

March 2018

# Folheto informativo do QuantiFERON Monitor<sup>®</sup> (QFM<sup>®</sup>) ELISA 2 x 96

O teste de IFN- $\gamma$  no sangue total que mede as respostas aos estimulantes imunológicos inatos e adaptativos

Versão 1

 Para uso em diagnóstico in vitro



 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road  
Germantown, MD 20874 EUA

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden, ALEMANHA

1079024PT-BR Rev. 01

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





Conteúdo	
Uso previsto	4
Resumo e explicação do teste	4
Princípios do ensaio	5
Tempo necessário para realizar o ensaio	6
Componentes e armazenamento	6
Materiais necessários, mas não fornecidos	8
Armazenamento e manuseio	8
Avisos e precauções	10
Avisos	10
Precauções	11
Coleta e manuseio de espécimes	13
Cálculos e interpretação de testes	23
Geração da curva de solução padrão	23
Controle de qualidade do teste	24
Interpretação dos resultados	24
Limitações	26
Características de desempenho	26
Estudos clínicos	26
Características do desempenho do ensaio	31
Informações técnicas	32
Amostras de plasma coaguladas	32
Guia de solução de problemas	33
Referências	35
Símbolos	36
Informações de contato	36
Procedimento de teste abreviado	37

## Uso previsto

O ensaio QuantiFERON Monitor (QFM) é um teste de diagnóstico *in vitro* destinado a detectar a função imune mediada por células através da medição de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) no plasma por ensaio imunoenzimático (ELISA) após a incubação de sangue total heparinizado com estimulantes da resposta imune inata e adaptativa. O ensaio é usado para detectar a resposta imune mediada por células na população de transplantes de órgãos sólidos imunossuprimidos.

O QFM é destinado ao uso em conjunto com a avaliação de riscos e outras avaliações médicas e de diagnóstico.

## Resumo e explicação do teste

A imunodeficiência é caracterizada por uma capacidade reduzida de montar efetivamente uma resposta imune. Essa resposta comprometida ou ausente pode ser resultado de uma imunodeficiência primária ou adquirida (secundária) (1).

As imunodeficiências primárias são herdadas geneticamente e caracterizadas por deficiências de componentes distintos do sistema imunológico adaptativo ou inato (1). No entanto, a maioria das imunodeficiências é adquirida (secundária) e pode ser induzida por agentes patogênicos, medicamentos (como tratamento imunossupressor após o transplante de órgãos), condições patológicas (como câncer, por exemplo, leucemia e linfoma) ou por contaminantes ambientais (1).

A base molecular da imunodeficiência é diversa; no entanto, a imunidade mediada por células desempenha um papel fundamental na indução de muitas das manifestações clínicas observadas. Atualmente, o diagnóstico e o manejo de síndromes de imunodeficiência dependem do agente causal (2, 3).

Por exemplo, a gestão *ad hoc* é a norma no monitoramento do status de imunodeficiência celular de indivíduos que foram submetidos a transplantes de órgãos sólidos (Solid Organ Transplants, SOTs) e estão recebendo medicamentos para suprimir seu sistema imunológico. O status da resposta imune do indivíduo é geralmente medido pelo monitoramento dos níveis de medicamento farmacológico e pela avaliação clínica/patológica da função do implante (2, 3).

Vários testes de função das células T medem a imunidade mediada por células quanto aos mitógenos, como a fitohemaglutinina (PHA), mitógeno pokeweed e concanavalina A (ConA); no entanto, eles medem apenas a capacidade funcional das células T e são um subconjunto de células envolvidas na imunidade mediada por células. Tornou-se cada vez mais evidente que mecanismos imunológicos inatos contribuem muito para a defesa do

hospedeiro, seja por agir sozinho ou por melhorar respostas de células T específicas. Portanto, as respostas funcionais das células imunes inatas (células assassinas naturais [NK – Natural Killer]) e adaptativas (células T) formam uma análise mais abrangente da imunidade mediada por células (2, 3).

O QFM é um teste de diagnóstico *in vitro* que usa uma combinação de estimulantes (na forma de um pellet LyoSphere™) que estimulam especificamente diferentes tipos de células envolvidas nos sistemas imunológicos inato e adaptativo. O estado imunológico funcional de um indivíduo é avaliado medindo a resposta à estimulação do sistema imunológico inato e adaptativo com agonistas do Toll Like Receptor (TLR) e do receptor de células T (TCR – T-Cell Receptor), respectivamente. A detecção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) por ELISA fornece uma medição qualitativa e quantitativa da função imune mediada por células.

## Princípios do ensaio

O ensaio QFM usa estimulantes liofilizados (QFM LyoSpheres™), que são adicionados ao sangue total heparinizado. A incubação do sangue ocorre de 16 a 24 horas, após as quais o plasma é coletado e testado quanto à presença de IFN- $\gamma$  produzido em resposta aos estimulantes.

O teste QFM é realizado em estágios. Primeiro, o sangue total é coletado no QFM Blood Collection Tube. Em seguida, um QFM LyoSphere é adicionado ao tubo, que é incubado a 37°C o mais rápido possível e dentro de 8 horas após a coleta. Após um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é removido e a quantidade de IFN- $\gamma$  (relatada em Unidades Internacionais por ml; UI/ml) é medida por ELISA e comparada a um intervalo de valores esperados para caracterizar a resposta imune do indivíduo.

O QFM é um ensaio que fornece uma medição qualitativa e quantitativa da função imune. Os resultados do QFM podem não quantificar diretamente o nível de supressão imunológica.

A quantidade de IFN- $\gamma$  nas amostras de plasma pode, em geral, estar acima dos limites superiores da maioria dos leitores de ELISA, mesmo quando os indivíduos estão moderadamente imunossuprimidos. Recomenda-se que as amostras de plasma sejam diluídas na proporção de 1:10 e/ou 1:100 no Diluente verde e testadas no ELISA juntamente com o plasma não diluído.

Nota: O limiar do ensaio QFM pode variar dependendo do nível de imunossupressão de um indivíduo e das configurações de transplante individuais.

Consulte "Interpretação dos resultados" na página 24 deste folheto informativo para obter uma descrição de como os resultados do QFM são interpretados.

## Tempo necessário para realizar o ensaio

O tempo necessário para realizar o ensaio QFM é estimado abaixo. O tempo de teste de várias amostras quando em lote também é indicado.

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

ELISA: Aproximadamente 3 horas para uma placa de ELISA  
(até 88 amostras) <1 hora de trabalho

Adicione 10 a 15 minutos para cada placa extra

## Componentes e armazenamento

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Ref.	0650-0701
Número de preparações	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 frascos
<i>Folheto informativo do QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
QuantiFERON Monitor Blood Collection Tubes	
Ref.	0650-0101
Número de preparações	100
QuantiFERON Monitor Blood Collection Tubes (tampa branca, anel branco)	100 tubos
<i>Folheto informativo dos QuantiFERON Monitor Blood Collection Tubes</i>	1

Componentes do QuantiFERON Monitor 2 Plate Kit ELISA	2-plate kit ELISA
Ref.	0650-0201
Microplate Strips (Tiras de microplacas), 12 x 8 poços (revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ humano-murino)	2 conjuntos de tiras de microplacas de 12 x 8 poços
IFN- $\gamma$ Standard (Solução padrão de IFN- $\gamma$ ), liofilizada (contém IFN- $\gamma$ humano recombinante, caseína bovina, 0,01% w/v de Timerosal)	1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (Diluyente verde) (contém caseína bovina, soro de camundongo normal, 0,01% w/v de Timerosal)	1 x frasco de 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Conjugado 100x concentrado), liofilizado (HRP de anti-IFN- $\gamma$ humano-murino, contém 0,01% w/v de Timerosal)	1 x 0,3 ml, quando reconstituído
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampão de lavagem 20x concentrado) (pH 7,2, contém 0,05% v/v de ProClin <sup>®</sup> 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato enzimático) (contém H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de parada enzimática) (contém 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )*	1 x 15 ml
Folheto informativo do QuantiFERON Monitor ELISA	1

\* Contém ácido sulfúrico. Consulte a página 11 sobre precauções.

## Materiais necessários, mas não fornecidos

- Incubadora\* a 37°C; CO<sub>2</sub> não necessário.
- Pipetas de volume variável calibradas\*
- Pipeta multicanal calibrada† com capacidade para administrar 50 µl e 100 µl com pontas descartáveis
- Agitador de microplacas†
- 2 litros de água deionizada ou destilada
- 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
- Cilindro graduado (cilindro de medição)
- Toalhas absorventes sem fiapos

## Armazenamento e manuseio

### Tubos de coleta de sangue

Armazene os QFM Blood Collection Tubes entre 4°C e 25°C. Os QFM Blood Collection Tubes devem estar entre 17°C e 25°C no momento do enchimento e mistura do sangue.

### LyoSpheres

Armazene os QFM LyoSpheres entre 2°C e 8°C.

### Reagentes do kit ELISA

Armazene os reagentes do kit ELISA entre 2°C e 8°C.

Mantenha a Solução de substrato enzimático sempre protegida da luz solar direta.

\* Certifique-se de que os instrumentos tenham sido verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

## Reagentes de ELISA reconstituídos e não usados

Para obter instruções sobre como reconstituir os reagentes de ELISA, consulte "Estágio 2 – IFN- $\gamma$  ELISA", página 18.

- 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 100x concentrado não usado tem de ser novamente armazenado entre 2°C e 8°C e tem de ser usado dentro de 3 meses.

Anote a data na qual o conjugado foi reconstituído.

- O conjugado na concentração de trabalho deve ser usado no período de 6 horas após o preparo (consulte Tabela 1).
- O tampão de lavagem na concentração de trabalho deve ser armazenado em temperatura ambiente (22°C  $\pm$  5°C) por até duas semanas.

## Avisos e precauções

### Para uso em diagnóstico in vitro

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF (conveniente e compacto) em [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit e para componente do kit QIAGEN.

### Avisos

- O QFM é um ensaio que fornece uma medição qualitativa e quantitativa da função imune. Os resultados do QFM podem não quantificar diretamente o nível de supressão imunológica.
- Os resultados do ensaio QFM devem ser usados em conjunto com a apresentação clínica, o histórico médico e outros indicadores clínicos ao estabelecer o estado imune de um paciente.
- O limiar do ensaio QFM pode variar dependendo do nível de imunossupressão de um indivíduo e das configurações de transplante individuais.

## Precauções

Somente para uso em diagnóstico in vitro.



**CUIDADO:** Manuseie o sangue e plasma humano como se fossem potencialmente infecciosos. Observe as diretrizes relevantes de manuseio de sangue e produtos sanguíneos. Descarte amostras e materiais em contato com sangue ou produtos sanguíneos de acordo com os regulamentos federais, estaduais e locais.

As advertências de perigo e precaução a seguir se aplicam aos componentes do QuantiFERON Monitor ELISA.

### Advertências de perigo



#### QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Contém: ácido sulfúrico. Aviso! Pode ser corrosivo para metais. Provoca irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

#### QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Aviso! Causa irritação leve da pele. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.



#### QuantiFERON Green Diluent

Contém: 5-hidroxi-1-(4-sulfonil)-4-(4-sulfonilazo)pirazole-3-carboxilato trissódico. Contém: tartrazina. Aviso! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.



#### QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Contém: mistura de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolína-3-ona e 2-metil-2H-isotiazole-3-ona (3:1). Nocivo para a vida aquática, com efeitos duradouros. Evite liberar no meio ambiente.

## Mais informações

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

- Divergências em relação ao *folheto informativo do QuantiFERON Monitor (QFM) ELISA* podem levar a resultados incorretos. Leia as instruções com atenção antes do uso.
- **Importante:** Inspeção os frascos antes do uso. Não use frascos de Conjugado, Solução padrão de IFN- $\gamma$  ou QFM LyoSphere que apresentem sinais de danos ou se a vedação de borracha tiver sido comprometida. Não manuseie frascos quebrados. Tome as precauções de segurança apropriadas para os descartar com segurança. Recomendação: Use um deslacrador de frascos para abrir os frascos de Conjugado, Solução padrão de IFN- $\gamma$  ou QFM LyoSphere, a fim de minimizar o risco de ferimentos causados pelo lacre metálico.
- Não use o kit ELISA se algum frasco de reagente apresentar sinais de danos ou vazamentos antes do uso.
- Não misture nem use as Tiras de microplacas, a Solução padrão de IFN- $\gamma$ , o Diluente verde ou o Conjugado 100x concentrado de lotes diferentes do QFM ELISA. Os outros reagentes (Tampão de lavagem 20x concentrado, Solução de substrato enzimático e Solução de parada enzimática) podem ser trocados entre kits, desde que os reagentes estejam dentro dos prazos de validade e que os detalhes do lote sejam registrados.
- Descarte os reagentes e as amostras biológicas não usados em conformidade com os regulamentos locais e nacionais de segurança e meio ambiente.
- Não use os QFM Blood Collection Tubes, os QFM LyoSpheres ou o QFM ELISA após a data de validade.
- Verifique se o equipamento de laboratório foi calibrado/validado para uso.

## Coleta e manuseio de espécimes

O ensaio QFM deve ser realizado apenas com sangue total coletado em um tubo de coleta de sangue de heparina de lítio ou diretamente em um QFM Blood Collection Tube; é necessário 1 ml de sangue total por teste. Os tubos de coleta de sangue devem ser rotulados adequadamente e incluir o horário da coleta.

Importante: Tanto a estimulação de amostras de sangue QFM (ou seja, a adição de um QFM LyoSphere a um 1 ml de alíquota de sangue) como a sua incubação subsequente a 37°C devem ocorrer dentro de 8 horas após a coleta de sangue.

Antes da incubação, mantenha as amostras de sangue em temperatura ambiente (22°C ± 5°C).

Os seguintes procedimentos devem ser seguidos para obter os melhores resultados:

1. Rotule os tubos adequadamente.

Certifique-se de que cada QFM Blood Collection Tube esteja etiquetado adequadamente com os detalhes e o horário da coleta de sangue do indivíduo.

2. Para cada indivíduo, colete 1 ml de sangue por punção venosa diretamente em um QFM Blood Collection Tube. Este procedimento deve ser realizado por um flebotomista treinado.

Nota importante: Os tubos devem ser mantidos entre 17°C e 25°C no momento do enchimento do sangue.

Os QFM Blood Collection Tubes podem ser usados até uma altitude de 810 metros acima do nível do mar.

Como os tubos de 1 ml coletam o sangue de forma relativamente lenta, mantenha o tubo na agulha por 2 a 3 segundos depois que o enchimento do tubo parecer ter sido concluído. Isso garantirá que o volume correto seja extraído.

A marca preta na lateral do rótulo do QFM Blood Collection Tube indica um volume de enchimento de 1 ml. Os QFM Blood Collection Tubes são fabricados para extrair 1 ml ± 10% e ter um desempenho ideal dentro desse intervalo. Se o nível de sangue estiver fora do intervalo da linha indicadora, deverá ser obtida uma nova amostra de sangue.

Se for usada uma agulha "borboleta" para coletar sangue, use um tubo de coleta de sangue "purga" para garantir que a tubulação esteja cheio de sangue antes do uso dos QFM Blood Collection Tubes.

Se usar os QFM Blood Collection Tubes a uma altitude superior a 810 metros ou caso ocorra um baixo volume de coleta de sangue, use uma seringa para coletar o sangue e imediatamente transfira 1 ml para o QFM Blood Collection Tube. Por razões de segurança, recomenda-se que tal procedimento seja realizado removendo a agulha da seringa, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo a tampa do QFM Blood Collection Tube e adicionando 1 ml de sangue (até o centro da marca preta na lateral do rótulo do tubo). Recoloque a tampa firmemente e misture conforme descrito abaixo.

Se usar um torniquete, afrouxe o torniquete assim que a agulha for inserida na veia para evitar variações de pressão que possam afetar o volume de sangue.

Alternativamente, o sangue pode ser coletado em um tubo genérico de coleta de sangue contendo heparina de lítio como anticoagulante e depois transferido para um QFM Blood Collection Tube. Use apenas heparina de lítio como anticoagulante sanguíneo, uma vez que outros anticoagulantes interferem no ensaio. Encha um tubo de coleta de sangue (volume mínimo de 3 ml) e misture delicadamente invertendo o tubo várias vezes para dissolver a heparina. Mantenha o sangue em temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) antes de transferir para os QFM Blood Collection Tubes para estimulação com um QFM LyoSphere. Certifique-se de que o sangue seja bem misturado por inversão suave imediatamente antes da dispensação. Dispense uma alíquota de 1 ml de sangue em um QFM Blood Collection Tube. Tal procedimento deve ser realizado assepticamente, (garantindo os procedimentos de segurança adequados) removendo a tampa do QFM Blood Collection Tube e adicionando 1 ml de sangue (até o centro da marca preta na lateral do rótulo do tubo). Recoloque as tampas dos tubos firmemente e misture conforme descrito abaixo.

3. Imediatamente após encher os tubos, inverta-os suavemente várias vezes para dissolver a heparina.

Importante: Uma agitação excessivamente vigorosa pode causar a ruptura do gel e levar a resultados anormais.

4. Pouco antes do uso, equilibre o QFM LyoSpheres em temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).
5. Adicione assepticamente um QFM LyoSphere a 1 ml de sangue.

Retire a tampa do tubo de coleta de sangue.

Bata levemente no frasco de QFM LyoSphere em uma superfície dura para garantir que o QFM LyoSphere esteja localizado na parte inferior do

frasco. Retire a tampa do frasco de QFM LyoSphere removendo primeiro o lacre metálico e depois a rolha de borracha.

Solte cuidadosamente o QFM LyoSphere na amostra de sangue de 1 ml alinhando o rebordo do frasco de vidro com o rebordo do QFM Blood Collection Tube. Em seguida, inverta o frasco suavemente para transferir o QFM LyoSphere para o QFM Blood Collection Tube (consulte Figura 1).

Importante: Se o QFM LyoSphere cair fora do QFM Blood Collection Tube, descarte-o e abra outro frasco de QFM LyoSphere.

Importante: Não deixe o frasco de QFM LyoSphere aberto por longos períodos de tempo. O QFM LyoSphere deve ser adicionado ao sangue assim que o frasco for aberto.

Se os QFM LyoSpheres forem adicionados ao sangue que foi coletado no QFM Blood Collection Tube, garanta que as tampas dos tubos retornem às amostras corretas.

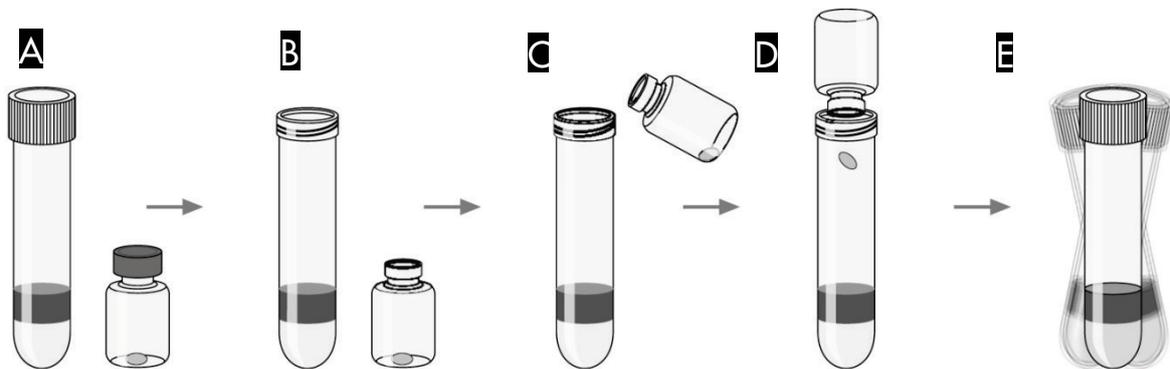


Figura 1. Adição do QFM LyoSphere. **A** QFM Blood Collection Tube e frasco de QFM LyoSphere. **B** Remova a tampa do QFM Blood Collection Tube e remova o lacre metálico e a rolha de borracha do frasco de QFM LyoSphere. **C** Adicione imediatamente o QFM LyoSphere ao sangue alinhando o rebordo do frasco de vidro com o rebordo do tubo de coleta. **D** Em seguida, inverta suavemente o frasco para transferir o LyoSphere para o tubo de coleta. **E** Tampe novamente o QFM Blood Collection Tube e agite de 5 a 10 vezes.

6. Tampe o QFM Blood Collection Tube e agite-o de 5 a 10 vezes, com firmeza suficiente para garantir que o QFM LyoSphere se dissolva completamente.

Se um QFM LyoSphere aderir à superfície interna do tubo, ele poderá ser dissolvido ao cobrir o LyoSphere de sangue enquanto o tubo é invertido.

Certifique-se de que o tubo seja tapado após a adição do QFM LyoSphere, a fim de impedir a adição acidental de um segundo LyoSphere no mesmo tubo.

Nota: Como o QFM LyoSphere é branco, ele não será mais visível no sangue após a dissolução.

Importante: Uma agitação excessivamente vigorosa pode causar a ruptura do gel e levar a resultados anormais.

7. Após adicionar e dissolver o QFM LyoSphere, os QFM Blood Collection Tubes devem ser transferidos para uma incubadora a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  o mais rápido possível e dentro de 8 horas após a coleta de sangue.

# Instruções de uso

## Estágio 1 – Incubação de sangue e coleta de plasma

### Materiais fornecidos

- QFM Blood Collection Tubes (consulte "Componentes e armazenamento", página 6)

### Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Consulte "Materiais necessários, mas não fornecidos", página 8

### Procedimento

1. Incube os QFM Blood Collection Tubes contendo 1 ml de alíquotas de sangue com QFM LyoSphere na VERTICAL a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 16 a 24 horas.

Nota: A incubadora não necessita de  $\text{CO}_2$  nem de umidificação.

Após a incubação, os QFM Blood Collection Tubes podem ser mantidos entre  $4^{\circ}\text{C}$  e  $27^{\circ}\text{C}$  por até 3 dias antes da centrifugação.

2. Após a incubação, a coleta de plasma é facilitada centrifugando os QFM Blood Collection Tubes por 15 minutos a  $2000\text{--}3000 \times g$  (RCF). O tampão de gel separará as células do plasma. Se isso não ocorrer, centrifugue os tubos novamente.

É possível coletar o plasma sem centrifugação; contudo, é necessário cuidado adicional para remover o plasma sem perturbar as células.

3. As amostras de plasma devem ser coletadas apenas usando uma pipeta.

Importante: Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma por qualquer meio antes da coleta. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

As amostras de plasma podem ser carregadas diretamente dos QFM Blood Collection Tubes centrifugados na placa QFM ELISA, inclusive quando são usadas estações de trabalho ELISA automatizadas.

As amostras de plasma podem ser armazenadas por até 28 dias entre  $2^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$  ou, se coletadas, abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$  por períodos prolongados. As alíquotas de amostras de plasma coletadas devem ser vedadas antes do armazenamento.

Se estiver coletando amostras de plasma, colete pelo menos  $150 \mu\text{l}$  de plasma para permitir a repetição de testes, se necessário.

A quantidade de IFN- $\gamma$  nas amostras de plasma pode, em geral, estar acima dos limites superiores da maioria dos leitores de ELISA, mesmo quando os indivíduos estão moderadamente imunossuprimidos. Recomenda-se que as amostras de plasma sejam diluídas na proporção de 1:10 e/ou 1:100 no Diluente verde e testadas no ELISA juntamente com o plasma não diluído (consulte o Estágio 2 – executando o IFN- $\gamma$  ELISA).

## Estágio 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

### Materiais fornecidos

- QuantiFERON Monitor 2 Plate Kit ELISA (consulte "Componentes e armazenamento", página 6)

### Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Consulte "Materiais necessários, mas não fornecidos", página 8

### Preparação

O IFN- $\gamma$  no plasma pode, em geral, estar acima dos limites superiores da maioria dos leitores de ELISA, mesmo quando os indivíduos estão moderadamente imunossuprimidos. Recomenda-se que as amostras de plasma sejam diluídas na proporção de 1:10 e/ou 1:100 no Diluente verde e submetidas a ensaio no ELISA juntamente com o plasma não diluído.

Nas situações em que um paciente pode ser fortemente imunossuprimido, a preparação e análise de apenas uma amostra de plasma não diluído pode ser suficiente para obter um resultado quantitativo.

Nota: Os resultados da amostra que estão dentro do intervalo do QFM ELISA (ou seja, até 10 UI/ml) devem ser usados para Interpretação dos resultados. A menor diluição que gera um resultado dentro do intervalo do QFM ELISA deve ser usada como resultado relatado (levando em consideração o fator de diluição) se o plasma não diluído estiver acima do intervalo do QFM ELISA.

### Procedimento

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o Conjugado 100x concentrado, têm de ser colocadas à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) antes de serem usadas. Aguarde, pelo menos, 60 minutos para alcançar o equilíbrio.
2. Remova da estrutura as tiras que não sejam necessárias, vede novamente na bolsa de papel alumínio e retorne ao refrigerador para armazenamento até ser necessária.

Deixe, pelo menos, uma tira para as soluções padrão QFM e tiras suficientes para o número de indivíduos sendo testados. Após o uso, conserve a estrutura e a tampa para usar com as tiras restantes.

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

Importante: O volume de reconstituição da Solução padrão de IFN- $\gamma$  difere entre lotes. Consulte o rótulo do frasco de solução padrão para garantir o uso do volume correto de água deionizada ou destilada.

Use a solução padrão reconstituída do kit para produzir uma diluição de 1:2 seguida de uma série de diluições de 1:4 de IFN- $\gamma$  no Diluente verde (Green Diluent, GD) (consulte Figura 2). 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 em duplicado. Prepare novas diluições da solução padrão do kit para cada sessão do ELISA.

#### Procedimento recomendado para soluções padrão duplicadas

- a. Rotule 4 tubos "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Adicione 150  $\mu$ l de GD a S1, S2, S3 e S4.
- c. Adicione 150  $\mu$ l da solução padrão do kit a S1 e misture bem.
- d. Transfira 50  $\mu$ l do S1 para o S2 e misture bem.
- e. Transfira 50  $\mu$ l do S2 para o S3 e misture bem.
- f. Apenas o Diluente verde (GD) serve como solução padrão zero (S4).

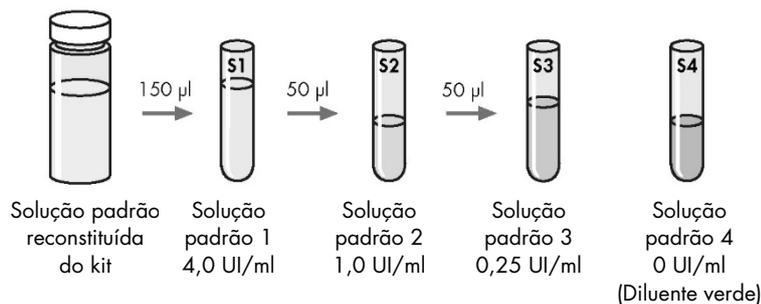


Figura 2. Preparação da curva de solução padrão.

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

O conjugado na concentração de trabalho é preparado diluindo a quantidade necessária de Conjugado 100x concentrado no Dilúente verde (Tabela 1. Preparação do Conjugado). Retorne qualquer Conjugado 100x concentrado não usado a uma temperatura entre 2°C a 8°C imediatamente após o uso. Use apenas o Dilúente verde.

Tabela 1. Preparação do Conjugado

Número de tiras	Volume de Conjugado 100x concentrado	Volume de Dilúente 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

5. Para as amostras de plasma coletadas de tubos de coleta de sangue e subsequentemente armazenadas e congeladas, misture as amostras antes de adicionar ao poço de ELISA.

Importante: Se as amostras de plasma forem adicionadas diretamente dos tubos QFM centrifugados, deverá ser evitada qualquer mistura do plasma. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

6. Recomendado: Dilua as amostras de plasma na proporção de 1:10.
  - Adicione 90 µl de Diluente verde (Green Diluent, GD) a um tubo rotulado com detalhes do paciente e "1:10".
  - Em seguida, adicione 10 µl de amostras de plasma misturado (consulte a etapa 5 para obter detalhes sobre amostras de plasma misturado em comparação com aquelas adicionadas diretamente de tubos QFM centrifugados).
  - Misture bem com uma pipeta, minimizando a formação de espuma.
7. Recomendado: Dilua as amostras de plasma na proporção de 1:100.
  - Prepare uma diluição de 1:10 (consulte a etapa 6 acima).
  - Adicione 90 µl de Diluente verde a um tubo rotulado com detalhes do paciente e "1:100".
  - Adicione 10 µl da diluição de 1:10.
  - Misture bem com uma pipeta, minimizando a formação de espuma.

Recomendado: Teste as seguintes amostras em paralelo e nesta ordem:

- Não diluída, 1:10, 1:100

As seguintes opções de amostra do indivíduo também são suportadas pelo software de análise QFM:

- Não diluída
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Não diluída, 1:10

8. Adicione 50 µl de conjugado na concentração de trabalho recém-preparado aos poços de ELISA necessários usando uma pipeta multicanal.
9. Adicione 50 µl da amostra de plasma de teste aos poços apropriados usando uma pipeta multicanal. Em seguida, adicione 50 µl de cada uma das soluções padrão 1 a 4. Teste as soluções padrão em duplicado.

10. Cubra cada placa com uma tampa e misture bem o conjugado e as amostras/soluções padrão de plasma usando um agitador de microplacas por 1 minuto. Evite salpicos.
11. Incube à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) por  $120 \pm 5$  minutos.  
Durante a incubação, as placas não devem estar expostas à luz solar direta.
12. Durante a incubação, dilua uma parte do Tampão de lavagem 20x concentrado em 19 partes de água deionizada ou destilada e misture bem. É fornecido Tampão de lavagem 20x concentrado suficiente para preparar 2 litros de tampão de lavagem na concentração de trabalho.  
Lave os poços com 400  $\mu\text{l}$  de tampão de lavagem na concentração de trabalho por, pelo menos, 6 ciclos em uma lavadora de microplacas. Recomenda-se uma lavadora automática de placas.  
Uma lavagem meticulosa é muito importante para a realização do ensaio. Verifique se cada poço está completamente preenchido com o tampão de lavagem para cada ciclo de lavagem. Recomendado: Mergulhe os poços por um período de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo para obter melhores resultados.  
Acrescente desinfetante laboratorial padrão ao reservatório de efluentes e siga os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.
13. Bata as placas com a face para baixo na toalha absorvente e sem fiapos para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100  $\mu\text{l}$  de Solução de substrato enzimático a cada poço, cubra a placa com uma tampa e misture bem usando um agitador de microplacas.
14. Incube à temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) por 30 minutos.  
Durante a incubação, as placas não devem estar expostas à luz solar direta.
15. Após a incubação, adicione 50  $\mu\text{l}$  de Solução de parada enzimática a cada poço e misture bem usando um agitador de microplacas.  
A Solução de parada enzimática deve ser adicionada aos poços na mesma ordem e aproximadamente na mesma velocidade usada na adição da Solução de substrato enzimático na etapa 13.
16. Meça a densidade óptica (Optical Density, OD) no prazo de 5 minutos após a interrupção da reação usando 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 óptica (Optical Density, OD) são usados para calcular os resultados.

## Cálculos e interpretação de testes

O QuantiFERON Monitor Analysis Software é usado para analisar dados brutos e para calcular resultados. Está disponível em [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Certifique-se de que seja utilizada a versão mais recente do QuantiFERON Monitor Analysis Software.

O software realiza uma avaliação de controle de qualidade do ensaio, gera uma curva de solução padrão e fornece um resultado de teste para cada indivíduo, conforme detalhado na seção de Interpretação de resultados.

Se o plasma não diluído estiver acima do intervalo superior (ou seja, >10 UI/ml) do QFM ELISA, o QuantiFERON Monitor Analysis Software relatará a menor diluição que gera um resultado dentro do intervalo do QFM ELISA, levando em consideração o fator de diluição.

Como alternativa ao uso do QuantiFERON Monitor Analysis Software, os resultados podem ser determinados de acordo com o método a seguir.

### Geração da curva de solução padrão

(Se o QuantiFERON Monitor Analysis Software não for usado)

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

Construa uma curva de solução padrão de  $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$  traçando o  $\log_{(e)}$  da densidade óptica (Optical Density, OD) média (eixo Y) em relação ao  $\log_{(e)}$  da concentração de IFN- $\gamma$  das soluções padrão em UI/ml (eixo X), omitindo desses cálculos a solução padrão zero. Calcule a linha de melhor ajuste para a curva de solução padrão por análise de regressão.

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

Esses cálculos podem ser realizados usando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas e com o software de folha de cálculo ou estatístico padrão (como o software Excel<sup>®</sup> Microsoft<sup>®</sup>). Recomenda-se que sejam usados esses pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (coefficient of variation, %CV) para as soluções padrão e o coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva de solução padrão.

O resultado relatado deve ser obtido da menor diluição que gera um resultado dentro do intervalo do QFM ELISA (levando em consideração o fator de diluição) se o plasma não diluído estiver acima do intervalo do QFM ELISA.

## Controle de qualidade do teste

A precisão dos resultados de teste depende da geração de uma curva de solução padrão precisa. Portanto, os resultados derivados das soluções padrão devem ser examinados antes que os resultados das amostras de teste possam ser interpretados.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de densidade óptica (Optical Density, OD) médio da Solução padrão 1 deve ser  $\geq 0,600$ .
- O %CV dos valores de densidade óptica (optical density, OD) replicados da Solução padrão 1 e da Solução padrão 2 tem de ser  $\leq 15\%$ .
- Os valores de densidade óptica (optical density, OD) replicados da Solução padrão 3 e da Solução padrão 4 não podem variar mais do que 0,040 unidades de densidade óptica em relação a sua média.
- O coeficiente de correlação ( $r$ ) calculado a partir dos valores médios de absorbância das soluções padrão tem de ser  $\geq 0,98$ .

O QuantiFERON Monitor Analysis Software calcula e relata esses parâmetros de controle de qualidade.

Se os critérios acima não forem atendidos, a execução será inválida e deverá ser repetida.

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

## Interpretação dos resultados

Os resultados do QFM são interpretados dependendo da resposta de IFN- $\gamma$  aos estimulantes imunológicos inatos e adaptativos. O ensaio QFM fornece uma medição qualitativa e quantitativa da função imune. Os resultados do QFM podem não quantificar diretamente o nível de supressão imunológica.

Importante: Ao estabelecer o estado imunológico de um indivíduo, o nível de IFN- $\gamma$  medido deve ser usado em conjunto com a apresentação clínica, o histórico médico e outras avaliações de diagnóstico (Tabela 2). O limiar do teste QFM pode variar dependendo do nível de imunossupressão de um indivíduo e das configurações de transplante individuais.

Tabela 2. Interpretação dos resultados

Resultado do QFM quanto ao IFN- $\gamma$ ( UI/ml)	Classificação	Interpretação
<15	Baixa	O indivíduo tem baixa resposta de IFN- $\gamma$ a estimulantes imunológicos inatos e adaptativos
15–1000	Moderada	O indivíduo tem resposta moderada de IFN- $\gamma$ a estimulantes imunológicos inatos e adaptativos
>1000	Alta	O indivíduo tem alta resposta de IFN- $\gamma$ a estimulantes imunológicos inatos e adaptativos

Se o nível de IFN- $\gamma$  medido de uma amostra de plasma não diluído for inferior a 0,1 UI/ml:

- Verifique se o QFM LyoSphere foi adicionado à amostra de sangue e se o tubo foi incubado conforme as instruções neste folheto informativo.
- Verifique se o resultado de IFN- $\gamma$  corresponde ao estado clínico atual do indivíduo.

Se suspeitar de problemas técnicos com a coleta ou o manuseio das amostras de sangue, repita todo o ensaio QFM com uma nova amostra de sangue. Repita o teste ELISA de amostras de plasma estimulado se suspeitar de que o teste original apresenta divergências em relação ao procedimento descrito neste folheto informativo (consulte a seção Controle de qualidade do teste para obter detalhes).

O médico pode desejar repetir o teste se os resultados forem inconsistentes com o estado clínico atual do indivíduo.

## Limitações

Os resultados do teste QFM têm de ser usados em conjunto com a história clínica, o estado médico atual e outras avaliações de diagnóstico de cada indivíduo. Os laboratórios podem optar por estabelecer seus próprios intervalos para o ensaio.

Os laboratórios também podem optar por correr um espécime de controle externo coletado de um indivíduo saudável em paralelo com os espécimes dos pacientes.

Poderão ocorrer resultados não confiáveis ou inexatos devido a:

- Anticoagulante sanguíneo incorreto – use apenas heparina de lítio, pois outros anticoagulantes interferem no ensaio.
- Divergências em relação ao procedimento descrito neste folheto informativo.
- Níveis excessivos de IFN- $\gamma$  circulante ou presença de anticorpos heterófilos.
- Mais de 8 horas entre a coleta do espécime de sangue e a incubação a 37°C.
- Tubos de sangue QFM com enchimento insuficiente ou excessivo, fora do intervalo de 0,9 a 1,1 ml.

## Características de desempenho

### Estudos clínicos

Foram realizados dois estudos clínicos para avaliar as respostas de indivíduos aparentemente saudáveis (n=114) em comparação com receptores de transplante (n=30). Dos receptores de transplante, 18 estavam na coorte pós-transplante precoce (Early Post-Tx, dentro de 3 meses após o transplante) e 12 estavam na coorte pós-transplante tardio ou coorte estável (Late Post-Tx, >12 meses após o transplante).

- As amostras foram coletadas em até 5 momentos de cada indivíduo na Early Post-Tx (3 meses da coorte pós-transplante, n=64 amostras).
- As amostras foram coletadas uma vez de cada indivíduo na Late Post-Tx (coorte pós-transplante tardio, n=12 amostras)
- As amostras foram coletadas 1 vez de cada indivíduo na coorte aparentemente saudável (n=114)

As respostas ao QFM variaram entre baixa e moderada nas amostras da Early Post-Tx e da Late Post-Tx. A Early Post-Tx teve uma percentagem maior (93,8%) de respostas dentro do intervalo baixo e uma percentagem menor de respostas (6,3%) dentro do intervalo moderado em comparação com as respostas da Late Post-Tx, com 25% de respostas no intervalo baixo e 66,7% no intervalo moderado (Tabela 3). Nenhuma resposta da Early Post-Tx estava no intervalo de resposta alta, enquanto apenas 1 (8,3%) resposta nas amostras da Late Post-Tx estava no intervalo de resposta alta. As respostas ao QFM na coorte aparentemente saudável estavam principalmente no intervalo moderado (83,3%) e no intervalo de alta resposta (15,8%) (Tabela 3).

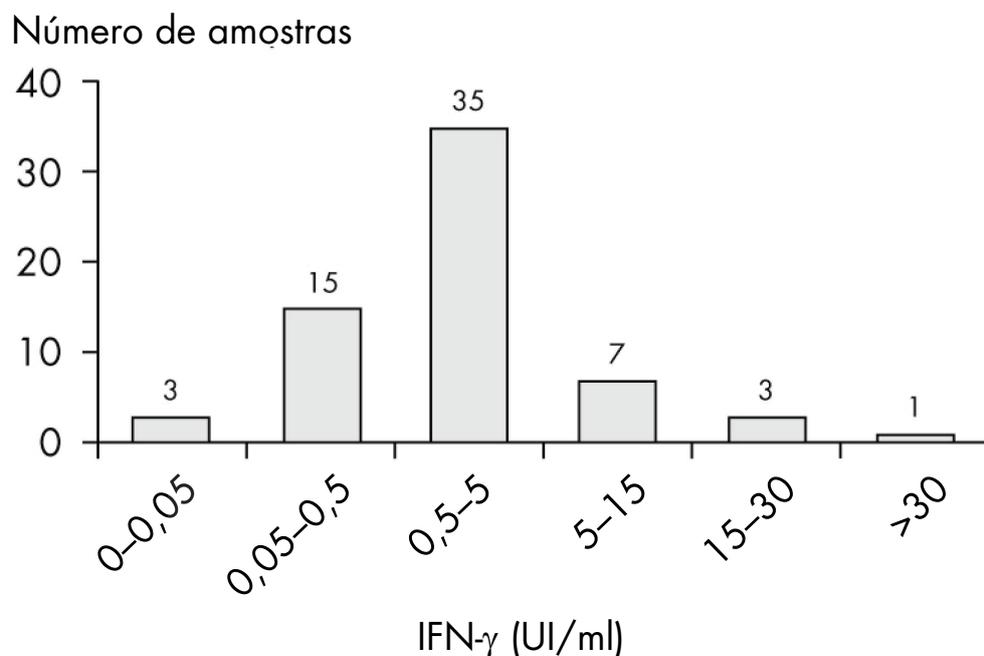
Tabela 3. O intervalo de resposta ao QFM em indivíduos aparentemente saudáveis vs. receptores de transplante

IFN- $\gamma$ (UI/ml)	Categoria de resultados	Early Post-Tx %* IC de 95% n	Late Post-Tx %* IC de 95% n	Aparentem ente saudável %* IC de 95% n	Total de resultados
<15	Baixa	93,8% 85,0–97,5 n=60	25,0% 8,9–53,2 n=3	0,9% 0,2–4,8 n=1	64
15–1000	Moderada	6,3% 2,5–15,0 n=4	66,7% 39,1–86,2 n=8	83,3% 75,4–89,1 n=95	107
>1000	Alta	0,0% 0–5,7 n=0	8,3% 1,5–35,4 n=1	15,8% 10,2–23,6 n=18	19
Total de amostras		64	12	114	190

\* As percentagens indicam a proporção de amostras dentro de cada coorte de doadores que se enquadram no intervalo de resposta específico.

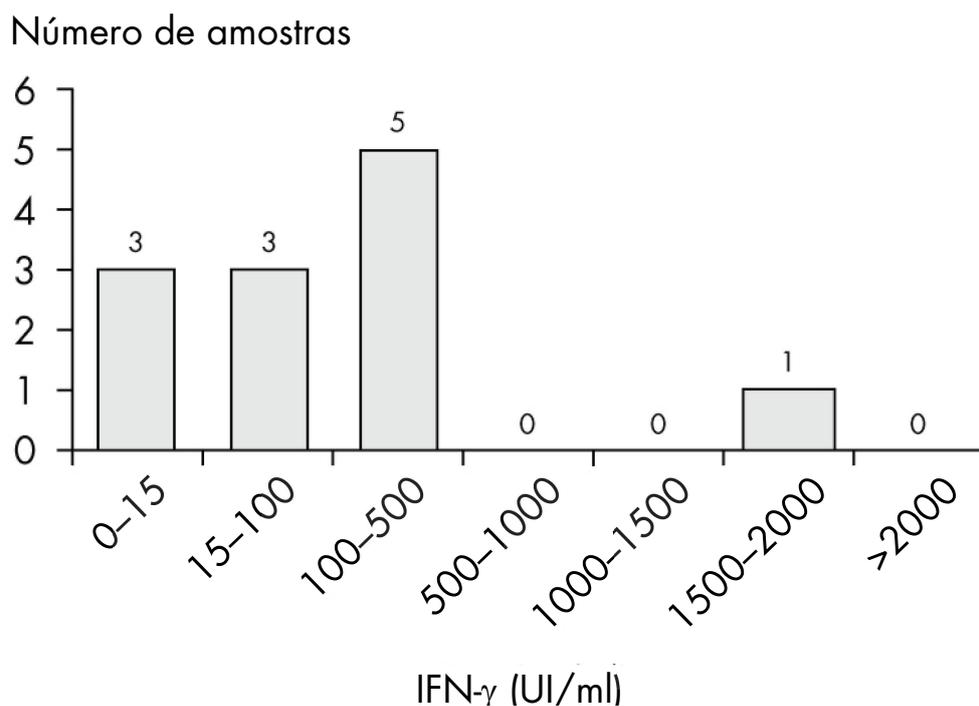
## Valores esperados

A distribuição das respostas de IFN- $\gamma$  ao QFM em pacientes pós-transplante precoce (até 3 meses após o transplante) foi determinada a partir de 64 amostras coletadas de 18 receptores de transplante usando o QFM ELISA (Figura 3).



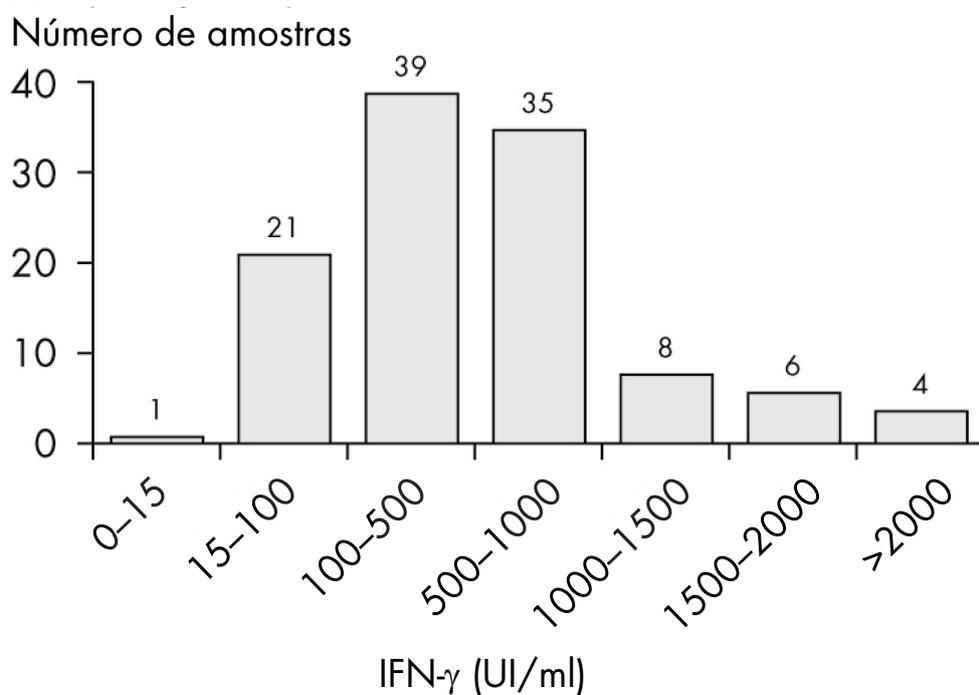
**Figura 3.** Distribuição das respostas de IFN- $\gamma$  ao QFM em pacientes pós-transplante precoce (n=64; mediana=1,5 UI/ml).

A distribuição das respostas de IFN- $\gamma$  ao QFM em pacientes pós-transplante tardio (>12 meses após o transplante) foi determinada a partir de 12 amostras usando o QFM ELISA (Figura 4).



**Figura 4.** Distribuição das respostas de IFN- $\gamma$  ao QFM em pacientes pós-transplante tardio (n=12; mediana=98,8 UI/ml).

A distribuição das respostas de IFN- $\gamma$  ao QuantiFERON Monitor em indivíduos aparentemente saudáveis foi determinada a partir de 114 amostras usando o QFM ELISA (Figura 5).



**Figura 5.** Distribuição das respostas de IFN- $\gamma$  ao QFM em pacientes aparentemente saudáveis (n=114; mediana=400,5 UI/ml).

## Respostas de QFM em pacientes com transplante de órgãos sólidos

O QFM foi avaliado em um estudo observacional transversal de pacientes transplantados de órgãos sólidos (4). O estudo incluiu: 212 indivíduos saudáveis com um subgrupo de 30 controles pareados por idade e sexo, 30 pacientes pré-transplante, 18 pacientes pós-transplante precoce (66 amostras; tempo médio pós-transplante=21 dias) e 11 pacientes pós-transplante tardio (tempo médio pós-transplante=2290 dias). A produção média de IFN- $\gamma$  foi de 555,2 UI/ml em controles saudáveis e 614,6 UI/ml em controles pareados por idade e sexo. A produção média de IFN- $\gamma$  mostrou-se significativamente menor nos pacientes pré-transplante (IFN- $\gamma$ = 89,3 UI/ml) e pacientes pós-transplante precoce (IFN- $\gamma$ =3,76 UI/ml) em comparação com os controles pareados por idade e sexo ( $p<0,001$ ). A restauração da função imune nos pacientes pós-transplante tardio (IFN- $\gamma$  médio=256,1 UI/ml) foi observada e demonstrou ser significativamente maior do que nos pacientes pós-transplante precoce ( $p<0,05$ ). Este estudo indica que o QFM pode ser usado para avaliar a função imune mediada por células na população de transplantes de órgãos sólidos imunossuprimidos.

## Características do desempenho do ensaio

Demonstrou-se que o QFM ELISA é linear colocando aleatoriamente cinco réplicas de 11 pools de plasma de concentrações conhecidas de IFN- $\gamma$  na placa de ELISA. A linha de regressão linear tem uma inclinação de  $1,002 \pm 0,011$  e um coeficiente de correlação de 0,99 (Figura 6).

O limite de detecção do QFM ELISA é de 0,065 UI/ml e não há evidências de um efeito (prozona) gancho de alta dose com concentrações de IFN- $\gamma$  até 10.000 UI/ml.

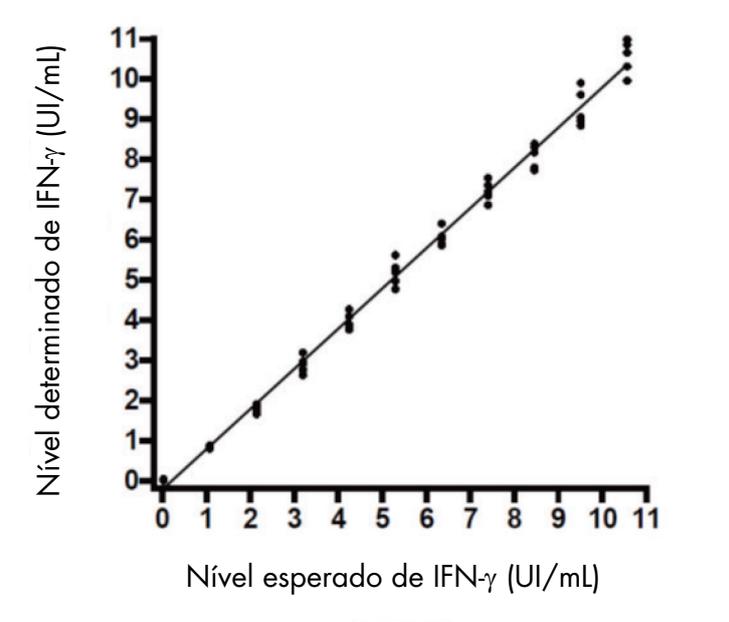


Figura 6. Perfil de linearidade do QFM ELISA, determinado com base no teste de cinco réplicas de 11 amostras de plasma de concentrações conhecidas de IFN- $\gamma$ .

A reprodutibilidade do ensaio QFM (Estágio 1) foi determinada usando amostras de sangue de 20 indivíduos saudáveis. Foram avaliados três diferentes operadores, lotes QFM LyoSphere e conjuntos de equipamentos. O coeficiente médio de variação dos níveis de resposta de IFN- $\gamma$  determinados usando o QFM ELISA nos três lotes de QFM LyoSpheres e nas três condições testadas foi de 22,22% (IC de 95%: 17,20–27,25).

A repetibilidade do ensaio QFM (Estágio 1) foi avaliada medindo a variabilidade de 5–6 repetições de estímulos sanguíneos com o QFM LyoSphere no mesmo doador em 14 indivíduos. O coeficiente médio de variação entre os 14 indivíduos testados foi de 14,7% (IC de 95%: 10,2–19,2). O %CV de indivíduos específicos foi inferior a 30%.

A reprodutibilidade do QFM ELISA (Estágio 2) foi estimada testando 20 amostras de plasma com concentrações variáveis de IFN- $\gamma$  em réplicas de três, em três laboratórios, em três dias não consecutivos e por três operadores. Assim, cada amostra foi testada 27 vezes, em nove corridas de ensaio independentes. Uma amostra era um controle de tubo de Nil e tinha uma concentração calculada de IFN- $\gamma$  de 0,08 UI/ml (IC de 95%: 0,07–0,09). Das 19 amostras restantes de plasma, o intervalo de concentrações foi de 0,33 (IC de 95%: 0,31–0,34) a 7,7 UI/ml (IC de 95%: 7,48–7,92).

A imprecisão intracorrída ou intraensaio foi estimada por meio do cálculo da média de %CVs para cada amostra de plasma testada contendo IFN- $\gamma$  de cada corrida de placa (n=9) e variou de 4,1 a 9,1% de CV. O %CV médio intracorrída (IC de  $\pm$ 95%) foi de 6,6%  $\pm$  0,6%. A média do plasma de IFN- $\gamma$  zero foi de 14,1% de CV.

A imprecisão total ou interensaio foi determinada por meio da comparação de 27 concentrações calculadas de IFN- $\gamma$  para cada amostra de plasma. A imprecisão interensaio variou de 6,6 a 12,3% de CV. O %CV médio geral (IC de  $\pm$ 95%) foi de 8,7%  $\pm$  0,7%. O plasma de IFN- $\gamma$  zero apresentou um CV de 26,1%. Esse nível de variação deve ser esperado porque a concentração calculada de IFN- $\gamma$  é baixa e a variação em torno de uma estimativa baixa de concentração será maior do que isso para concentrações mais elevadas.

## Informações técnicas

### Amostras de plasma coaguladas

Caso ocorram coágulos de fibrina com o armazenamento a longo prazo de amostras de plasma, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

## Guia de solução de problemas

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

### Solução de problemas do ELISA

---

#### Desenvolvimento inespecífico de cores

Possível causa	Solução
a) Lavagem incompleta da placa	Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, a depender da lavadora sendo usada. É necessário usar um tempo de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre os ciclos.
b) Contaminação cruzada de poços de ELISA	Tome cuidado ao pipetar e misturar amostras para minimizar os riscos.
c) Kit/componentes vencidos	Garanta que o kit seja usado antes do prazo de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado 100x concentrado sejam usados dentro de 3 meses a partir da data de reconstituição.
d) A Solução de substrato enzimático está contaminada	Descarte o substrato se apresentar coloração azul. Certifique-se de que sejam usados reservatórios limpos de reagente.
e) Mistura do plasma em tubos QFM antes da coleta	Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma por qualquer meio antes da coleta. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

#### Leituras de baixa densidade óptica das soluções padrão

Possível causa	Solução
a) Erro de diluição da solução padrão	Certifique-se de que as diluições da solução padrão do kit sejam preparadas corretamente, de acordo com este folheto informativo.

## Solução de problemas do ELISA

---

- |   |  |
|---|--|
| b) Erro de pipetagem                          | Verifique se as pipetas estão calibradas e se são usadas de acordo com as instruções do fabricante.  |
| c) Temperatura de incubação muito baixa       | A incubação do ELISA deve ser realizada em temperatura ambiente ( $17^{\circ}\text{C} \pm 27^{\circ}\text{C}$ ).   |
| d) Tempo de incubação muito curto             | Incube a placa com o conjugado, as soluções padrão e amostras por $120 \pm 5$ minutos. Incube a Solução de substrato enzimático na placa por 30 minutos.   |
| e) Filtro incorreto de leitor de placas usado | A placa deve ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm.   |
| f) Os reagentes estão muito frios             | Todos os reagentes, com exceção do Conjugado 100x concentrado, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isso leva aproximadamente uma hora.  |
| g) O kit/componentes venceram                 | Garanta que o kit seja usado antes do prazo de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado 100x concentrado sejam usados dentro de 3 meses a partir da sua data de reconstituição. |

### Fundo alto

#### Possível causa

#### Solução

- |  |  |
|--|--|
| a) Lavagem incompleta da placa         | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com $400 \mu\text{l}$ /poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, a depender da lavadora sendo usada. É necessário usar um tempo de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre os ciclos. |
| b) Temperatura de incubação muito alta | A incubação do ELISA deve ser realizada em temperatura ambiente ( $17^{\circ}\text{C} \pm 27^{\circ}\text{C}$ ).   |

## Solução de problemas do ELISA

---

- |   |   |
|---|---|
| c) Kit/componentes vencidos                           | Garanta que o kit seja usado antes do prazo de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado 100x concentrado sejam usados dentro de três meses a partir da data de reconstituição. |
| d) A Solução de substrato enzimático está contaminada | Descarte o substrato se apresentar coloração azul. Certifique-se de que sejam usados reservatórios limpos de reagente.  |

### Curva de solução padrão não linear e variabilidade duplicada

Possível causa	Solução
a) Lavagem incompleta da placa	Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, a depender da lavadora sendo usada. É necessário usar um tempo de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre os ciclos.
b) Erro de diluição da solução padrão	Certifique-se de que as diluições da solução padrão sejam preparadas corretamente, de acordo com este folheto informativo.
c) Mistura mal efetuada	Misture bem os reagentes por inversão ou vórtice suave antes da adição à placa.
d) Técnica inconsistente ou interrupção da pipetagem durante a preparação do ensaio	A adição de amostra e solução padrão deve ser realizada de maneira contínua. Todos os reagentes devem ser preparados antes do início do 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

Uma lista abrangente de referências QFM está localizada no Gnowee — a biblioteca de referência QuantiFERON, disponível em [www.gnowee.net](http://www.gnowee.net).

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2012) *Cellular and Molecular Immunology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier/Sanders.

2. Fernández-Ruiz, M., Kumar, D., and Humar, A. (2014) Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. Clin. Transl. Immunol. **3**, e12.
3. Sood, S. and Testro, A.G. (2014) Immune monitoring post liver transplant. World J. Transplant. **4**, 30.
4. Sood, S. (2014) A novel biomarker of immune function and initial experience in a transplant population. Transpl. J. **97**, e50.

## Símbolos



Suficiente para preparações de amostras 2 x 96



Fabricante legal



Símbolo de marcação CE-IVD



Para uso em diagnóstico in vitro



Código de lote



Referência



Data de validade



Limites de temperatura



Consultar as instruções de uso



Não reutilizar



Conservar ao abrigo da luz solar



Representante autorizado na Comunidade Europeia

## Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, ligue gratuitamente para 00800-22-44-6000, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico no site [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) ou entre em contato com um dos Departamentos de Serviço Técnico da QIAGEN (consulte a contracapa ou acesse [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Procedimento de teste abreviado

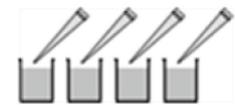
## Estágio 1 – incubação de sangue

1. Colete o sangue do paciente em um QFM Blood Collection Tube ou em um tubo de coleta de sangue de heparina de lítio. Rotule os tubos com os detalhes do paciente e o horário da coleta de sangue e, em seguida, transporte para o laboratório em temperatura ambiente dentro de 8 horas após a coleta.
  - a. Se o sangue foi coletado no tubo de heparina de lítio, coloque 1 ml de sangue em um QFM Blood Collection Tube e rotule o tubo com detalhes do paciente e o horário da coleta de sangue
2. Adicione 1 QFM LyoSphere a cada QFM Blood Collection Tube contendo 1 ml de sangue, dissolva o LyoSphere. Em seguida, incube os tubos o mais rápido possível (dentro de 8 horas após a coleta de sangue) na **vertical** por 16–24 horas a 37°C.
3. Após a incubação, centrifugue os tubos por 15 minutos a 2000–3000 x g (RCF) para separar o plasma e as hemácias.
4. Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma por qualquer meio antes da coleta. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.



## Estágio 2 – IFN- $\gamma$ ELISA

1. Coloque os componentes do ELISA, com exceção do Conjugado 100x concentrado, em temperatura ambiente por, pelo menos, 60 minutos.
2. Reconstitua a solução padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou deionizada. Prepare 4 diluições de solução padrão.
3. Reconstitua o Conjugado 100x concentrado liofilizado com água deionizada ou destilada.
4. Prepare o conjugado na concentração de trabalho no Diluente verde e adicione 50  $\mu$ l a todos os poços.
5. Adicione 50  $\mu$ l de amostras de plasma de teste (não diluídas, diluições de 1:10 e 1:100, conforme apropriado) e soluções padrão de 50  $\mu$ l aos poços apropriados. Misture com o agitador.
6. Incube em temperatura ambiente por  $120 \pm 5$  minutos.
7. Lave os poços, no mínimo, 6 vezes com 400  $\mu$ l/poço de tampão de lavagem.
8. Adicione 100  $\mu$ l de Solução de substrato enzimático aos poços. Misture com o agitador.
9. Incube em temperatura ambiente por 30 minutos.
10. Adicione 50  $\mu$ l de Solução de parada enzimática a todos os poços. Misture com o agitador.
11. Leia os resultados a 450 nm com um filtro de referência de 620 a 650 nm.
12. Analise os resultados.



## Notas

## Alterações significativas

Alterações significativas nesta edição do folheto informativo do QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA estão resumidas na tabela abaixo:

<b>Seção</b>	<b>Página</b>	<b>Alterações</b>
Precauções	11	Novas informações do GHS
Precauções	12	Adição de instruções de segurança relacionadas aos frascos que possuem lacres metálicos.

## Notas



Marcas registradas: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (QIAGEN Group); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLymph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Acordo de licença limitada do QuantiFERON Monitor Kit.

O uso deste produto implica a aceitação, por parte de qualquer comprador ou usuário do produto, dos seguintes termos:

1. O produto pode ser usado somente de acordo com os protocolos fornecidos com o produto e esse manual e para uso com componentes contidos apenas no kit. A QIAGEN não concede licença para qualquer uma de suas propriedades intelectuais para usar ou incorporar os componentes desse kit com quaisquer componentes não incluídos nele, exceto conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, esse manual e protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infrinjam os direitos de terceiros.
2. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Esse kit e seus componentes são licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN renuncia especificamente a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, à exceção das expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do kit concordam em não tomar ou permitir que qualquer outra pessoa tome medidas que possam levar a ou facilitar qualquer um dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos seus custos de investigação e de Tribunal, incluindo honorários de advogados, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Acordo de licença limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

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

© 2014 QIAGEN, Todos os direitos reservados.

Notas

## Notas

---

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

Australia ■ [techservice-au@qiagen.com](mailto:techservice-au@qiagen.com)

Austria ■ [techservice-at@qiagen.com](mailto:techservice-at@qiagen.com)

Belgium ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Brazil ■ [suportetecnico.brasil@qiagen.com](mailto:suportetecnico.brasil@qiagen.com)

Canada ■ [techservice-ca@qiagen.com](mailto:techservice-ca@qiagen.com)

China ■ [techservice-cn@qiagen.com](mailto:techservice-cn@qiagen.com)

Denmark ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Finland ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

France ■ [techservice-fr@qiagen.com](mailto:techservice-fr@qiagen.com)

Germany ■ [techservice-de@qiagen.com](mailto:techservice-de@qiagen.com)

Hong Kong ■ [techservice-hk@qiagen.com](mailto:techservice-hk@qiagen.com)

India ■ [techservice-india@qiagen.com](mailto:techservice-india@qiagen.com)

Ireland ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

Italy ■ [techservice-it@qiagen.com](mailto:techservice-it@qiagen.com)

Japan ■ [techservice-jp@qiagen.com](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

Korea (South) ■ [techservice-kr@qiagen.com](mailto:techservice-kr@qiagen.com)

Luxembourg ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Mexico ■ [techservice-mx@qiagen.com](mailto:techservice-mx@qiagen.com)

The Netherlands ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Norway ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Singapore ■ [techservice-sg@qiagen.com](mailto:techservice-sg@qiagen.com)

Sweden ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Switzerland ■ [techservice-ch@qiagen.com](mailto:techservice-ch@qiagen.com)

UK ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

