra

## Componentes e armazenamento

Tubos de colheita de sangue*		200 tubos	Embalagem individual para paciente	Pack dispensador	200 tubos HA	Embalagem individual para paciente HA	Pack dispensador HA
Ref.º		622526	622222	622423	623526	623222	623423
Número de testes/embalagem		50	10	25	50	10	25
QuantiFERON Nil Tube (tampa cinzenta, anel branco)	Nil	50 tubos	10 tubos	25 tubos			
QuantiFERON TB1 Tube (tampa verde, anel branco)	TB1	50 tubos	10 tubos	25 tubos			
QuantiFERON TB2 Tube (tampa amarela, anel branco)	TB2	50 tubos	10 tubos	25 tubos			
QuantiFERON Mitogen Tube (tampa púrpura, anel branco)	Mitogen	50 tubos	10 tubos	25 tubos			
QuantiFERON Nil HA Tube (tampa cinzenta, anel amarelo)	Nil HA				50 tubos	10 tubos	25 tubos
QuantiFERON TB1 HA Tube (tampa verde, anel amarelo)	TB1 HA				50 tubos	10 tubos	25 tubos
QuantiFERON TB2 HA Tube (tampa amarela, anel amarelo)	TB2 HA				50 tubos	10 tubos	25 tubos
QuantiFERON Mitogen HA Tube (tampa púrpura, anel amarelo)	Mitogen HA				50 tubos	10 tubos	25 tubos
Bula dos QFT-Plus Blood Collection Tubes		1	1	1	1	1	1

\* Não estão disponíveis todas as configurações de produto em todos os países. Consulte o atendimento ao cliente da QIAGEN (detalhes em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) para mais informações acerca das configurações disponíveis para encomenda.

Componentes do ELISA† Ref.º	Kit ELISA de 2 placas 622120	Pacote de laboratório de referência 622822
Microplate Strips (Tiras de microplaca) (12 x 8 poços) revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ humano murino	2 tiras de microplaca de 96 poços	20 tiras de microplaca de 96 poços
IFN- $\gamma$ Standard (Solução padrão de IFN- $\gamma$ ) liofilizada (contém IFN- $\gamma$ humano recombinante, caseína bovina, Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)	10 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (Dilúente Verde) (contém caseína bovina, soro normal de rato, Timerosal a 0,01% p/v)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Conjugado concentrado 100x), liofilizado (HRP de anti-IFN- $\gamma$ humano murino, contém Timerosal a 0,01% p/v)	1 x 0,3 ml (quando reconstituído)	10 x 0,3 ml (quando reconstituído)
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampão de lavagem concentrado 20x) (pH 7,2, contém 0,05% v/v de ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato de enzimas) (contém H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Tetrametilbenzidina 3,3', 5,5')	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de paragem de enzimas) (contém 0,5 M de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Bula do QFT-Plus ELISA	1	1

† Consulte a página 16 para verificar as precauções e advertências de perigo.

## Materiais necessários, mas não fornecidos

- Incubadora a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}^*$ .  $\text{CO}_2$  não necessário
- Pipetas de volume calibrado variável\* para fornecimento de 10  $\mu\text{l}$  a 1000  $\mu\text{l}$  com pontas descartáveis
- Pipetas calibradas multicanal\* com capacidade para fornecer entre 50  $\mu\text{l}$  e 100  $\mu\text{l}$  com pontas descartáveis
- Tampa de placa
- Agitador de microplacas\*
- Água desionizada ou destilada, 2 litros
- Lavadora de microplacas (lavadora automatizada recomendada)
- Leitor de microplacas\* equipado com um filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 nm a 650 nm

\* Certifique-se de que os equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

---

# Armazenamento e manuseamento de amostras

## Tubos de colheita de sangue

- Armazene os tubos de colheita de sangue entre 4 °C e 25 °C.

## Reagentes do kit

- Armazene os reagentes do kit entre 2 °C e 8 °C.
- Mantenha a Solução de substrato de enzimas sempre protegida da luz solar direta.

## Reagentes reconstituídos e não utilizados

Para instruções sobre como reconstituir os reagentes, consulte a página 27.

- A solução padrão reconstituída do kit pode ser guardada durante 3 meses, se armazenada entre 2 °C e 8 °C.  
Anote a data na qual a solução padrão do kit foi reconstituída.
- Após a reconstituição, o Conjugado concentrado 100x não utilizado tem de ser novamente armazenado entre 2 °C e 8 °C e tem de ser utilizado no prazo de 3 meses.  
Anote a data em que o conjugado foi reconstituído.
- O conjugado funcional tem de ser utilizado no prazo de 6 horas após a preparação.
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado a temperatura ambiente durante 2 semanas.

# Avisos e precauções

Apenas para utilização em diagnóstico in vitro.

## Avisos

- Um resultado QFT-Plus negativo não exclui a possibilidade de infeção por *M. tuberculosis* ou de tuberculose: os falsos negativos podem ocorrer devido ao estágio da infeção (por ex., amostra obtida antes do desenvolvimento da resposta imunitária celular), comorbidade com doenças que afetam as funções imunitárias, manuseamento incorreto dos tubos de colheita de sangue após a punção venosa, execução incorreta do ensaio, ou outras variáveis imunológicas.
- Um resultado QFT-Plus positivo não deve ser a base única ou definitiva para determinar a infeção por *M. tuberculosis*. A execução incorreta do ensaio pode causar falsos positivos.
- Um resultado QFT-Plus positivo deve ser seguido por uma avaliação médica e diagnóstica mais aprofundada de tuberculose ativa (por ex., esfregaço e cultura de bacilos álcool-ácido resistentes [AFB], radiografia ao peito).
- Embora as proteínas ESAT-6 e CFP-10 estejam ausentes de todas as estirpes de BCG e da maioria das micobactérias não tuberculosas conhecidas, é possível que ocorra um resultado positivo do QFT-Plus devido à infeção por *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. Em caso de suspeita das referidas infeções, dever-se-ão aplicar métodos alternativos.

## Precauções

Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde pode procurar, visualizar e imprimir as FDS de cada kit QIAGEN e componente do kit.



**CUIDADO:** manuseie o sangue e o plasma humanos como sendo potencialmente infecciosos. Respeite as diretrizes relevantes relativas ao manuseamento de sangue e de seus produtos. Elimine as amostras e os materiais que entrem em contacto com sangue ou seus produtos em conformidade com a legislação local.

As seguintes advertências de precaução e de perigo aplicam-se aos componentes do QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA.

### Advertências de perigo



#### QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Contém: ácido sulfúrico. Aviso! Pode ser corrosivo para os metais. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

#### QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Aviso! Provoca uma ligeira irritação da pele. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.



#### QuantiFERON Green Diluent

Contém: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo)pyrazole-3-carboxylate. Contém: tartrazina. Aviso! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

#### QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Contém: mistura de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona e 2-metil-2H-isotiazole-3-ona (3:1). Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Evitar a libertação para o ambiente.

### Advertências de precaução

Pedir instruções específicas antes da utilização. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retirá-las, se tal for possível. Continuar a enxaguar. Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Consultar imediatamente um médico. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Em caso de irritação ou erupção cutânea: Consultar imediatamente um médico. Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de voltar a usar. Armazenar em local fechado à chave. Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado.

### Informações adicionais

Fichas de dados de segurança: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

- Divergências em relação à *QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA* podem produzir resultados errados. Leia as instruções cuidadosamente antes da utilização.

- Não utilize o kit se qualquer um dos frascos de reagente apresentar sinais de dano ou fuga antes da utilização.
- **Importante:** Inspeccione os frascos antes da utilização. Não utilize os frascos de conjugado ou de solução padrão de IFN- $\gamma$  que apresentem sinais de danos ou se o vedante de borracha não estiver em perfeitas condições. Não manuseie frascos partidos. Tome as precauções adequadas para eliminar os frascos em segurança. Recomendação: Utilize um dispositivo próprio para abrir os frascos de conjugado ou de solução padrão de IFN- $\gamma$ , para minimizar o risco de ferimentos com a tampa metálica.
- Não misture nem utilize as tiras de microplaca, a solução padrão de IFN- $\gamma$ , o Diluente verde ou o Conjugado concentrado 100x de diferentes lotes de kits QFT-Plus. Os outros reagentes (Concentrado 20x de tampão de lavagem, Solução de substrato de enzimas e Solução de paragem enzimática) podem ser trocados entre kits contanto que os reagentes estejam dentro do seu período de validade e que os detalhes do lote sejam registados.
- Elimine os reagentes e amostras biológicas não utilizados em conformidade com a legislação em vigor.
- Não utilize os QFT-Plus Blood Collection Tubes ou o kit ELISA após a data de validade.
- É necessário cumprir sempre os procedimentos laboratoriais corretos.
- Certifique-se de que o equipamento laboratorial foi calibrado e homologado para utilização.

# Colheita e manuseamento de amostras

O QFT-Plus utiliza os seguintes tubos de colheita:

1. Tubos QuantiFERON Nil (tampa cinzenta com anel branco)
2. Tubos QuantiFERON TB1 (tampa verde com anel branco)
3. Tubos QuantiFERON TB2 (tampa amarela com anel branco)
4. Tubos QuantiFERON Mitogen (tampa púrpura com anel branco)
5. Tubos QuantiFERON HA Nil (tampa cinzenta, anel amarelo)
6. Tubos QuantiFERON HA TB1 (tampa verde com anel amarelo)
7. Tubos QuantiFERON HA TB2 (tampa amarela com anel amarelo)
8. Tubos QuantiFERON HA Mitogen (tampa púrpura, anel amarelo)

Os antígenos foram desidratados e afixados à parede interna dos tubos de colheita de sangue, pelo que é essencial que o conteúdo dos tubos seja bem misturado com o sangue. Para sangue colhido diretamente para os tubos QFT-Plus, estes devem ser mantidos e transportados à temperatura ambiente ( $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ) e transferidos para uma incubadora a  $37\text{ °C}$  logo que possível no prazo de 16 horas após a colheita. Alternativamente, o sangue pode ser colhido para um único tubo de heparina de lítio ou sódio para efeitos de armazenamento antes da transferência para QFT-Plus e incubação. As amostras de sangue colhidas em heparina de lítio ou sódio podem ser armazenadas até 16 horas à temperatura ambiente ( $17\text{--}25\text{ °C}$ ) antes da transferência para os tubos QFT-Plus. As amostras de sangue em tubos de heparina de lítio ou sódio podem também ser armazenadas entre  $2\text{ e }8\text{ °C}$  durante um máximo de 48 horas antes da transferência para tubos QFT-Plus. Consulte a secção "Colheita de sangue para um único tubo de heparina de lítio ou sódio e, em seguida, transferência para QFT-Plus Blood Collection Tubes."

## Colher diretamente para QFT-Plus Blood Collection Tubes

### 1. Rotule os tubos adequadamente.

Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen) é identificável pelo rótulo ou por outro meio após remoção da tampa.

Recomenda-se o registo de data e hora da colheita de sangue.

### 2. Colha 1 ml de sangue por doente através de punção venosa diretamente para dentro de cada um dos QFT-Plus Blood Collection Tubes. Este procedimento deve ser efetuado por um flebotomista qualificado.

Nota importante: os tubos devem encontrar-se a uma temperatura entre 17 °C e 25 °C aquando do enchimento.

Os QFT-Plus Blood Collection Tubes padrão podem ser utilizados até uma altitude de 810 metros acima do nível do mar. Os QFT-Plus Blood Collection Tubes de altitude elevada podem ser utilizados entre uma altitude de 1020 metros acima do nível do mar até uma altitude de 1875 metros acima do nível do mar.

Uma vez que os tubos de 1 ml colhem sangue relativamente devagar, mantenha o tubo na agulha durante 2 a 3 segundos após o tubo aparentar estar cheio. Isto irá garantir que é colhido o volume correto.

- A marca preta na parte lateral do tubo indica o intervalo validado de 0,8 a 1,2 ml. Se o nível de sangue em qualquer tubo estiver fora do intervalo da marca indicadora, deve ser obtida uma nova amostra sanguínea. O enchimento insuficiente ou excessivo dos tubos fora do intervalo de 0,8 a 1,2 ml poderá originar resultados errados.
- Se for utilizada uma agulha escalpe para colher sangue, deve ser utilizado um tubo de "purga" para garantir que a tubagem é enchida com sangue antes da utilização dos tubos QFT-Plus.
- Se utilizar QFT-Plus Blood Collection Tubes a uma altitude superior a 810 metros, ou se ocorrer um baixo volume de colheita de sangue, os utilizadores podem colher sangue com uma seringa e transferir imediatamente 1 ml para cada um dos 4 tubos. Por razões de segurança, recomenda-se que

este procedimento seja executado removendo a agulha da seringa, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo as tampas dos 4 tubos QFT-Plus e adicionando 1 ml de sangue a cada tubo (até ao centro da marca preta na parte lateral do rótulo do tubo). Volte a colocar as tampas em segurança e misture conforme descrito em baixo. Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen) é identificável pelo rótulo ou por outro meio após remoção da tampa.

3. Agite os tubos dez (10) vezes imediatamente após os encher de forma a garantir que toda a superfície interna do tubo fica revestida de sangue. Este procedimento dissolverá os antigénios da parede do tubo.

Nota importante: os tubos devem encontrar-se a uma temperatura entre 17 °C e 25 °C aquando da agitação. Uma agitação demasiado vigorosa poderá causar rutura do gel e levar a resultados anómalos.

4. Após a etiquetagem, o enchimento e a agitação, os tubos devem, logo que possível, ser transferidos para uma incubadora a 37 °C ± 1 °C e no prazo de 16 horas após a colheita. Antes da incubação, conserve e transporte os tubos à temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C). Se os tubos QFT-Plus não forem incubados a 37 °C imediatamente após a colheita de sangue e agitação, inverta os tubos para misturar 10 vezes antes da incubação a 37 °C.
5. Incube os tubos QFT-Plus na VERTICAL a 37 °C ± 1 °C durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO<sub>2</sub> nem de humidificação.

Colheita de sangue para um único tubo de heparina de lítio ou sódio e, em seguida, transferência para QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. O sangue pode ser colhido num único tubo de colheita de sangue contendo heparina de lítio ou sódio como anticoagulante e, em seguida, transferido para QFT-Plus Blood Collection Tubes. Utilize apenas heparina de lítio ou sódio como anticoagulante sanguíneo, uma vez que os outros anticoagulantes interferem com o ensaio. Rotule os tubos adequadamente.

Recomenda-se rotular o tubo com a mesma data e hora da colheita de sangue.

Importante: os tubos de colheita de sangue devem estar à temperatura ambiente (17–25 °C) aquando da colheita.

2. Encha um tubo de colheita de sangue com heparina de lítio ou sódio (volume mínimo de 5 ml) e misture cuidadosamente invertendo o tubo várias vezes para dissolver a heparina. Este procedimento deve ser efetuado por um flebotomista qualificado.
3. Opções de tempo e temperatura em espera para tubos de heparina de lítio ou sódio antes da transferência e incubação em QFT-Plus Blood Collection Tubes (consulte as Figuras 1–3 Opções de colheita de sangue).

Opção 1 – Armazenamento e manuseamento à temperatura ambiente de tubos de heparina de lítio ou sódio A colheita de sangue em tubos de heparina de lítio ou sódio deve ser mantida à temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C) durante 16 horas no máximo a partir do momento da colheita e antes da transferência para QFT-Plus Blood Collection Tubes e posterior incubação.

Opção 2 – Armazenamento e manuseamento refrigerado de tubos de heparina de lítio ou sódio

Importante: os passos processuais a–d devem ser seguidos na devida ordem.

- a. O sangue colhido em tubos de heparina de lítio ou sódio deve ser mantido à temperatura ambiente (17–25 °C) até 3 horas após a colheita de sangue.
- b. O sangue colhido em tubos de heparina de lítio ou sódio pode ser refrigerado (2–8 °C) durante 48 horas, no máximo.
- c. Após refrigeração, os tubos de heparina de lítio ou sódio devem ser estabilizados à temperatura ambiente (17–25 °C) antes da transferência para QFT-Plus Blood Collection Tubes.
- d. Os QFT-Plus Blood Collection Tubes em alíquota devem ser colocados na incubadora a 37 °C no prazo de 2 horas após a transferência do sangue.

Se os QFT-Plus Blood Collection Tubes não forem incubados a 37 °C imediatamente após a transferência para os QFT-Plus Blood Collection Tubes e agitação, inverta os tubos para

misturar 10 vezes antes da incubação a 37 °C. O tempo total desde a colheita de sangue até à incubação em QFT-Plus Blood Collection Tubes não deverá exceder 53 horas.

4. Transferência da amostra de sangue de tubos de heparina de lítio ou sódio para QFT-Plus Blood Collection Tubes:
  - a. Rotule cada QFT-Plus Blood Collection Tube adequadamente.

Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen) é identificável pelo rótulo ou por outro meio após remoção da tampa. Recomenda-se transferir a data e hora registadas da colheita de sangue de tubos de heparina de lítio ou sódio para QFT-Plus Blood Collection Tubes.
  - b. As amostras devem ser bem misturadas, invertendo-as suavemente antes de transferir para QFT-Plus Blood Collection Tubes.
  - c. A transferência deve ser executada em condições assépticas, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo as tampas dos 4 QFT-Plus Blood Collection Tubes e adicionando 1 ml de sangue a cada tubo. Volte a colocar as tampas dos tubos em segurança e misture conforme descrito em baixo. Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen) é identificável pelo rótulo ou por outro meio após remoção da tampa.
5. Misture os tubos. Imediatamente depois de encher os QFT-Plus Blood Collection Tubes, agite-os dez (10) vezes com força suficiente para garantir que toda a superfície interna do tubo fica revestida de sangue. Este procedimento dissolverá os antigénios da parede do tubo. Uma agitação demasiado vigorosa poderá causar rutura do gel e levar a resultados anómalos.
6. Após a etiquetagem, o enchimento e a agitação, os tubos devem ser transferidos para uma incubadora a 37 °C ± 1 °C no prazo de 2 horas. Se os QFT-Plus Blood Collection Tubes não forem incubados a 37 °C imediatamente após a colheita de sangue e agitação, inverta os tubos para misturar 10 vezes (10x) antes da incubação a 37 °C (consulte as Figuras 1–3, na página seguinte, para obter as opções de colheita de sangue).
7. Incube os QFT-Plus Blood Collection Tubes na VERTICAL a 37 °C ± 1 °C durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO<sub>2</sub> nem de humidificação.

Colher para QFT-Plus Blood Collection Tubes e manter à temperatura ambiente.

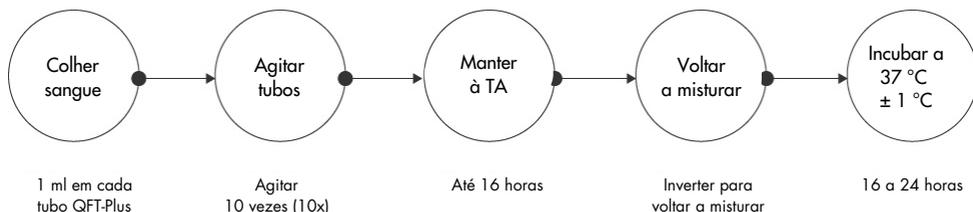


Figura 1. Opção de colheita de sangue: colher diretamente para QFT-Plus Blood Collection Tubes e manter à temperatura ambiente.

O tempo total de colheita de sangue em QFT-Plus Blood Collection Tubes para incubação a 37 °C não deverá exceder 16 horas.

Colher para tubos de heparina de lítio ou sódio e manter à temperatura ambiente.

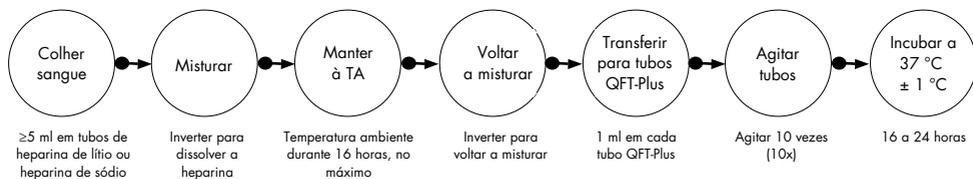


Figura 2. Opção de colheita de sangue: Colher para tubos de heparina de lítio ou sódio e manter à temperatura ambiente.

O tempo total de colheita de sangue em tubos de heparina de lítio ou sódio para incubação a 37 °C não deverá exceder 16 horas.

Colher para tubos de heparina de lítio ou sódio e manter a 2–8 °C.

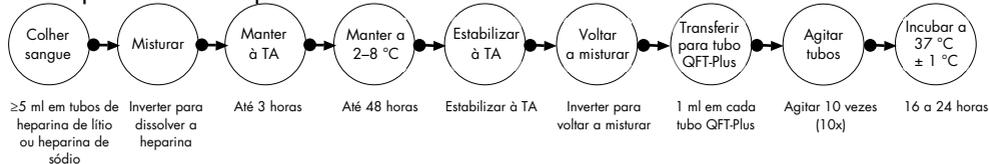


Figura 3. Opção de colheita de sangue: Colher para tubo de heparina de lítio ou sódio e manter a 2–8 °C.

O tempo total de colheita de sangue em tubos de heparina de lítio ou sódio para incubação a 37 °C não deverá exceder 53 horas.

# Instruções de utilização

## Etapa 1 – Incubação do sangue e colheita do plasma

### Materiais fornecidos

- QFT-Plus Blood Collection Tubes (consulte a Secção 3)

### Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Consulte a Secção 3

### Procedimento

1. Se o sangue não for incubado imediatamente após a colheita, é necessário efetuar uma nova mistura dos tubos, invertendo-os 10 vezes, antes da incubação.
2. Incube os tubos na VERTICAL a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO<sub>2</sub> nem de humidificação.
3. Após a incubação a  $37\text{ °C}$ , os tubos de colheita de sangue poderão ser mantidos entre  $4\text{ °C}$  e  $27\text{ °C}$  durante até 3 dias antes da centrifugação.
4. Após a incubação dos tubos a  $37\text{ °C}$ , a colheita é facilitada centrifugando os tubos durante 15 minutos entre 2000 a 3000 x RCF (*g*). O tampão de gel irá separar as células do plasma. Se isso não ocorrer, os tubos devem ser centrifugados novamente.

É possível colher o plasma sem centrifugação, mas são necessários cuidados adicionais para remover o plasma sem perturbar as células.

5. As amostras de plasma apenas devem ser recolhidas utilizando uma pipeta.

Nota importante: Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma, seja de que modo for, antes da colheita. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

As amostras de sangue podem ser carregadas diretamente dos tubos de colheita de sangue centrifugados para dentro da placa QFT-Plus ELISA, inclusive quando forem utilizadas as estações de trabalho automatizadas ELISA.

As amostras de plasma podem ser armazenadas durante 28 dias a uma temperatura entre 2 °C e 8 °C ou, se colhidas, inferior a -20 °C para períodos mais prolongados.

Para obter amostras de teste adequadas, colha no mínimo 150 µl de plasma.

## Etapa 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

### Materiais fornecidos

- Kit QFT-Plus ELISA (consulte a Secção 3)

### Materiais necessários, mas não fornecidos

- Consulte a Secção 3.

### Procedimento

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o Conjugado concentrado 100x, têm de ser colocados à temperatura ambiente (22 °C  $\pm$  5 °C) antes de serem utilizados. Aguarde, no mínimo, 60 minutos para alcançar o equilíbrio térmico.
2. Remova da estrutura as tiras que não sejam necessárias, sele a bolsa de folha de alumínio e volte a colocar no frigorífico para armazenar até ser necessária.

Deixe pelo menos 1 tira para as soluções padrão QFT-Plus e tiras suficientes para o número de indivíduos a testar (consulte a Figura 5). Após a utilização, conserve a estrutura para utilizar com as tiras restantes.

3. Reconstitua a solução padrão de IFN- $\gamma$  com o volume de água desionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco. Misture suavemente para minimizar a espuma e para garantir a solubilização completa. A reconstituição da solução padrão com o volume declarado produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/ml.

Nota importante: o volume de reconstituição da solução padrão do kit será diferente de lote para lote.

Utilize a solução padrão reconstituída do kit para produzir uma diluição 1 em 2 seguida de uma série de diluição 1 em 4 de IFN- $\gamma$  em Diluente verde (Green Diluent, GD) (consulte a Figura 4). S1 (Solução padrão 1) contém 4,0 UI/ml, S2 (Solução padrão 2) contém 1,0 UI/ml, S3 (Solução padrão 3) contém 0,25 UI/ml e S4 (Solução padrão 4) contém 0 UI/ml (apenas GD). As soluções padrão devem ser testadas, pelo menos, em duplicado. Prepare novas diluições da solução padrão do kit para cada sessão do ELISA.

Procedimento recomendado para soluções padrões em duplicado

Rotule os 4 tubos "S1", "S2", "S3", "S4".

Adicione 150  $\mu$ l de GD a S1, S2, S3, S4.

Adicione 150  $\mu$ l da solução padrão do kit a S1 e misturar bem.

Transfira 50  $\mu$ l de S1 para S2 e misturar bem.

Transfira 50  $\mu$ l de S2 para S3 e misturar bem.

Apenas GD serve como solução padrão zero (S4).

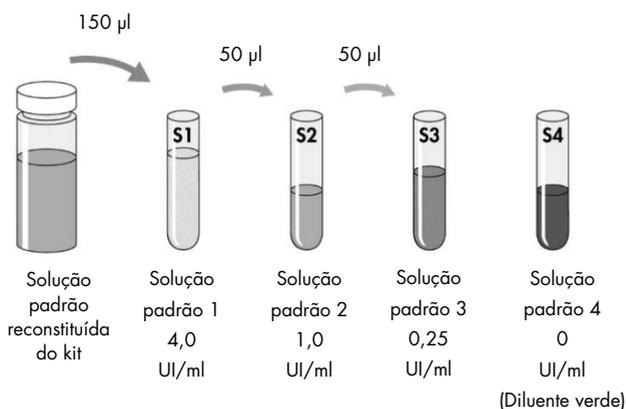


Figura 4. Preparação de curva padrão.

- Reconstitua o Conjugado concentrado 100x liofilizado com 0,3 ml de água desionizada ou destilada. Misture suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir uma total solubilização do conjugado.

O conjugado funcional é preparado diluindo a quantidade necessária de Conjugado concentrado 100x reconstituído em Diluente verde (Tabela 1. Preparação de conjugado). Volte a colocar qualquer Conjugado concentrado 100x a uma temperatura de 2 °C a 8 °C imediatamente após a utilização. Utilize apenas Diluente verde.

Tabela 1. Preparação de conjugado

Número de tiras	Volume de Conjugate 100x Concentrate	Volume de Diluente verde
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

- Relativamente às amostras de plasma colhidas dos tubos de colheita de sangue e subsequentemente armazenadas (refrigeradas ou congeladas), misture bem antes de adicionar ao poço ELISA.

Nota importante: se pretender adicionar as amostras de plasma diretamente a partir dos tubos QFT-Plus centrifugados, deve evitar misturar, de modo algum, o plasma. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

- Adicione 50 µl de conjugado funcional recém-preparado aos poços ELISA necessários utilizando uma pipeta multicanal.

7. Adicione 50 µl de amostra de plasma para teste aos poços adequados utilizando uma pipeta multicanal (consulte o esquema recomendado da placa na Figura 5). Por fim, adicione 50 µl a cada uma das soluções padrão 1 a 4.

	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

Figura 5. Esquema recomendado das amostras (22 testes por placa)

S1 (Solução padrão 1), S2 (Solução padrão 2), S3 (Solução padrão 3), S4 (Solução padrão 4)

1 N (Amostra 1. Plasma de Nil), 1 TB1 (Amostra 1. Plasma de TB1), 1 TB2 (Amostra 1. Plasma de TB2), 1 M (Amostra 1. Plasma de Mitogen)

8. Cubra cada placa e misture bem o conjugado e as amostras/soluções padrão de plasma utilizando um agitador de microplacas, durante 1 minuto. Evite salpicos.
9. Cubra cada placa e incube à temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante  $120 \pm 5$  minutos. Durante a incubação, as placas não devem estar expostas à luz solar direta.
10. Durante a incubação, dilua uma parte de Concentrado 20x de tampão de lavagem com 19 partes de água desionizada ou destilada e misture bem. É fornecido Concentrado 20x de tampão de lavagem suficiente para preparar 2 litros de tampão de lavagem funcional.

---

Lave os poços com 400 µl de tampão de lavagem funcional durante pelo menos 6 ciclos. Recomenda-se uma lavadora de placas automática.

A lavagem exaustiva é muito importante para o desempenho do ensaio. Certifique-se de que cada um dos poços está completamente cheio com tampão de lavagem até ao topo do poço em cada um dos ciclos de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo.

Deve ser adicionado desinfetante normal de laboratório ao reservatório efluente e devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.

11. Bata nas placas, viradas para baixo sobre uma toalha absorvente e com poucos fiapos, para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100 µl de Solução de substrato de enzimas a cada poço, cubra cada placa e misture bem, utilizando um agitador de microplacas.
12. Cubra cada placa e incube à temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos.  
Durante a incubação, as placas não devem estar expostas à luz solar direta.
13. Após os 30 minutos de incubação, adicione 50 µl de Solução de paragem enzimática a cada poço e misture.  
A Solução de paragem enzimática deve ser adicionada aos poços pela mesma ordem e aproximadamente à mesma velocidade que o substrato na etapa 11.
14. Meça a densidade ótica (Optical Density, OD) de cada poço no prazo de 5 minutos após a paragem da reação, utilizando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e com um filtro de referência de 620 nm a 650 nm. Os valores de densidade ótica (Optical Density, OD) são utilizados para calcular os resultados.

## Cálculos e interpretação do teste

O software de análise QFT-Plus pode ser utilizado para analisar dados não processados e para calcular resultados. Está disponível em [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Certifique-se de que é utilizada a versão mais recente do software de análise QFT-Plus.

O software executa uma avaliação de controlo de qualidade do ensaio, gera uma curva padrão, e fornece um resultado de teste para cada indivíduo, conforme detalhado na secção Interpretação de resultados.

Como alternativa à utilização do software de análise QFT-Plus, é possível determinar os resultados segundo o seguinte método.

### Geração de curva padrão

(Se o software de análise QFT-Plus não for utilizado)

Determine os valores médios de densidade ótica (Optical Density, OD) das réplicas de solução padrão de kit de cada placa.

Construa uma curva padrão de  $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ , traçando o  $\log_{(e)}$  da densidade ótica (Optical Density, OD) média (eixo Y) em função do  $\log_{(e)}$  da concentração de IFN- $\gamma$  das soluções padrão em UI/ml (eixo X), omitindo destes cálculos a solução padrão zero. Calcule a linha de correlação da curva padrão através de análise de regressão.

Utilize a curva padrão para determinar a concentração de IFN- $\gamma$  (UI/ml) de cada uma das amostras de plasma do teste, utilizando o valor de densidade ótica (Optical Density, OD) de cada amostra.

Estes cálculos podem ser efetuados utilizando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas e com o software de folha de cálculo ou estatístico (tal como o Microsoft® Excel®). Recomendamos que sejam utilizados estes pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (coefficient of variation, %CV) das soluções padrão e o coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva padrão.

## Controlo de qualidade do teste

A exatidão dos resultados de teste está dependente da geração de uma curva padrão precisa. Por conseguinte, os resultados derivados das soluções padrão devem ser examinados antes de se poder interpretar os resultados das amostras do teste.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de densidade ótica (Optical Density, OD) médio da Solução padrão 1 tem de ser  $\geq 0,600$ .
- O %CV dos valores de densidade ótica (Optical Density, OD) replicados da Solução padrão 1 e da Solução padrão 2 tem de ser  $\leq 15\%$ .
- Os valores de densidade ótica (Optical Density, OD) replicados da Solução padrão 3 e da Solução padrão 4 não podem variar mais do que 0,040 unidades de densidade ótica da respetiva média.
- O coeficiente de correlação ( $r$ ) calculado a partir dos valores médios de absorvância dos padrões tem de ser  $\geq 0,98$ .

O software de análise QFT-Plus calcula e relata estes parâmetros de controlo de qualidade.

Se os critérios acima não forem satisfeitos, a execução é inválida e tem de ser repetida.

O valor de densidade ótica (Optical Density, OD) médio da Solução padrão zero (Diluyente verde) deve ser  $\leq 0,150$ . Se o valor de densidade ótica (Optical Density, OD) médio for  $> 0,150$ , o procedimento de lavagem da placa deverá ser investigado.

## Interpretação de resultados

Os resultados de QFT-Plus são interpretados utilizando os seguintes critérios (Tabela 2):

Nota importante: diagnosticar ou excluir a tuberculose, e avaliar a probabilidade de infeção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI), requer uma combinação de resultados epidemiológicos, de historial clínico, médicos e de diagnóstico que devem ser tidos em conta ao interpretar os resultados de QFT-Plus.

Tabela 2. Interpretação dos resultados do QFT-Plus

Nil (UI/ml)	TB1 menos Nil (UI/ml)	TB2 menos Nil (UI/ml)	Mitogen menos Nil (UI/ml)*	Resultado do QFT-Plus	Relatório/Interpretação
≤ 8,0	≥ 0,35 e ≥ 25% de valor de Nil	Qualquer	Qualquer	Positivo <sup>†</sup>	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> provável
	Qualquer	≥ 0,35 e ≥ 25% de valor de Nil			
	< 0,35 ou ≥ 0,35 e < 25% de valor de Nil	< 0,35 ou ≥ 0,35 e < 25% de valor de Nil	≥ 0,5	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> IMPROVÁVEL
	< 0,35 ou ≥ 0,35 e < 25% de valor de Nil	< 0,35 ou ≥ 0,35 e < 25% de valor de Nil	< 0,5	Indeterminado <sup>‡</sup>	Não é possível determinar a probabilidade de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i>
> 8,0 <sup>§</sup>		Qualquer		Indeterminado <sup>‡</sup>	Não é possível determinar a probabilidade de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i>

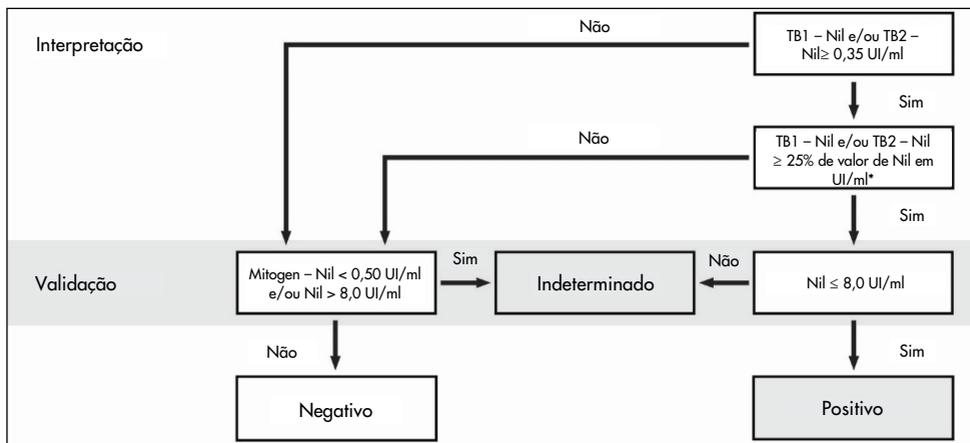
\* Respostas ao controlo positivo de Mitogen (e, ocasionalmente, de antígeno de TB) podem ficar fora do alcance do leitor de microplacas. Isto não tem qualquer impacto nos resultados do teste. Os valores > 10 ml são indicados pelo software QFT-Plus como > 10 UI/ml.

<sup>†</sup> Quando não houver suspeitas de infecção por *M. tuberculosis*, é possível confirmar resultados inicialmente positivos voltando a testar as amostras originais de plasma em duplicado no QFT-Plus ELISA. Se o teste de repetição de um ou mais duplicados for positivo, o indivíduo deve ser considerado como tendo testado positivo.

<sup>‡</sup> Consulte a secção "Resolução de problemas" para saber quais são as causas possíveis.

<sup>§</sup> Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos indivíduos possuíam níveis de IFN- $\gamma$  > 8,0 UI/ml do valor de Nil.

A magnitude do nível medido de IFN- $\gamma$  não pode ser correlacionada com o estágio ou grau de infecção, nível de capacidade de resposta imunitária ou com a probabilidade de progressão da doença ativa. Uma resposta de TB positiva em indivíduos negativos a Mitogen é rara, mas já se verificou em pacientes com TB. Isto indica que a resposta do IFN- $\gamma$  ao antígeno de TB é superior à resposta de Mitogen, o que é possível uma vez que o nível de Mitogen não estimula ao máximo a produção IFN- $\gamma$  por linfócitos.



\* Para que TB1 menos Nil ou TB2 menos Nil seja válido, a quantidade  $\geq 25\%$  do valor de UI/ml de Nil deve ser proveniente do mesmo tubo que o resultado  $\geq 0,35$  UI/ml original.

Figura 6. Fluxograma interpretativo do QFT-Plus

---

## Limitações

Os resultados dos testes QFT-Plus têm de ser utilizados em conjunto com o historial epidemiológico, o estado clínico atual e outras avaliações de diagnóstico de cada um dos indivíduos.

Os indivíduos com valores de Nil superiores a 8,0 UI/ml são classificados como "indeterminados", uma vez que uma resposta 25% mais elevada aos antígenos de TB pode ficar fora do intervalo de medição do ensaio.

Poderão ocorrer resultados não fiáveis ou indeterminados devido a:

- Desvios do procedimento descrito na presente bula
- Níveis excessivos de IFN- $\gamma$  em circulação ou presença de anticorpos heterófilos
- Mais de 16 horas entre a colheita da amostra de sangue e a incubação a 37 °C. Isto não é aplicável para utilizações do fluxo de trabalho de tubos de heparina de lítio ou sódio a 2–8 °C.

# Características de desempenho

## Estudos clínicos

Uma vez que não existe um teste padrão definitivo de infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI), não é possível avaliar, na prática, uma estimativa de sensibilidade e especificidade do QFT-Plus. A especificidade do QFT-Plus foi calculada de forma aproximada, avaliando as taxas de falsos positivos nas pessoas com baixo risco (sem fatores de risco conhecidos) de infecção por tuberculose. A sensibilidade foi calculada de forma aproximada, avaliando os grupos de pacientes com TB ativa confirmada por cultura.

### Especificidade

Foi concluído um estudo avaliativo da especificação do QFT-Plus em 409 indivíduos. As informações demográficas e os fatores de risco de exposição a TB foram determinados utilizando um inquérito padronizado aquando do teste.

Num resumo dos resultados dos 2 grupos de pacientes com baixo risco (sem fatores de risco conhecidos) de infecção com tuberculose, a especificidade geral do QFT-Plus foi de 97,6% (399/409) (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 3. Resultados do estudo de especificidade do QFT-Plus por local de estudo

Estudo	Positivo	Negativo	Indeterminado	Especificidade (IC de 95%)
Japão	4	203	0	98% (95–100%)
Austrália	6	196	0	97% (94–99%)

Tabela 4. Resultados do estudo de especificidade do QFT-Plus por tubo de antígeno de TB

Estudo	TB1	TB2	QFT-Plus
Positivo	5	10	10
Negativo	404	399	399
Indeterminado	0	0	0
Especificidade (IC de 95%)	98,8% (97,2–99,6)	97,6% (95,6–98,8)	97,6% (95,6–98,8)

## Sensibilidade de TB ativa

Embora não exista um teste padrão definitivo para a infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI), um substituto adequado é a cultura microbiológica de *M. tuberculosis*, uma vez que os pacientes com a doença estão, por definição, infetados. Os casos com suspeitas de TB de 4 locais de estudo na Austrália e Japão, que mais tarde se confirmou por cultura estarem infetados com *M. tuberculosis*, foram testados para avaliar a sensibilidade do QFT-Plus (Tabela 5 e Tabela 6). Os pacientes receberam menos de 14 dias de tratamento antes da colheita de sangue para o teste QFT-Plus.

Num resumo dos resultados dos 4 grupos de pacientes com cultura positiva de *M. tuberculosis*, a sensibilidade geral do QFT-Plus relativamente à TB foi de 95,3% (164/172). Nos 4 grupos, 159 pacientes revelaram-se positivos nos tubos TB1 e TB2, 1 paciente revelou-se positivo apenas no tubo TB1 e 4 apenas no tubo TB2. Um total de 1,1% (2/174) dos resultados foi indeterminado. O resultado de TB2 identificou corretamente 1 paciente confirmado por cultura que teria tido resultado negativo (Mitogen baixo) se apenas testado com TB1 (consulte a Tabela 5 e Tabela 6).

Tabela 5. Resultados do estudo de sensibilidade do QFT-Plus por local de estudo

Locais de estudo	Positivo	Negativo	Indeterminado	Sensibilidade de QFT-Plus* (IC de 95%)
Local 1 do Japão	36	7	0	84% (69–93)
Local 2 do Japão	53	1	2	98% (90–100)
Local 3 do Japão	54	0	0	100% (93–100)
Local da Austrália	21	0	0	100% (84–100)

\* A sensibilidade baseia-se no número total de testes válidos, excluindo os resultados indeterminados.

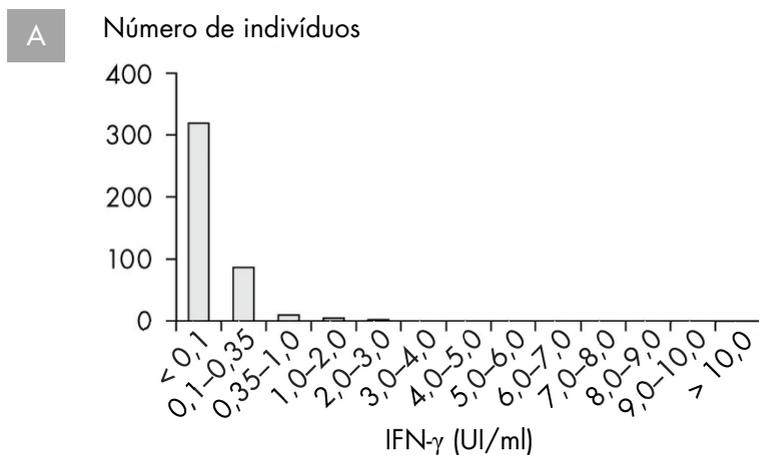
Tabela 6. Resultados do estudo de sensibilidade do QFT-Plus por tubo de antígeno de TB

	TB1	TB2	QFT-Plus
Positivo	160	163	164
Negativo	11	9	8
Indeterminado	3	2	2
Sensibilidade† (IC de 95%)	93,6% (88,8–96,7)	94,8% (90,3–97,6)	95,3% (90,9–97,9)

\* A sensibilidade baseia-se no número total de testes válidos, excluindo os resultados indeterminados.

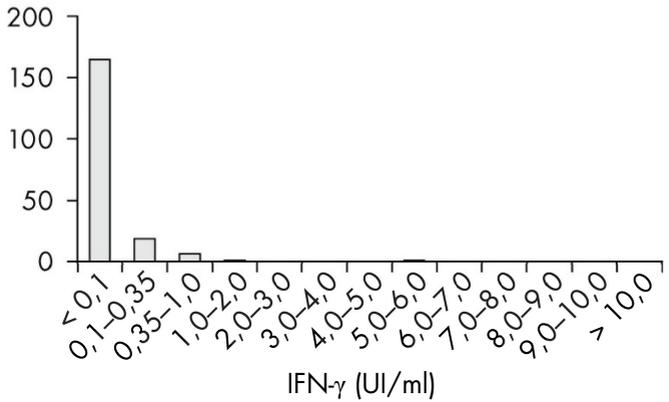
### Distribuições de respostas observadas – estratificadas por risco

Observou-se uma gama de respostas de IFN- $\gamma$  aos tubos TB1, TB2 e de controlo em ensaios clínicos, sendo as mesmas estratificadas por risco de infeção com *M. tuberculosis* (Figuras 7-9). O grupo de risco misto consiste em indivíduos representativos de uma população de teste geral, incluindo indivíduos com e sem fatores de risco de exposição a TB, em que presença de tuberculose ativa é improvável (ou seja, infeção tuberculosa latente [latent tuberculosis infection, LTBI]).



**B**

Número de indivíduos



**C**

Número de indivíduos

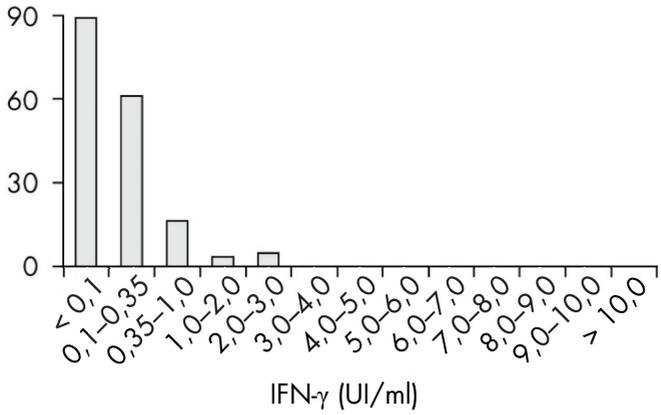


Figura 7. Distribuição de Nil. **A.** Distribuição de valores de Nil em população de baixo risco (n = 409). **B.** Distribuição de valores de Nil em população de risco misto (n = 194). **C.** Distribuição de valores de Nil em população com infecção com *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n=174).

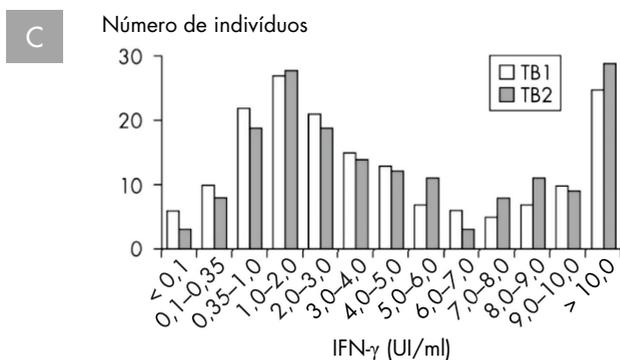
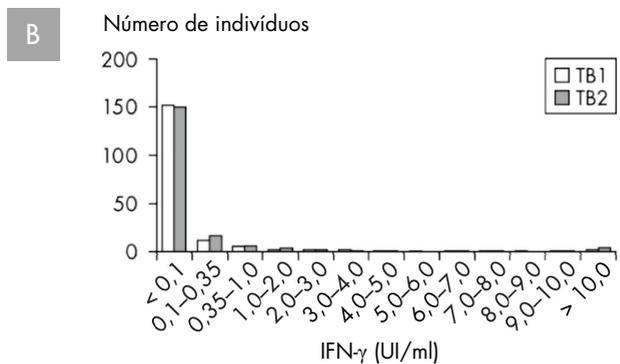
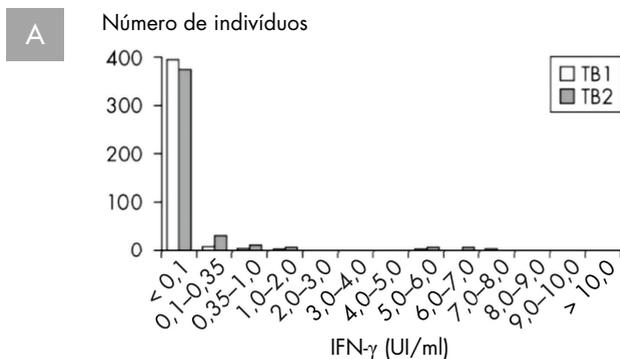


Figura 8. Distribuição de TB1 e TB2 (Nil subtraído). **A.** Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em população de baixo risco (n = 409). **B.** Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em população de risco misto (n = 194). **C.** Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em infecção com *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n = 174).

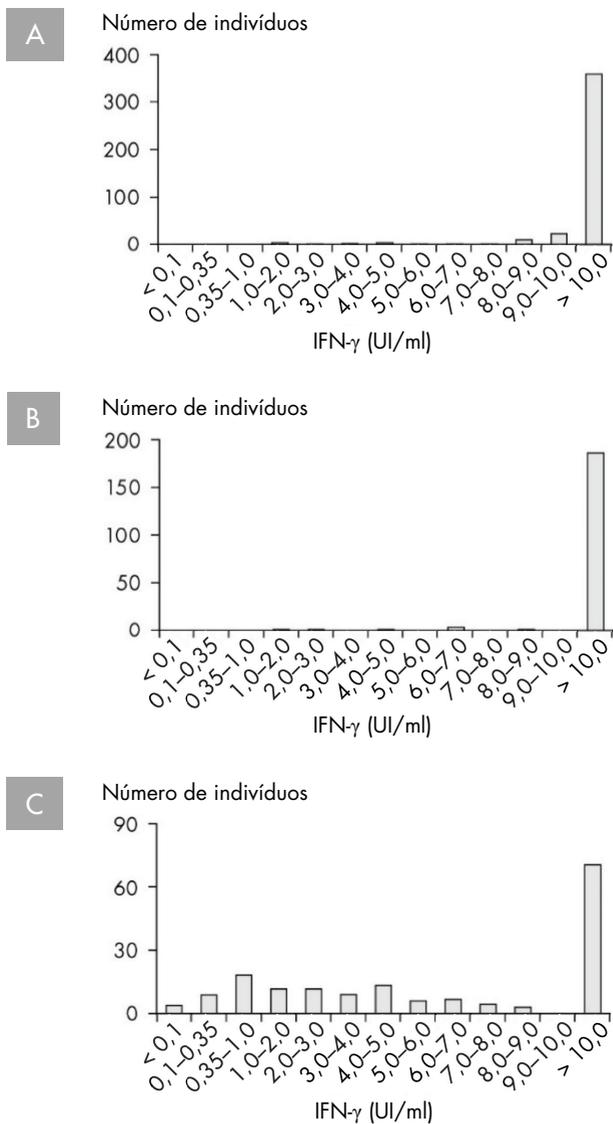


Figura 9. Distribuição de Mitogen (Nil subtraído). **A.** Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em população de baixo risco (n = 409). **B.** Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em população de risco misto (n = 194). **C.** Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em infecção com *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n = 169).

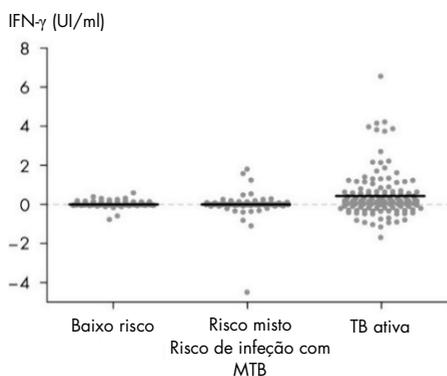


Figura 10. Diferença observada entre valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído), estratificados por risco. População de baixo risco (n = 409), população de risco misto (n = 189) e população com infecção com *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n = 141). Os valores de TB1 foram subtraídos aos valores de TB2. Os indivíduos com valores de TB1 ou TB2 de > 10,0 UI/ml foram excluídos por estarem fora do intervalo linear do ensaio.

## Características de desempenho dos ensaios

Demonstrou-se que o QFT-Plus ELISA é linear colocando aleatoriamente 5 réplicas de 11 pools de plasma de concentrações conhecidas de IFN- $\gamma$  na placa do ELISA. A linha de regressão linear apresenta uma inclinação de  $1,002 \pm 0,011$  e um coeficiente de correlação de 0,99 (Figura 11).

O limite de detecção do QFT-Plus ELISA é de 0,065 UI/ml, não existindo evidências de um efeito high-dose hook (prozona) com concentrações de IFN- $\gamma$  até 10 000 UI/ml.

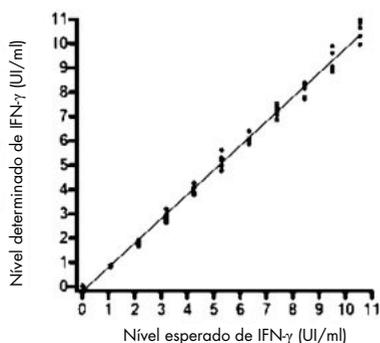


Figura 11. Perfil de linearidade do QFT-Plus ELISA

A imprecisão intra e interensaio (%CV) do QFT-Plus ELISA foi estimada testando 20 amostras de plasma com concentrações variáveis de IFN- $\gamma$  em réplicas de 3, em 3 laboratórios diferentes, em 3 dias não consecutivos e realizados por 3 operadores diferentes. Deste modo, cada amostra foi testada 27 vezes em 9 execuções de ensaio independentes. Uma amostra era um controlo Nil e tinha uma concentração calculada de IFN- $\gamma$  de 0,08 UI/ml (IC de 95%: 0,07–0,09). Das 19 amostras de plasma restante, as concentrações eram de 0,33 (IC de 95%: 0,31–0,34) a 7,7 UI/ml (IC de 95%: 7,48–7,92).

A imprecisão intra ou interensaio foi estimada calculando a média de %CV para cada teste de plasma contendo IFN- $\gamma$  de cada execução da placa (n = 9), estando a imprecisão entre 4,1 e 9,1% CV. A covariância média dentro da execução (IC de  $\pm$ 95%) foi de 6,6%  $\pm$  0,6%. A média do plasma com zero de IFN- $\gamma$  foi de 14,1% CV.

A imprecisão total ou interensaio foi determinada através da comparação de 27 concentrações calculadas de IFN- $\gamma$  por cada teste de plasma. A imprecisão interensaio variou entre 6,6 e 12,3% CV. A %CV média geral (IC de  $\pm$ 95%) foi de 8,7%  $\pm$  0,7%. O plasma com zero IFN- $\gamma$  apresentou 26,1% CV. Este nível de variação é expectável, uma vez que a concentração calculada de IFN- $\gamma$  é baixa e a variação em torno de uma estimativa baixa de concentração será maior de que para concentrações mais altas.

A reprodutibilidade do teste QFT-Plus foi determinada utilizando amostras sanguíneas de 102 indivíduos com fatores de risco misto relativamente a infeção com *M. tuberculosis*. Foram avaliados três diferentes operadores e condições laboratoriais.

Foram efetuadas 3 determinações de diagnóstico para cada indivíduo e 306 no total para todos os indivíduos. A reprodutibilidade geral do diagnóstico foi de 99% (IC de 95%: 97,2–99,7), em que o resultado de diagnóstico foi concordante em 303 de 306 determinações. Os resultados de 3 indivíduos que estavam próximos do cut-off totalizaram toda a variação.

## Diagnóstico de infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI)

Foi publicado um número de estudos que demonstram o desempenho do QFT, o precursor do QFT-Plus, em várias populações em risco de infecção com MTB. Os principais achados de alguns dos estudos selecionados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Estudos publicados selecionados sobre QFT

População/estado	Resultados e achados	Número total de estudos publicados
Pediatria	Desempenho comprovado em crianças, incluindo crianças com menos de 5 anos de idade (45–46) com precisão superior ao ensaio de libertação de interferão gama (interferon-gamma release assay, IGRA) baseado em ELISpot (8). O maior estudo até à data comparando QFT com testes cutâneos de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) em crianças do Vietname, Filipinas e México sustenta a utilização preferencial de QFT em detrimento de testes cutâneos de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) na examinação de crianças estrangeiras relativamente a infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI) (46). Um estudo de contacto limitado demonstra um melhor valor preditivo que os testes cutâneos de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) em crianças (47) e um risco de progressão da TB 8 vezes superior no prazo de dois anos em conversores QFT em comparação com não conversores (48). A discordância QFT negativo/teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) positivo é alta em crianças com a vacina BCG (46, 49), mas não existe impacto na resposta a Mitogen em crianças com menos de 5 anos de idade (49) e nas taxas reduzidas de resultados indeterminados no rastreio de rotina de crianças imigrantes (46).	152
Gravidez	Num cenário de carga reduzida, o QFT é executado com igual eficácia em cada trimestre da gravidez com resultados comparáveis a mulheres não grávidas, é muito mais específico, apresenta igual sensibilidade e pode ser um melhor indicador de progressão da doença do que o teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) (50). Num cenário de carga elevada, o QFT foi mais estável ao longo da gravidez e aproximou mais a prevalência de historial de infecção tuberculosa latente (latent tuberculosis infection, LTBI) em comparação com o teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST), embora os autores tenham concluído que a gravidez afeta o QFT e o teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) (51).	6

Continuação da tabela na página seguinte

Tabela 7. Estudos publicados selecionados sobre QFT (continuação)

População/estado	Resultados e achados	Número total de estudos publicados
HIV/SIDA	Tanto os IGRA como os teste cutâneos de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) são afetados pela infecção com HIV e o conjunto de evidências sugere que devem ser tomados cuidados ao interpretar resultados com contagens de CD4+ < 200 (52). Foi demonstrado que o QFT é menos afetado que o IGRA e teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) baseados em ELISpot (53–55). Uma única consulta de IGRA supera a questão de testes cutâneos de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) baixos nesta população (53).	101
Terapêuticas imunossupressoras	O QFT é menos afetado por terapêuticas imunossupressoras do que o teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) e correlaciona-se melhor com os fatores de risco de TB (23, 27). O QFT tem sensibilidade elevada em pacientes com reumatismo (23, 56, 57) e especificidade superior ao teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST), minimizando os falsos positivos e reduzindo o tratamento desnecessário que ocorria com o TST (23, 57, 58).	112
Profissionais de saúde	Foi demonstrado como sendo mais específico e como tendo menos falsos positivos do que o teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST), e mais rentável do que o teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) (59–62). A variabilidade em redor do limiar foi um resultado esperado nos testes em série, devido ao ponto de corte dicotômico e à variabilidade inerente de um teste biológico (63). Os estudos demonstraram taxas de conversão/reversão superiores do que no teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) em testes em série de profissionais de saúde de baixo risco (64, 65). Os CDC (Centers for Disease Control and Prevention) dos EUA reconhecem que os critérios tolerantes que definem a conversão de IGRA podem produzir mais conversão do que a observada com os critérios quantitativos mais rigorosos do teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) e foi demonstrado que as estratégias de repetição de testes são eficazes na gestão do fenómeno conversão/reversão (65–68).	111
Contactos com TB	VPP e VPN mais elevados do que no teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) (47); conveniência de consulta única para aqueles cujo regresso é improvável (63), melhor correlação à exposição (69), o que é especialmente notório em pessoas com a vacina BCG e em populações de países onde é administrada a vacina BCG (70, 71).	89
Transplantação	Demonstrado como sendo pelo menos tão eficaz como o teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST), mas menos afetado por doença terminal dos órgãos (22).	23

Continuação da tabela na página seguinte

Tabela 7. Estudos publicados selecionados sobre QFT (continuação)

População/estado	Resultados e achados	Número total de estudos publicados
Diabetes	Resultados contraditórios de um número reduzido de publicações com número limitado de indivíduos. Um estudo de uma área de carga reduzida concluiu que a sensibilidade do QFT não é comprometida pela diabetes em pacientes com TB (72). Um estudo da Tanzânia, um cenário de carga elevada, sugerindo um impacto negativo da diabetes na produção de IFN- $\gamma$ , não tomou em consideração fatores de confusão como as infecções com HIV ou verminoses (73). Em estudos vietnamitas, em 838 diabéticos autorrelatados com suspeitas de TB devido a radiografias ao tórax (Chest X-Ray, CXR) anormais ou confirmados por cultura como tendo tuberculose ativa (n = 128), a positividade do QFT foi igual ou superior aos pontos de corte de TST de 10 e 15 mm (74).	9
Doença renal terminal	Os resultados positivos do QFT correlacionam-se com os fatores de risco de TB melhor do que os do teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) e são menos associados à BCG (75).	45
Imigrantes	Os estudos demonstram que o QFT não é afetado pela BCG e pela idade, ao contrário do teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) (74). O QFT foi demonstrado como sendo o método mais rentável (76). Em cenários de carga reduzida, a maioria da TB é proveniente de estrangeiros e da reativação de TB latente após a chegada (77). O maior estudo até à data comparando QFT com teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) em crianças imigrantes sustenta a utilização preferencial de QFT em detrimento de testes cutâneos de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) na examinação de crianças estrangeiras relativamente a infecção de TB latente (46).	29

---

# Informações técnicas

## Resultados indeterminados

Os resultados indeterminados são pouco comuns e podem estar relacionados com o estado imunitário do indivíduo testado, mas também com um número de fatores técnicos, caso as instruções de utilização anteriormente descritas não sejam seguidas.

Se suspeitar de problemas técnicos no armazenamento de reagente, na colheita de sangue ou no manuseamento das amostras sanguíneas, repita todo o teste QFT-Plus com uma nova amostra sanguínea. É possível repetir o teste ELISA de plasmas estimulados no caso de suspeitar de lavagem inadequada ou de qualquer outro desvio processual ao teste ELISA. Não se espera que os testes indeterminados que resultam de valores baixos de Mitogen ou de valores elevados de Nil se alterem com a repetição, a menos que tenha ocorrido algum erro no teste ELISA. Os resultados indeterminados devem ser reportados como tal. Os médicos podem optar por colher uma nova amostra ou efetuar outros procedimentos conforme acharem adequado.

## Amostras de plasma coaguladas

Se ocorrerem coágulos de fibrina nas amostras de plasma de armazenamento de longo prazo, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

# Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para mais informações, consulte também as informações técnicas disponibilizadas em [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Para informações de contacto, consulte a contracapa.

## Resolução de problemas ELISA

### Desenvolvimento cromático não específico

Causa possível	Solução
a) Lavagem incompleta da placa	Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo.
b) Contaminação cruzada dos poços ELISA	Tome cuidado ao pipetar e a misturar as amostras para minimizar os riscos.
c) O prazo de validade do kit/componentes expirou	Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de três meses a contar a partir da data de reconstituição.
d) A Solução de substrato de enzimas está contaminada	Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos.
e) Mistura do plasma nos tubos QFT-Plus antes da colheita	Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma, seja de que modo for, antes da colheita. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

### Leituras baixas da absorvância das soluções padrão

Causa possível	Solução
a) Erro de diluição da solução padrão	Certifique-se de que as diluições da solução padrão do kit são preparadas corretamente conforme a presente bula.
b) Erro de pipetagem	Certifique-se de que as pipetas estão calibradas e de que são utilizadas de acordo com as instruções do fabricante.
c) Temperatura de incubação demasiado baixa	A incubação do ELISA deve ser efetuada à temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C).
d) Tempo de incubação demasiado curto	A incubação da placa com o conjugado, com as soluções padrão e com as amostras deve durar 120 ± 5 minutos. A Solução de substrato de enzimas é incubada na placa durante 30 minutos.

## Resolução de problemas ELISA

- |   |  |
|---|--|
| e) Filtro incorreto de leitor de placas utilizado | A placa deve ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm.   |
| f) Os reagentes estão demasiados frios            | Todos os reagentes, excetuando o Conjugado concentrado 100x, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isto demora aproximadamente uma hora.  |
| g) O prazo de validade do kit/componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de 3 meses a contar a partir da data de reconstituição. |

### Fundo elevado

#### Causa possível

#### Solução

- |  |  |
|--|--|
| a) Lavagem incompleta da placa                 | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Temperatura de incubação demasiado alta     | A incubação do ELISA deve ser efetuada a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C).  |
| c) Kit/componentes fora do prazo de validade   | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de 3 meses a contar a partir da data de reconstituição.                               |
| d) Solução de substrato de enzimas contaminada | Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos.   |

### Curva padrão não linear e variabilidade de duplicados

#### Causa possível

#### Solução

- |   |  |
|---|--|
| a) Lavagem incompleta da placa  | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Erro de diluição de solução padrão   | Certifique-se de que as diluições da solução padrão são preparadas corretamente conforme a presente bula.  |
| c) Mistura mal efetuada   | Misture bem os reagentes, invertendo ou misturando suavemente em vórtex, antes de os adicionar à placa.  |
| d) Técnica inconsistente ou interrupção da pipetagem durante a preparação do ensaio | A adição de amostras e de soluções padrão deve ser efetuada de um modo contínuo. Todos os reagentes devem ser preparados antes de iniciar o ensaio.  |

As informações dos produtos e os guias técnicos são disponibilizados gratuitamente pela QIAGEN, através do seu fornecedor, ou visitando [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).

---

## Referências

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 645.
3. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur. Respir. J.* 33, 586.
4. Bocchino, M. et al. (2008) Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27,907.
5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir. Res.* 7, 56.
6. Chun, J.K. et al. (2008) The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 389.
7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 3, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.
8. Detjen, A.K. et al. (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 45, 322.

9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot. TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* 135, 1010.
10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN- $\gamma$  assay for the development of active TB disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177, 1164.
11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir. Res.* 7, 77.
12. Dogra, S. et al. (2007) Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J. Infect.* 54, 267.
13. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 4, e55.
14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology* 13, 270.
15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J. Infect.* 56, 348.
16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 33.
17. Kang, Y.A. et al. (2005) Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* 293, 2756.
18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 1146.

- 
19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss. Med. Wkly.* 138, 267.
  20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 737.
  21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* 146, 761.
  22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 7, 2797.
  23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 84.
  24. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 513.
  25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. *Emerging Infect. Dis.* 12, 1383.
  26. Pai, M. et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA* 293, 2746.
  27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol.* 35, 776.

28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur. Respir. J.* 32, 524.
29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 3, 981.
30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2799.
31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin. Biochem.* 40, 913.
32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, 681.
33. Turner, J. et al. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. *Immunology* 87, 339.
34. Brookes, R.H. et al. (2003) CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. *Eur. J. Immunol.* 33, 3293.
35. Stenger, S. et al. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282, 121.
36. Lalvani, A. et al. (1998) Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 270.

37. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. *J. Immunol.* 166, 439.
38. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. *PLoS Pathol.* 3, 1240.
39. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J. Immunol.* 187, 2222.
40. Rozot, V. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur. J. Immunol.* 43, 1568.
41. Nikolova, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 75, 277.
42. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. *J. Infect.* doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.009. Epub.
43. Ongaya, A. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. *Tuberculosis* 93, S60.
44. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 206.
45. Long, G., Ji-Chun, M., Min, Jin-Long, L., Jin-Hui, T. (2014) Interferon- $\gamma$  release assay for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis. *Clin. Pediatr.* 53, 1255.

46. Howley, M.M. et al. (2015) Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and tuberculin skin tests among immigrant children being screened for latent tuberculosis infection. *Ped. Infect. Dis.* 34, 35.
47. Diel, R., Loddenkemper, R., Niemann, S., Meywald-Walter, K., and Nienhaus, A. (2011) Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon- $\gamma$  release assay for developing active tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 88.
48. Machingadaize, S. et al. (2012) Predictive value of recent QuantiFERON conversion for tuberculosis disease in adolescents. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 1051.
49. Riazi, S. et al. (2012) Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children using interferon-gamma release assays (IGRAs). *Allergy Asthma Proc.* 33, 217.
50. Lighter-Fisher, J. and Surette, A-M. (2012) Performance of an interferon-gamma release assay to diagnose latent tuberculosis infection during pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 119, 1088.
51. Mathud, J.S. et al. (2014) Pregnancy differentially impacts performance of latent tuberculosis diagnostics in a high-burden setting. *PLoS ONE* 9, e92308.
52. Hoffman, M. and Ravn, P. (2010) The use of interferon-gamma release assays in HIV-positive individuals. *Eur. Infect. Dis.* 4, 23.
53. Cheallaigh, C.N. et al. (2013) Interferon gamma release assays for the diagnosis of latent TB infection in HIV-infected individuals in a low TB burden country. *PLoS ONE* 8, e53330.
54. Ramos, J. M. et al. (2012) Contribution of interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: A comparison of QuantiFERON-TB gold in tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test. *BMC Infect. Dis.* 12, 169.
55. Wolf, T. et al. (2013) Tuberculosis skin test, but not interferon- $\gamma$  releasing assays is affected by BCG vaccination in HIV patients. *J. Infect.* 66, 376.

- 
56. Hsia, E.C. et al. (2012) Interferon- $\gamma$  release assay versus tuberculin skin test prior to treatment with golimumab, a human anti-tumor necrosis factor antibody, in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, or ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 64, 2068.
  57. Garcovich, S. et al. (2012) Clinical applicability of QuantiFERON-TB-Gold testing in psoriasis patients during long-term anti-TNF-alpha treatment: a prospective, observational study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Ven.* 26, 1572.
  58. Kwakernaak, A.J. et al. (2011) A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibitor. *Clin. Rheumatol.* 30, 505.
  59. Vinton, P. et al. (2009) Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and tuberculin skin test for identification of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthcare staff and association between positive test results and known risk factors for infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30, 215.
  60. de Perio, M.A., Tsevat, J., Roselle, G.A., Kralovic, S.M., and Eckman, M.H. (2009) Cost-effectiveness of interferon gamma release assays vs tuberculin skin tests in health care workers. *Arch. Intern. Med.* 169, 179.
  61. Nienhaus, A. et al. (2008) Evaluation of the interferon- $\gamma$  release assay in healthcare workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 81, 295.
  62. Nienhaus, A. et al. (2011) Systematic review of cost and cost-effectiveness of different TB-screening strategies. *BMC Health Serv. Res.* 11, 247.
  63. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Updated guidelines for using interferon-gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection — United States, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* 59 (RR-5), 1.

64. Dorman, S.E. et al. (2014) Interferon- $\gamma$  release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 77.
65. Fong, K.S. et al. (2012) Challenges of interferon-gamma release assay conversions in serial testing of health care workers in a tuberculosis control program. *Chest* 142, 55.
66. Thanassi, W. et al. (2012) Delineating a retesting zone using receiver operating characteristic analysis on serial QuantiFERON tuberculosis test results in US healthcare workers. *Pulm. Med.* doi: 10.1155/2012/291294. Epub.
67. Behrman, A. et al. (2013) Protecting Health Care Workers from Tuberculosis, 2013: ACOEM Medical Center Occupational Health Section Task Force on Tuberculosis and Health Care Workers. *J. Occup. Environ. Med.* 55, 985.
68. Nienhaus, A., Ringshausen, F.C., Costa, J.T, Schablon, A., and Tripodi, D. (2013) IFN- $\gamma$  release assay versus tuberculin skin test for monitoring TB infection in healthcare workers. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 37.
69. Arend, S.M. et al. (2007) Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing TB contact. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 618.
70. Mandalakas, A.M., Detjen, A.K., Hesselning, A.C., Benedetti, A., and Menzies, D. (2011) Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15, 1018.
71. Grinsdale, J.A., Ho, C.S., Banouvong, H., Kwamura, L.M. (2011) Programmatic impact of using QuantiFERON-TB Gold in routine contact investigation activities. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15, 1614.
72. Walsh, M.C. et al. (2011) Sensitivity of interferon- $\gamma$  release assays is not compromised in tuberculosis patients with diabetes. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15, 179.

- 
73. Faurholt-Jespersen, D. et al. (2014) Diabetes is associated with lower tuberculosis antigen-specific interferon gamma release in Tanzanian tuberculosis patients and non-tuberculosis controls. *Scand. J. Infect. Dis.* 46, 384.
  74. Painter, J.A. et al. (2013) Tuberculosis screening by tuberculosis skin test or QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay among an immigrant population with a high prevalence of tuberculosis and BCG vaccination. *PLoS ONE* 8, e82727.
  75. Rogerson, T.E. et al. (2012) Tests for latent tuberculosis in people with ESRD: a systematic review. *Amer. J. Kidney Dis.* 61, 33.
  76. Pareek, M. et al. (2013) Community-based evaluation of immigrant tuberculosis screening using interferon  $\gamma$  release assays and tuberculin skin testing: observational study and economic analysis. *Thorax.* 68, 230.
  77. CDC, Tuberculosis – United States, 2018.  
[https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6811a2.htm?s\\_cid=mm6811a2\\_w](https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6811a2.htm?s_cid=mm6811a2_w)  
Accessed 22 March 2019.

# Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer na embalagem e nas etiquetas:

Símbolo	Definição do símbolo
 $\Sigma$ 2 x 96	Suficiente para 2 x 96 preparações de amostra
	Fabricante legal
	Símbolo de marcação CE/IVD
	Para utilização em diagnóstico in vitro
	Código do lote
	Referência
	Número global de item comercial
	Prazo de validade
	Limites de temperatura
	Consultar as instruções de utilização
	Não reutilizar
	Manter afastado da luz solar
	Número do material
Rn	R refere-se à revisão das Instruções de utilização e n é o número da revisão

---

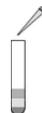
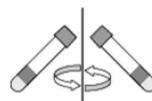
## Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, contacte-nos gratuitamente através do número 00800-22-44-6000, consulte o nosso Centro de Assistência Técnica em [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica da QIAGEN (consulte a contracapa ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Procedimento abreviado do teste

## Fase 1 – incubação do sangue

1. Colha o sangue do paciente para dentro de tubos de colheita de sangue e misture, agitando os tubos dez (10) vezes após os encher de forma a garantir que toda a superfície interna do tubo fica revestida de sangue. Este procedimento dissolverá os antígenos da parede do tubo.
2. Incube os tubos na vertical a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 16 a 24 horas.
3. Após a incubação, centrifugue os tubos durante 15 minutos a 2000 to 3000  $\times g$  RCF ( $g$ ) para separar o plasma e os glóbulos vermelhos.
4. Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.



## Etapa 2 – IFN $\gamma$ ELISA

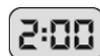
1. Coloque os componentes do ELISA, à exceção do Conjugado concentrado 100x, à temperatura ambiente ( $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ) durante, no mínimo, 60 minutos.
2. Reconstitua a solução padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou desionizada. Prepare quatro (4) diluições de solução padrão.
3. Reconstitua o Conjugado concentrado 100x liofilizado com água destilada ou desionizada.



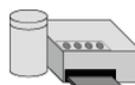
4. Prepare conjugado funcional em Diluente verde e adicione 50 µl a todos os poços.



5. Adicione 50 µl de amostras de plasma do teste e 50 µl de soluções padrão nos poços adequados. Misture utilizando um agitador.



6. Incube durante  $120 \pm 5$  minutos à temperatura ambiente.



7. Lave os poços, pelo menos, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem.

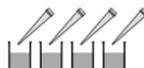
8. Adicione 100 µl de Solução de substrato de enzimas nos poços. Misture utilizando um agitador.



9. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.



10. Adicione 50 µl de Solução de paragem enzimática em todos os poços. Misture utilizando um agitador.



11. Leia os resultados a 450 nm com um filtro de referência de 620 a 650 nm.



12. Analise os resultados.



## Alterações significativas

Secção	Página	Alterações
Várias	Várias	Adicionadas instruções relacionadas com a utilização de tubos de heparina de lítio ou sódio
Várias	Várias	Adicionadas instruções relacionadas com o fluxo de trabalho de colheita de sangue de 2–8 °C
Várias	Várias	A tampa de placa é agora um material necessário mas não fornecido

## Histórico de revisões do documento

Documento	Alterações
R6 04/2019	Alterações a heparina de lítio/heparina de sódio Novas instruções de trabalho para fluxo de trabalho de colheita de sangue a 2–8 °C Tampas de placa removidas das placas QF

Marcas comerciais: QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (Grupo QIAGEN); Microsoft®, Excel® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Acordo de licença limitada para o QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser utilizado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e na presente bula e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para utilizar ou incluir os componentes englobados neste painel com qualquer componente não incluído neste kit, salvo descrito nos protocolos fornecidos com o produto e na presente bula.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados ou ser objeto de revenda, salvo indicação contrária por parte da QIAGEN.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do kit concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de licença limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de licença limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2019 QIAGEN, todos os direitos reservados.

---

[www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com)

Ásia-Pacífico | [techservice-ap@qiagen.com](mailto:techservice-ap@qiagen.com)

Europa | [techserviceQFT-eu@qiagen.com](mailto:techserviceQFT-eu@qiagen.com)

Médio Oriente/África | [techserviceQFT-eu@qiagen.com](mailto:techserviceQFT-eu@qiagen.com)

América Latina (sem incluir Brasil ou México) | [techservice-latam@qiagen.com](mailto:techservice-latam@qiagen.com)

---

## Notas

---

## Notas

