

Abril de 2019

Folheto informativo do QuantiFERON[®]-TB Gold Plus (QFT[®]-Plus) ELISA



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Versão 1

IVD

Para uso em diagnóstico in vitro

Respostas do teste de medição de IFN- γ para antígenos peptídicos
ESAT-6 e CFP-10 no sangue total



REF

622120, 622822



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Alemanha

R1 **MAT**

1083163PT-BR

Sample to Insight



Conteúdo

Uso previsto	5
Resumo e explicação do teste	5
Princípios do ensaio	7
Tempo necessário para realizar o ensaio	9
Componentes e armazenamento	10
Materiais necessários, mas não fornecidos	12
Armazenamento e manuseio de espécimes	13
Tubos de coleta de sangue	13
Reagentes do kit	13
Reagentes reconstituídos e não usados	13
Avisos e precauções	14
Avisos	14
Precauções	15
Coleta e manuseio de espécimes	18
Instruções de uso	24
Estágio 1 – Incubação de sangue e coleta de plasma	24
Estágio 2 – IFN- γ ELISA	25
Cálculos e interpretação de testes	30
Geração da curva de solução padrão	30
Controle de qualidade do teste	31
Interpretação dos resultados	31
Limitações	34

Características de desempenho	35
Estudos clínicos	35
Características do desempenho do ensaio	41
Informações técnicas	46
Resultados indeterminados	46
Amostras de plasma coaguladas	46
Guia de solução de problemas	47
Referências	49
Símbolos	59
Informações de contato	60
Procedimento de teste abreviado	61
Estágio 1 – Incubação do sangue	61
Estágio 2 – IFN- γ ELISA	61
Alterações significativas	63
Histórico de revisões do manual	63

Uso previsto

O ensaio QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) é um teste de diagnóstico *in vitro* que usa um coquetel de peptídeos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10 para estimular células no sangue total heparinizado. A detecção de interferon- γ (IFN- γ) por ensaio de imunoabsorção enzimática (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) é usada para identificar respostas *in vitro* a esses antígenos peptídicos associados à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

O QFT-Plus é um teste indireto para infecção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e destinado ao uso em conjunto com a avaliação de riscos, radiografia e outras avaliações clínicas e de diagnóstico.

Resumo e explicação do teste

A tuberculose é uma doença transmissível causada pela infecção por organismos do complexo *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), que normalmente se espalham para novos hospedeiros por meio de núcleos de gotículas no ar de pacientes com tuberculose respiratória. Um indivíduo recém-infectado pode adoecer devido à tuberculose dentro de semanas a meses, mas a maioria dos indivíduos infectados permanece bem. A infecção latente de tuberculose (ILT), uma condição assintomática não transmissível, persiste em alguns, que poderão desenvolver tuberculose meses ou anos mais tarde. O principal objetivo de diagnosticar a ILTB é o de considerar o tratamento clínico para prevenir a tuberculose. Até recentemente, o teste cutâneo tuberculínico (TCT) era o único método disponível para o diagnóstico da ILTB. A sensibilidade cutânea à tuberculina se desenvolve entre 2 a 10 semanas após a infecção. No entanto, alguns indivíduos infectados, incluindo aqueles com uma ampla série de patologias que prejudicam as funções imunológicas, mas também outros sem essas condições, não respondem à tuberculina. Por outro lado, alguns indivíduos com baixa probabilidade de estarem infectados com *M. tuberculosis* apresentam sensibilidade à tuberculina e resultados do TCT positivos após

a vacinação com *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), infecção por microbactérias que não incluem o complexo *M. tuberculosis* ou outros fatores indeterminados.

É necessário distinguir a ILTB da tuberculose, uma doença de notificação obrigatória que normalmente envolve os pulmões e o trato respiratório inferior, embora outros sistemas orgânicos possam também ser afetados. A tuberculose é diagnosticada a partir de conclusões históricas, físicas, radiológicas, histológicas e microbacteriológicas.

O QFT-Plus é um teste para respostas imunológicas mediadas por células (Cell-Mediated Immune, CMI) a antígenos peptídicos que simulam proteínas microbacterianas. Essas proteínas, ESAT-6 e CFP-10, estão ausentes de todas as cepas de BCG e da maioria das microbactérias não tuberculosas, com exceção de *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1). Geralmente, indivíduos infectados com organismos do complexo MTB possuem linfócitos no sangue que reconhecem esses e outros antígenos microbacterianos. Este processo de reconhecimento envolve a geração e secreção da citocina IFN- γ . A detecção e subsequente quantificação de IFN- γ constitui a base deste teste.

Os antígenos usados no QFT-Plus são um coquetel peptídico que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10. Numerosos estudos demonstram que esses antígenos peptídicos estimulam as respostas de IFN- γ nas células T de indivíduos infectados com *M. tuberculosis*, mas geralmente não em pessoas não infectadas ou vacinadas com BCG sem a doença ou risco de ILTB (1–32). No entanto, tratamentos clínicos ou condições que comprometam a funcionalidade imunológica podem potencialmente reduzir as respostas de IFN- γ . Os pacientes com certas infecções microbacterianas poderão também responder a ESAT-6 e CFP-10, uma vez que os genes que codificam essas proteínas estão presentes em *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1, 23). O QFT-Plus é um teste de ILTB e uma ajuda útil para diagnosticar uma infecção do complexo *M. tuberculosis* em pacientes doentes. Um resultado positivo corrobora o diagnóstico de tuberculose; todavia, infecções provocadas por outras microbactérias (por exemplo, *M. kansasii*) poderão 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 TB distintos: TB Antigen Tube 1 (TB1) e TB Antigen Tube 2 (TB2). Ambos os tubos contêm antígenos peptídicos dos antígenos associados ao complexo MTB, ESAT-6 e CFP-10. Enquanto o tubo TB1 contém peptídeos de ESAT-6 e CFP-10 concebidos para induzir respostas CMI de linfócitos T CD4⁺ auxiliares, o tubo TB2 contém um conjunto adicional de peptídeos orientados para a indução de respostas CMI de linfócitos T citotóxicos CD8⁺. Na história natural da infecção por MTB, as células T CD4⁺ desempenham um papel fundamental no controle imunológico através da secreção de citocina IFN- γ . As evidências atuais corroboram um papel das células T CD8⁺ na defesa do hospedeiro contra MTB produzindo IFN- γ e outros fatores solúveis que ativam macrófagos para suprimir o crescimento de MTB, destruir as células infectadas ou realizar diretamente a lise de MTB intracelular (33–35). As células CD8⁺ específicas de MTB foram detectadas em indivíduos com ILTB e com TB ativa, onde células CD8⁺ produtoras de IFN- γ podem ser frequentemente encontradas (36–38). Além disso, os linfócitos T CD8⁺ específicos para ESAT-6 e CFP-10 são descritos como sendo mais frequentemente detectados em indivíduos com TB ativa comparativamente a ILTB e podem estar associados a uma exposição recente a MTB (39–41). Adicionalmente, células T CD8⁺ específicas de MTB produtoras de IFN- γ foram também detectadas em indivíduos com TB ativa com coinfeção por HIV (42, 43) e em crianças com TB (44).

Princípios do ensaio

O ensaio QFT-Plus usa tubos especializados para coleta de sangue, que são usados para coletar sangue total. A incubação do sangue nos tubos ocorre durante 16 a 24 horas, após as quais o plasma é coletado e testado quanto à presença de IFN- γ produzido em resposta aos antígenos peptídicos.

O teste QFT-Plus é realizado em dois estágios. Primeiramente, o sangue total é coletado para cada um dos QFT-Plus Blood Collection Tubes, que incluem um tubo Nil, um tubo TB1, um tubo TB2 e um tubo Mitogen. Alternativamente, o sangue pode ser coletado em um único tubo genérico de coleta de sangue contendo heparina de lítio ou heparina de sódio como anticoagulante e, em seguida, transferido para tubos QFT-Plus.

O tubo Mitogen é usado com o teste QFT-Plus como controle positivo. Isso poderá ser importante caso haja dúvidas quanto ao estado imunológico do indivíduo. O tubo Mitogen também atua como controle para manuseio e incubação corretos do sangue.

Os tubos QFT-Plus são agitados para misturar o antígeno com o sangue e, logo que possível, devem ser incubados a 37°C dentro de 16 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- γ (UI/ml) é medida pelo ELISA. O QFT-Plus ELISA usa a solução padrão IFN- γ humano recombinante, que foi testada com uma preparação de IFN- γ de referência (Ref NIH: Gxg01-902-535). Os resultados da amostra de teste são indicados em Unidades Internacionais por ml (UI/ml) relativamente à curva da solução padrão preparada testando as diluições da solução padrão fornecida com o kit.

Os anticorpos heterófilos (por ex., anti-camundongo humano) no soro ou plasma de certos indivíduos causam interferência nos imunoenaios. O efeito de anticorpos heterófilos no QFT-Plus ELISA é minimizado pela adição de soro normal de camundongo ao Diluente verde e pelo uso de fragmentos de anticorpo monoclonal F(ab')₂ como o anticorpo de captura de IFN- γ no revestimento dos da microplaca.

Um ensaio QFT-Plus é considerado positivo para uma resposta de IFN- γ a qualquer tubo de antígeno TB que está significativamente acima do valor de Nil de IFN- γ em UI/ml. A amostra de plasma do tubo Mitogen serve como controle positivo de IFN- γ para cada espécime testado. Uma resposta baixa a Mitogen (<0,5 UI/ml) indica um resultado indeterminado quando uma amostra de sangue também tem uma resposta negativa aos antígenos TB. Esse padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, atividade reduzida dos linfócitos devido ao manuseio inadequado do espécime, enchimento/mistura incorreta do tubo Mitogen ou incapacidade de os linfócitos do paciente gerarem IFN- γ . Níveis elevados de IFN- γ na amostra Nil podem ocorrer com a presença de anticorpos heterófilos ou com secreção de IFN- γ intrínseca. O tubo Nil se ajusta aos efeitos de fundo (por ex., níveis elevados de IFN- γ circulante ou presença de anticorpos heterófilos). O nível de IFN- γ do tubo Nil é subtraído do nível de IFN- γ para os tubos de antígeno TB e o tubo Mitogen.

Tempo necessário para realizar o ensaio

O tempo necessário para realizar o QFT-Plus ELISA está 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:

Aprox. 3 horas para uma placa de ELISA

(22 indivíduos)

<1 hora de trabalho

Adicionar 10 a 15 minutos para cada placa extra

Componentes e armazenamento

Tubos de coleta de sangue*		200 tubos	Pacote para um único paciente	Pacote de dispensação	200 tubos para HA	Pacote para um único paciente para HA	Embalagem de dispensação para HA
Ref.		622526	622222	622423	623526	623222	623423
Número de testes/pacote		50	10	25	50	10	25
QuantiFERON Nil Tube (tampa cinza, 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 roxa, anel branco)	Mitogen	50 tubos	10 tubos	25 tubos			
QuantiFERON Nil HA Tube (tampa cinza, 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 roxa, anel amarelo)	Mitogen HA				50 tubos	10 tubos	25 tubos
Folheto informativo dos QFT-Plus Blood Collection Tubes		1	1	1	1	1	1

* Nem todas as configurações de produto estão disponíveis em todos os países. Consulte o atendimento ao cliente da QIAGEN (detalhes em www.qiagen.com) para obter mais informações sobre as configurações disponíveis para encomenda.

Componentes do ELISA [†]	Kit ELISA de 2 placas	Pacote de laboratório de referência
Ref.	622120	622822
Microplate Strips (Tiras de microplacas) (12 x 8 poços) revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ humano-murino	2 tiras de microplacas de 96 poços	20 tiras de microplacas de 96 poços
IFN- γ Standard (Solução padrão de IFN- γ), liofilizada (contém IFN- γ humano recombinante, caseína bovina, 0,01% w/v de Timerosal)	1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)	10 x frascos (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (Dilúente verde) (contém caseína bovina, soro de camundongo normal, 0,01% w/v de Timerosal)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Conjugado 100x concentrado), liofilizado (HRP de anti-IFN- γ humano-murino, contém 0,01% w/v de Timerosal)	1 x 0,3 ml (quando reconstituído)	10 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® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato enzimático) (contém H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de parada enzimática) (contém 0,5 M de H ₂ SO ₄)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Folheto informativo do QFT-Plus ELISA	1	1

[†] Consulte a página 15 para obter informações sobre precauções e advertências de perigo.

Materiais necessários, mas não fornecidos

- Incubadora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}^*$. CO_2 não necessário
- Pipetas de volume variável* calibradas para administração de 10 μl a 1000 μl com pontas descartáveis
- Pipeta multicanal calibrada* com capacidade para administração de 50 μl e 100 μl com pontas descartáveis
- Tampa da placa
- 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

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

Armazenamento e manuseio de espécimes

Tubos de coleta de sangue

- Armazene os tubos de coleta 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 enzimático sempre protegida da luz solar direta.

Reagentes reconstituídos e não usados

Para obter instruções sobre como reconstituir reagentes, consulte a página 26.

- 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.
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado em temperatura ambiente durante 2 semanas.

Avisos e precauções

Somente para uso em diagnóstico in vitro.

Avisos

- Um resultado QFT-Plus negativo não exclui a possibilidade de infecção por *M. tuberculosis* ou de tuberculose: os resultados falso-negativos podem ocorrer devido ao estágio da infecção (por ex., espécime obtido antes do desenvolvimento da resposta imunológica celular), comorbidade com doenças que afetam as funções imunológicas, manuseio incorreto dos tubos de coleta de sangue após punção venosa, desempenho incorreto do ensaio ou outras variáveis imunológicas.
- Um resultado QFT-Plus positivo não deve ser a base única ou definitiva para determinar a infecção por *M. tuberculosis*. A realização incorreta do ensaio poderá causar respostas falso-positivas.
- Um resultado QFT-Plus positivo deve ser acompanhado por uma avaliação diagnóstica e clínica mais aprofundada de tuberculose ativa (por ex., cultura e esfregaço de AFB e radiografia do tórax).
- Embora ESAT-6 e CFP-10 estejam ausentes de todas as cepas de BCG e da maioria das microbactérias não tuberculosas conhecidas, é possível que ocorra um resultado QFT-Plus positivo devido à infecção por *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. Em caso de suspeita das referidas infecções, deverão ser realizados testes alternativos.

Precauções

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



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-TB Gold Plus 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-sulfofenil)-4-(4-sulfofenilazo)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-isotiazolina-3-ona e 2-metil-2H-isotiazole-3-ona (3:1). Nocivo para a vida aquática, com efeitos duradouros. Evite liberar no meio ambiente.

Advertências de precaução

Busque instruções especiais antes de usar. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. EM CASO DE CONTATO COM A PELE (ou cabelo): remova/retire imediatamente toda a roupa contaminada. Lave a área afetada da pele com água/no chuveiro. EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. remova lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. Em caso de exposição ou suspeita de exposição: Consulte um médico. ligue imediatamente para um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou um médico. Se ocorrer irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Armazene em local trancado. Elimine o conteúdo/recipiente em um local de eliminação de resíduos aprovado.

Mais informações

Folhas de dados de segurança: www.qiagen.com/safety

- Divergências em relação ao folheto informativo do *QuantifERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)* ELISA podem gerar resultados incorretos. Leia as instruções com atenção antes do uso.

- Não use o kit se algum frasco de reagente apresentar sinais de danos ou vazamentos antes do uso.
- **Importante:** Inspeccione os frascos antes do uso. Não use frascos de Conjugado ou Solução padrão de IFN- γ 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 ou Solução padrão de IFN- γ , a fim de minimizar o risco de ferimentos causados pelo lacre metálico.
- Não misture nem use as Tiras de microplaca, a Solução padrão de IFN- γ , o Diluente verde ou o Conjugado 100x concentrado de diferentes lotes do kit QFT-Plus. Os outros reagentes (Tampão de lavagem 20x concentrado, Solução de substrato enzimático e Solução de parada enzimática) podem ser trocados entre kits contanto que os reagentes estejam dentro do seu período 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, estaduais, e federais.
- Não use os QFT-Plus Blood Collection Tubes ou o kit ELISA após o prazo de validade.
- Os procedimentos laboratoriais corretos devem ser sempre respeitados.
- Verifique se o equipamento de laboratório foi calibrado/validado para uso.

Coleta e manuseio de espécimes

O QFT-Plus usa os seguintes tubos de coleta:

1. Tubos Quantiferon Nil (tampa cinza 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 roxa com anel branco)
5. Tubos QuantiFERON HA Nil (tampa cinza com anel amarelo)
6. Tubos QuantiFERON HA TB 1 (tampa verde com anel amarelo)
7. Tubos QuantiFERON HA TB2 (tampa amarela com anel amarelo)
8. Tubos QuantiFERON HA Mitogen (tampa roxa com anel amarelo)

Os antígenos foram desidratados na parede interna dos tubos de coleta de sangue, portanto, é fundamental que o conteúdo dos tubos seja completamente misturado ao sangue. Para sangue diretamente coletado para os tubos QFT-Plus, os tubos QFT-Plus devem ser mantidos e transportados em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) e, logo que possível, transferidos para uma incubadora a 37°C dentro de 16 horas após a coleta. Alternativamente, o sangue pode ser coletado para um único tubo de heparina de lítio ou heparina de sódio para armazenamento antes da transferência para o QFT-Plus e incubação. Os espécimes de sangue coletados em heparina de lítio ou de sódio podem ser armazenados por até 16 horas em temperatura ambiente ($17\text{--}25^{\circ}\text{C}$), seguido pela transferência para os tubos QFT-Plus diretamente após a coleta. Os espécimes de sangue nos tubos de heparina de lítio ou de sódio também podem ser armazenados entre $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ por até 48 horas antes da transferência para os tubos QFT-Plus. Consulte a seção "Coleta de sangue para um único tubo de heparina de lítio ou heparina de sódio e posterior transferência para os QFT-Plus Blood Collection Tubes".

Coletar diretamente para os QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Rotule os tubos adequadamente.

Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen) seja identificável pelo rótulo ou por outros meios após a remoção da tampa.

Recomenda-se registrar a hora e a data da coleta do sangue.

2. Para cada paciente, colete 1 ml de sangue por punção venosa diretamente para o interior de cada um dos QFT-Plus Blood Collection Tubes. 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 QFT-Plus Blood Collection Tubes padrão podem ser usados a uma altitude de até 810 metros acima do nível do mar. Os QFT-Plus Blood Collection Tubes para elevada altitude podem ser usados a uma altitude de 1020 a 1875 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 2–3 segundos depois que o enchimento do tubo parecer ter sido concluído. Isso garantirá que o volume correto seja extraído.

- A marca preta na lateral dos tubos 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, deverá ser obtida uma nova amostra de sangue. O enchimento excessivo ou insuficiente dos tubos fora do intervalo de 0,8 a 1,2 ml pode levar a resultados incorretos.
- Se for usada uma "agulha borboleta" para coletar sangue, deverá ser usado um tubo de "purga" para garantir que a tubulação esteja cheia de sangue antes de usar os tubos QFT-Plus.
- Se usar os QFT-Plus Blood Collection Tubes a uma altitude superior a 810 metros, ou caso ocorra um baixo volume de coleta de sangue, os usuários poderão coletar o sangue com uma seringa e transferir imediatamente 1 ml para cada um dos 4 tubos. Por razões de segurança, recomenda-se que tal procedimento seja realizado 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 um (até o centro da marca preta na lateral do rótulo do tubo). Recoloque as tampas firmemente e misture conforme descrito abaixo. Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen) seja identificável pelo rótulo ou por outros meios após a remoção da tampa.

3. Imediatamente após encher os tubos, agite-os com firmeza dez (10) vezes para garantir que toda a superfície interna do tubo fique revestida com sangue. Este procedimento dissolverá os antígenos das paredes do tubo.

Nota importante: Os tubos devem estar entre 17–25°C no momento da agitação. Uma agitação excessivamente vigorosa pode causar a ruptura do gel e levar a resultados anormais.

4. Após a rotulagem, enchimento e agitação, os tubos devem ser transferidos para uma incubadora a 37°C ± 1°C logo que possível, no máximo 16 horas após a coleta. Antes da incubação, manter e transportar os tubos em temperatura ambiente (22°C ± 5°C). Se os tubos QFT-Plus não forem incubados a 37°C diretamente após a coleta e agitação do sangue, inverta os tubos 10 vezes para misturá-los antes da incubação a 37°C.
5. Incube os tubos QFT-Plus VERTICALMENTE a 37°C ± 1°C durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO₂ nem de umidificação.

Coleta de sangue para um único tubo de heparina de lítio ou heparina de sódio e posterior transferência para os QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. O sangue pode ser coletado em um único tubo de coleta de sangue contendo heparina de lítio ou de sódio como anticoagulante e, em seguida, transferido para os QFT-Plus Blood Collection Tubes. Use apenas heparina de lítio ou de sódio como anticoagulante sanguíneo, pois outros anticoagulantes interferem no ensaio. Rotule os tubos adequadamente.

Recomenda-se rotular o tubo com a data e a hora da coleta do sangue.

Importante: Os tubos de coleta de sangue devem estar em temperatura ambiente (17–25°C) no momento da coleta de sangue.

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

Opção 1 – Manuseio e armazenamento em temperatura ambiente do tubo de heparina lítio ou de sódio O sangue coletado no tubo de heparina de lítio ou de sódio deve ser mantido em temperatura ambiente (22°C ± 5°C) por um período máximo de 16 horas a partir do momento da coleta antes da transferência para QFT-Plus Blood Collection Tubes e subsequente incubação.

Opção 2 – Manuseio e armazenamento refrigerado do tubo de heparina de lítio ou de sódio

Importante: As etapas procedimentais a–d devem ser seguidas sequencialmente.

- a. O sangue coletado no tubo de heparina de lítio ou de sódio pode ser mantido em temperatura ambiente (17–25°C) por até 3 horas após a coleta de sangue.
- b. O sangue coletado no tubo de heparina de lítio ou de sódio pode ser refrigerado (2–8°C) por até 48 horas.
- c. Após a refrigeração, o tubo de heparina de lítio ou de sódio deve estabilizar-se em temperatura ambiente (17–25°C) antes da transferência para os QFT-Plus Blood Collection Tubes.
- d. Os QFT-Plus Blood Collection Tubes divididos em alíquotas devem ser colocados na incubadora a 37°C dentro de 2 horas após a transferência de sangue.

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

10 vezes para misturá-los antes da incubação a 37°C. O tempo total entre a coleta de sangue e a incubação nos QFT-Plus Blood Collection Tubes não deve exceder 53 horas.

4. Transferência de espécime de sangue de um tubo de heparina de lítio ou de sódio para os QFT-Plus Blood Collection Tubes:
 - a. Rotule adequadamente cada um dos QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen) seja identificável pelo rótulo ou por outros meios após a remoção da tampa. Recomenda-se transferir a hora e a data registradas da coleta de sangue dos tubos de heparina de lítio ou de sódio para os tubos QFT-Plus Blood Collection Tubes.
 - b. As amostras devem ser misturadas uniformemente através de inversão suave antes da dispensação nos QFT-Plus Blood Collection Tubes.
 - c. A dispensação deve ser realizada assepticamente, garantindo os procedimentos de segurança adequados, removendo as tampas dos 4 QFT-Plus Blood Collection Tubes e adicionando 1 ml de sangue a cada tubo. Recoloque as tampas dos tubos firmemente e misture conforme descrito abaixo. Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen) seja identificável pelo rótulo ou por outros meios após a remoção da tampa.
5. Misture os tubos. Imediatamente após encher os QFT-Plus Blood Collection Tubes, agite-os com firmeza dez (10) vezes para garantir que toda a superfície interna do tubo fique revestida com sangue. Este procedimento dissolverá os antígenos das paredes do tubo. Uma agitação excessivamente vigorosa pode causar a ruptura do gel e levar a resultados anormais.
6. Após a rotulagem, enchimento e agitação, os tubos devem ser transferidos para uma incubadora a 37°C ± 1°C dentro de 2 horas. Se os QFT-Plus Blood Collection Tubes não forem incubados a 37°C diretamente após a coleta e agitação do sangue, inverta os tubos 10 vezes (10x) para misturá-los antes da incubação a 37°C. (Consulte as Figuras 1–3 na próxima página para ver as opções de coleta de sangue).
7. Incube os QFT-Plus Blood Collection Tubes VERTICALMENTE a 37°C ± 1°C durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO₂ nem de umidificação.

Coletar para os QFT-Plus Blood Collection Tubes e manter em temperatura ambiente.

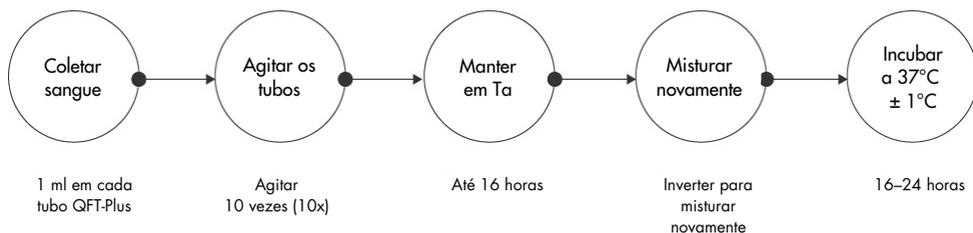


Figura 1. Opção de coleta de sangue: coletar diretamente para os QFT-Plus Blood Collection Tubes e manter em temperatura ambiente.

O tempo total desde a coleta de sangue para os QFT-Plus Blood Collection Tubes até a incubação a 37°C não deve exceder 16 horas.

Coletar para o tubo de heparina de lítio ou de sódio e manter em temperatura ambiente.



Figura 2. Opção de coleta de sangue: coletar para o tubo de heparina de lítio ou de sódio e manter em temperatura ambiente.

O tempo total desde a coleta de sangue no tubo de heparina de lítio ou de sódio até a incubação a 37°C não deve exceder 16 horas.

Coletar para o tubo de heparina de lítio ou de sódio e manter entre 2-8°C.

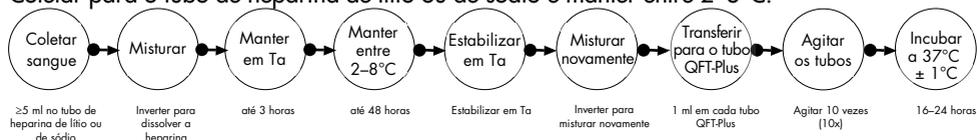


Figura 3. Opção de coleta de sangue: coletar para o tubo de heparina de lítio ou de sódio e manter entre 2-8°C.

O tempo total desde a coleta de sangue no tubo de heparina de lítio ou de sódio até a incubação a 37°C não deve exceder 53 horas.

Instruções de uso

Estágio 1 – Incubação de sangue e coleta de plasma

Materiais fornecidos

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

Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Consulte a seção 3

Procedimento

1. Se o sangue não for incubado imediatamente após a coleta, misture novamente os tubos invertendo-os 10 vezes antes da incubação.
2. Incube os tubos VERTICALMENTE a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO_2 nem de umidificação.
3. Após a incubação a 37°C , os tubos de coleta de sangue podem ser mantidos entre 4°C e 27°C por até 3 dias antes da centrifugação.
4. Após a incubação dos tubos a 37°C , a coleta de plasma é facilitada centrifugando os tubos por 15 minutos a $2000\text{--}3000 \times \text{RCF}$ (g). O tampão de gel separará as células do plasma. Se isso não ocorrer, os tubos devem ser centrifugados novamente.
É possível coletar o plasma sem centrifugação, mas é necessário cuidado adicional para remover o plasma sem perturbar as células.
5. As amostras de plasma devem ser coletadas apenas usando uma pipeta.

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

As amostras de plasma podem ser carregadas diretamente dos tubos de coleta de sangue centrifugados na placa QFT-Plus ELISA, inclusive quando são usadas estações de trabalho ELISA automatizadas.

As amostras de plasma podem ser armazenadas por até 28 dias entre 2°C e 8°C ou, se coletadas, abaixo de -20°C por períodos prolongados.

Para obter amostras de teste adequadas, colete pelo menos 150 µl de plasma.

Estágio 2 – IFN- γ ELISA

Materiais fornecidos

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

Materiais necessários, mas não fornecidos

- Consulte a seção 3.

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 1 tira para as soluções padrão QFT-Plus e tiras suficientes para o número de indivíduos a serem testados (consulte Figura 5). Após o uso, conserve a estrutura para usar com as tiras restantes.
3. Reconstitua a Solução padrão de IFN- γ com o volume de água deionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco. 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.

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

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- γ no Diluente verde (Green Diluent, GD) (consulte 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 padrão duplicadas

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

Adicione 150 μ l de GD a S1, S2, S3, S4.

Adicione 150 μ l da solução padrão do kit a S1 e misture bem.

Transfira 50 μ l de S1 para S2 e misture bem.

Transfira 50 μ l de S2 para S3 e misture bem.

O GD sozinho serve como solução padrão zero (S4).

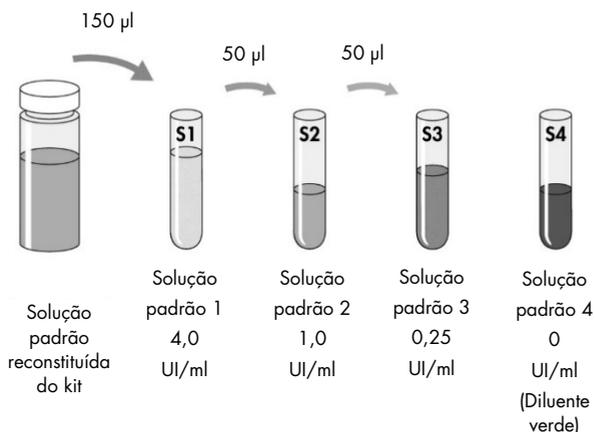


Figura 4. Preparação da curva de solução padrão.

4. 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 Diluente 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 Diluente verde.

Tabela 1. Preparação do Conjugado

Número de tiras	Volume de Conjugado 100x concentrado	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

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

Nota importante: Se as amostras de plasma forem adicionadas diretamente a partir dos tubos QFT-Plus centrifugados, deverá ser evitada qualquer mistura do plasma. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

6. Adicione 50 µl de conjugado na concentração de trabalho recém-preparado aos poços de ELISA necessários usando uma pipeta multicanal.

7. Adicione 50 µl de amostras de plasma para teste aos poços adequados usando uma pipeta multicanal (consulte a disposição recomendada da placa em **Figura 5**).
Finalmente, 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. Disposição recomendada da amostra (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 Nil), 1 TB1 (Amostra 1. Plasma TB1), 1 TB2 (Amostra 1. Plasma TB2), 1 M (Amostra 1. Plasma Mitogen)

8. Cubra cada placa e misture bem o conjugado e as amostras/soluções padrão de plasma usando um agitador de microplacas por 1 minuto. Evite salpicos.
9. Cubra cada placa e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) por 120 ± 5 minutos.
Durante a incubação, as placas não devem estar expostas à luz solar direta.
10. 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 µl de tampão de lavagem na concentração de trabalho por, pelo menos, 6 ciclos. Recomenda-se uma lavadora automática de placas.

Uma lavagem meticulosa é muito importante para a realização do ensaio. Verifique se cada poço está completamente cheio com tampão de lavagem na parte superior do poço para cada ciclo de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.

Deve ser adicionado desinfetante laboratorial padrão ao reservatório de efluentes e devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.

11. Bata as placas com a face para baixo na toalha absorvente e sem fiapos para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100 µl de Solução de substrato enzimático a cada poço, cubra a placa e misture bem usando um agitador de microplacas.
12. Cubra cada placa e 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.
13. Após os 30 minutos de incubação, adicione 50 µl de Solução de parada enzimática a cada um dos poços e misture.
A Solução de parada enzimática deve ser adicionada aos poços na mesma ordem e aproximadamente na mesma velocidade usada para o substrato na etapa 11.
14. Meça a densidade óptica (Optical Density, OD) de cada poço 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 a 650 nm. Os valores de OD são usados para calcular os resultados.

Cálculos e interpretação de testes

O software de análise QFT-Plus pode ser usado para analisar dados brutos e calcular resultados. Está disponível em www.QuantiFERON.com. Certifique-se de que seja utilizada a versão mais recente do software de análise QFT-Plus.

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.

Como alternativa ao uso do software de análise QFT-Plus, os resultados podem ser determinados de acordo com o método a seguir.

Geração da curva de solução padrão

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

Determine os valores médios de 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 OD média (eixo Y) em relação ao $\log_{(e)}$ da concentração de IFN- γ 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- γ (UI/ml) para cada uma das amostras de plasma de teste, usando o valor de 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 Excel® Microsoft®). 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.

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 OD médio da Solução padrão 1 deve ser $\geq 0,600$.
- O %CV dos valores de OD replicados da Solução padrão 1 e da Solução padrão 2 tem de ser $\leq 15\%$.
- Os valores de 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 à 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 software de análise QFT-Plus 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 OD da solução padrão zero (Diluyente verde) deve ser $\leq 0,150$. Se o valor de OD médio for $> 0,150$, o procedimento de lavagem da placa deverá ser investigado.

Interpretação dos resultados

Os resultados do QFT-Plus são interpretados usando os seguintes critérios (Tabela 2):

Nota importante: Diagnosticar ou excluir a tuberculose e avaliar a probabilidade de ILTB requer uma combinação de conclusões epidemiológicas, históricas, clínicas e de diagnóstico que deve ser considerada ao interpretar os resultados do 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 de QFT-Plus	Relato/Interpretação
≤8,0	≥0,35 e ≥25% do valor de Nil	Qualquer um	Qualquer um	Positivo [†]	Provável infecção por <i>M. tuberculosis</i>
	Qualquer um	≥0,35 e ≥25% do valor de Nil		Negativo	IMPROVÁVEL infecção por <i>M. tuberculosis</i>
	<0,35 ou ≥0,35 e <25% do valor de Nil	<0,35 ou ≥0,35 e <25% do valor de Nil	≥0,5	Indeterminado [‡]	Não é possível determinar a probabilidade de infecção por <i>M. tuberculosis</i>
>8,0 [§]		Qualquer um		Indeterminado [‡]	Não é possível determinar a probabilidade de infecção por <i>M. tuberculosis</i>

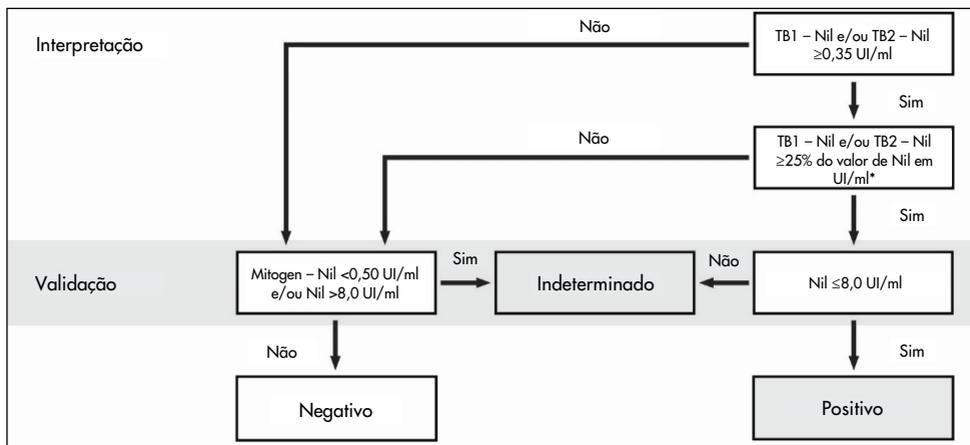
* As respostas ao controle positivo do Mitogen (e, ocasionalmente, antígenos TB) podem estar fora do intervalo do leitor de microplacas. Isso não afeta os resultados do teste. Os valores >10 ml são relatados pelo software QFT-Plus como >10 UI/ml.

[†] Quando não há suspeita 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 a repetição do teste de uma ou das duas réplicas for positiva, o resultado do teste do indivíduo deve ser considerado positivo.

[‡] Consulte a seção "Solução de problemas" para conhecer as possíveis causas.

[§] Nos estudos clínicos, menos de 0,25% dos indivíduos apresentaram níveis de IFN- γ >8,0 UI/ml para o valor de Nil.

A magnitude do nível de IFN- γ medido não pode ser correlacionada com o estágio ou grau da infecção, o nível de resposta imunológica ou com a probabilidade de progressão da doença ativa. Uma resposta de TB positiva em indivíduos negativos a Mitogen é rara, mas já foi observada em pacientes com TB. Isso indica que a resposta de IFN- γ ao antígeno TB é superior à resposta de Mitogen, o que é possível uma vez que o nível de Mitogen não estimula ao máximo a produção de IFN- γ pelos linfócitos.



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

Figura 6. Fluxograma de interpretação do QFT-Plus

Limitações

Os resultados do teste QFT-Plus têm de ser usados em conjunto com o histórico epidemiológico, o estado clínico atual e outras avaliações de diagnóstico de cada indivíduo.

Os indivíduos com valores de Nil maiores que 8,0 UI/ml são classificados como "Indeterminado" porque uma resposta 25% mais elevada aos antígenos TB pode estar fora do intervalo de determinação do ensaio.

Poderão ocorrer resultados não confiáveis ou indeterminados devido a:

- Divergências em relação ao procedimento descrito neste folheto informativo
- Níveis excessivos de IFN- γ circulante ou presença de anticorpos heterófilos
- Mais de 16 horas entre a coleta do espécime de sangue e a incubação a 37°C. Isso não será aplicável se usar o fluxo de trabalho do tubo de heparina de lítio ou de sódio entre 2–8°C.

Características de desempenho

Estudos clínicos

Como não existe um teste padrão definido para ILTB, 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 falso-positivos em indivíduos 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 avaliando a especificidade do QFT-Plus em 409 indivíduos. As informações demográficas e os fatores de risco de exposição à TB foram determinados usando uma pesquisa padronizada no momento do teste.

Em um resumo das conclusões dos dois grupos de pacientes com baixo risco (sem fatores de risco conhecidos) de infecção por 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 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 para TB ativa

Embora não exista um teste padrão definitivo para ILTB, um substituto adequado é a cultura microbiológica de *M. tuberculosis*, uma vez que os pacientes com a doença estão, por definição, infectados. Os casos de suspeita de TB de quatro locais de estudo na Austrália e Japão, que mais tarde se confirmou por cultura estarem infectados com *M. tuberculosis*, foram testados para avaliar a sensibilidade do QFT-Plus (Tabela 5 e Tabela 6). Os pacientes haviam recebido menos de 14 dias de tratamento antes da coleta de sangue para o teste QFT-Plus.

Em um resumo das conclusões dos quatro grupos de pacientes com cultura positiva de *M. tuberculosis*, a sensibilidade geral do QFT-Plus para TB ativa foi de 95,3% (164/172). Nos quatro grupos, 159 pacientes revelaram-se positivos nos tubos TB1 e TB2, 1 paciente revelou-se positivo somente 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 indeterminado (Mitogen baixo) apenas com o resultado de TB1 (consulte 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 do QFT-Plus (IC de 95%)
Local 1 – Japão	36	7	0	84% (69–93)
Local 2 – Japão	53	1	2	98% (90–100)
Local 3 – Japão	54	0	0	100% (93–100)
Local – Austrália	21	0	0	100% (84–100)

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

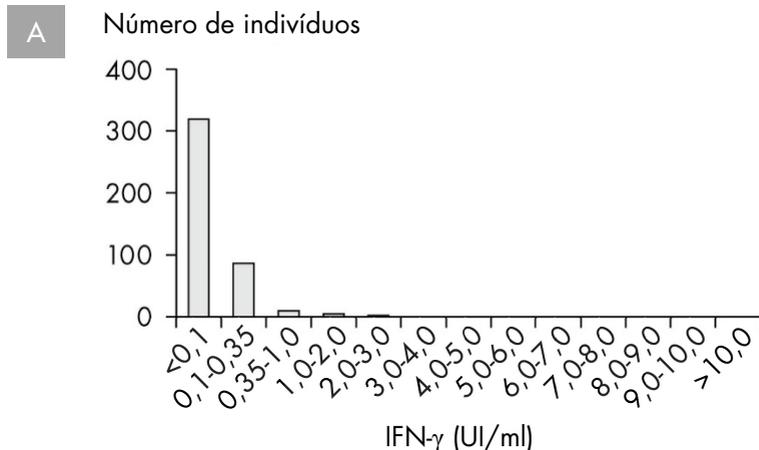
Tabela 6. Resultados do estudo de sensibilidade do QFT-Plus por tubo de antígeno TB

	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 se baseia no número total de testes válidos, excluindo os resultados indeterminados.

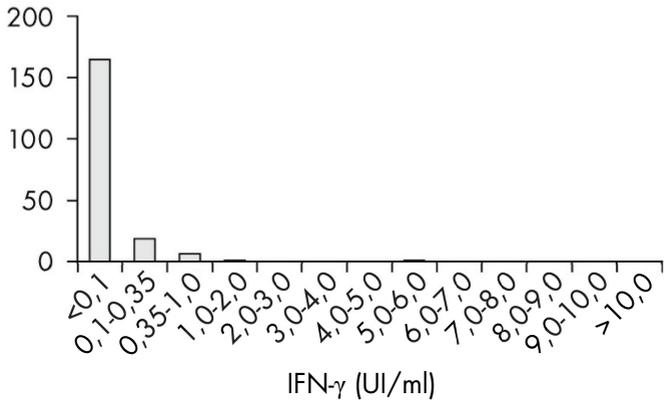
Distribuições de respostas observadas – estratificadas por risco

Observou-se uma variedade de respostas de IFN- γ aos tubos TB1, TB2 e de controle nos ensaios clínicos, sendo as mesmas estratificadas pelo risco de infecção por *M. tuberculosis* (Figuras 7–9). O grupo de risco misto é composto por indivíduos representativos de uma população de teste geral, incluindo indivíduos com e sem fatores de risco de exposição à TB, em que a presença de TB ativa é improvável (ou seja, ILTB).



B

Número de indivíduos



C

Número de indivíduos

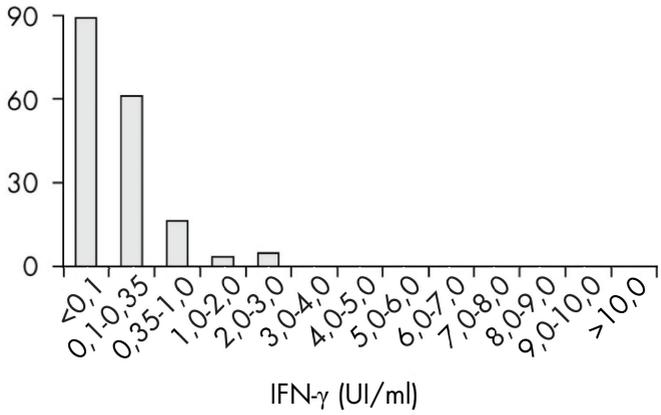


Figura 7. Distribuição de Nil. **A.** Distribuição de valores de Nil em uma população de baixo risco (n = 409). **B.** Distribuição de valores de Nil em uma população de risco misto (n = 194). **C.** Distribuição de valores de Nil em uma população com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura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

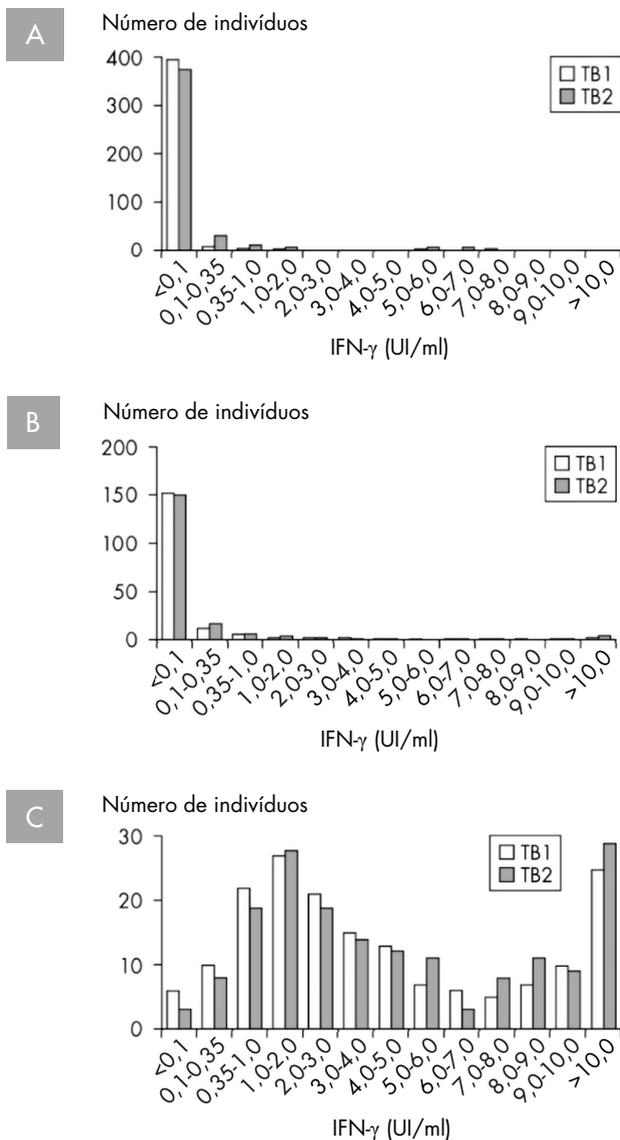


Figura 8. Distribuição de TB1 e TB2 (Nil subtraído). **A.** Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em uma população de baixo risco (n = 409). **B.** Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em uma população de risco misto (n = 194). **C.** Distribuição de valores de TB1 e TB2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

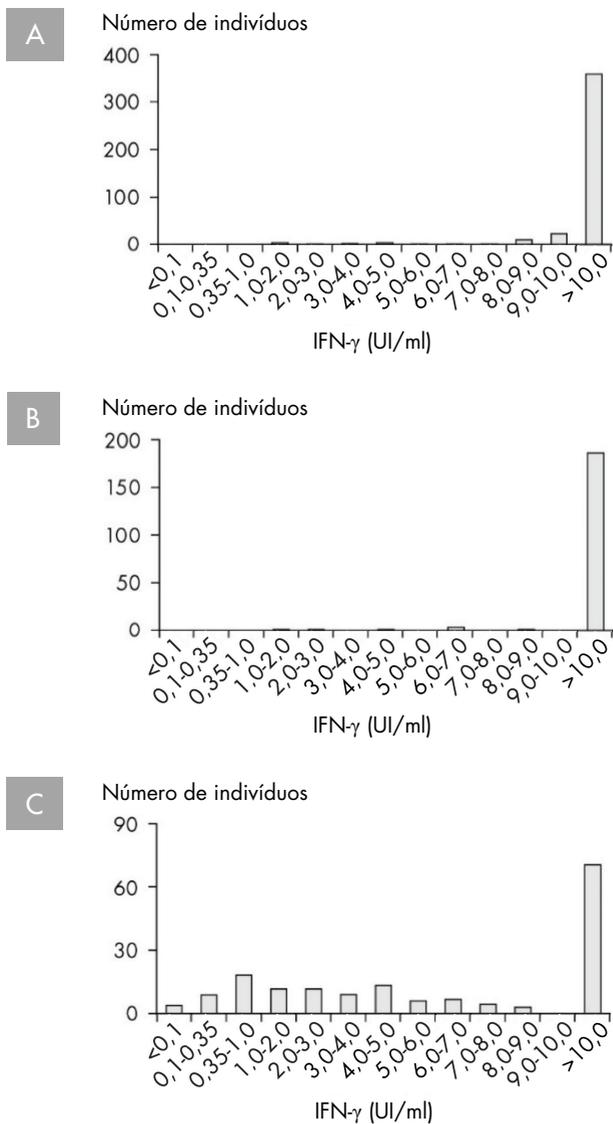


Figura 9. Distribuição de Mitogen (Nil subtraído). **A.** Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em uma população de baixo risco (n = 409). **B.** Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em uma população de risco misto (n = 194). **C.** Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído)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

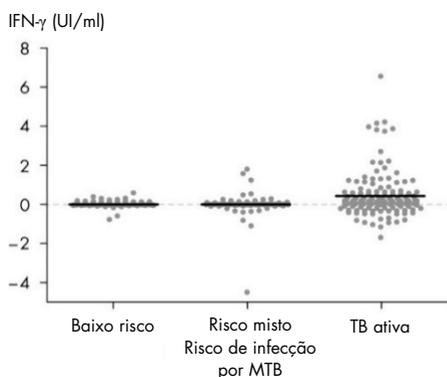


Figura 10. Diferença observada entre os valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído), estratificada por risco. População de baixo risco (n = 409), população de risco misto (n = 189) e população com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n = 141). Os valores de TB1 foram subtraídos dos valores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

Características do desempenho do ensaio

Demonstrou-se que o QFT-Plus ELISA é linear colocando aleatoriamente cinco réplicas de 11 pools de plasma de concentrações conhecidas de IFN- γ 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 11).

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

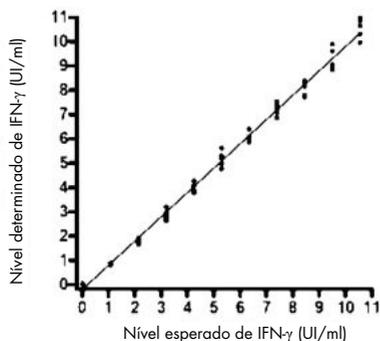


Figura 11. Perfil de linearidade do QFT-Plus ELISA

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

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

A imprecisão total ou interensaio foi determinada por meio da comparação de 27 concentrações calculadas de IFN- γ para cada plasma de teste. 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 IFN- γ plasmático zero apresentou 26,1% de CV. Esse nível de variação deve ser esperado porque a concentração calculada de IFN- γ é baixa e a variação em torno de uma estimativa baixa de concentração será maior do que isso para concentrações mais elevadas.

A reprodutibilidade do teste QFT-Plus foi determinada usando amostras de sangue de 102 indivíduos com fatores de risco misto para infecção por *M. tuberculosis*. Foram avaliados três operadores e condições laboratoriais diferentes.

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

Diagnóstico de ILTB

Foram publicados vários estudos demonstrando o desempenho do QFT, o precursor do QFT-Plus, em várias populações com risco de infecção por MTB. As principais conclusões de alguns estudos selecionados são apresentadas em Tabela 7.

Tabela 7. Estudos publicados selecionados sobre QFT

População/condição	Resultados e conclusões	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 IGRA baseado em ELISpot (8). O maior estudo até o momento comparando QFT com TCT em crianças do Vietnã, Filipinas e México apoia o uso preferencial de QFT em detrimento de TCT em testes de ILTB em crianças estrangeiras (46). Um estudo de contatos limitados apresenta um melhor valor preditivo que o TCT em crianças (47) e um risco de progressão da TB oito vezes superior no prazo de dois anos em conversores QFT em comparação com não conversores (48). A discordância QFT-negativo/TCT-positivo é alta em crianças vacinadas com BCG (46, 49), mas não existe impacto na resposta ao Mitogen em crianças com menos de 5 anos de idade (49) e nas taxas reduzidas de "indeterminado" durante a triagem de rotina de crianças imigrantes (46).	152
Gravidez	Em um cenário de carga reduzida, o QFT é executado com igual eficácia a cada trimestre da gravidez com resultados comparáveis aos das mulheres não grávidas, é muito mais específico, apresenta, no mínimo, igual sensibilidade e pode ser um melhor indicador da progressão da doença do que o TCT (50). Em um cenário de carga elevada, QFT foi mais estável ao longo da gravidez e aproximou mais a prevalência de antecedentes de ILTB em comparação com TCT, embora os autores tenham concluído que a gravidez afeta ambos QFT e TCT (51).	6

A tabela continua na próxima página

Tabela 7. Estudos publicados selecionados sobre QFT (continuação)

População/condição	Resultados e conclusões	Número total de estudos publicados
HIV/AIDS	Tanto os IGRA como o TCT são afetados pela infecção por 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 TCT e IGRA baseado em ELISpot (53–55). Uma única consulta de IGRA supera o problema do TCT relativamente a taxas de retorno baixas nesta população (53).	101
Terapias imunossupressoras	O QFT é menos afetado por terapias imunossupressoras do que o TCT e correlaciona-se melhor com os fatores de risco de TB (23, 27). O QFT exibe sensibilidade elevada em pacientes com doença reumática (23, 56, 57) e especificidade superior ao TCT, minimizando os falso-positivos e reduzindo o tratamento desnecessário que ocorreria com o TCT (23, 57, 58).	112
Profissionais de saúde	Foi demonstrado como sendo mais específico, mais rentável e tendo menos falso-positivos que o TCT (59–62). A variabilidade ao 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 às do TCT em testes em série de profissionais de saúde de baixo risco (64, 65). O CDC dos EUA reconhece que os critérios tolerantes que definem a conversão de IGRA podem produzir mais conversão do que a observada com os critérios quantitativos mais rigorosos de TCT, tendo sido demonstrado que as estratégias de repetição de testes são eficazes na gestão do fenômeno conversão/reversão (65–68).	111
Contatos com TB	VPP e VPN mais elevados que o TCT (47); conveniência de consulta única para aqueles cujo retorno é improvável (63), melhor correlação à exposição (69), o que é especialmente observado nos indivíduos vacinados com BCG e em populações de países onde é administrada a vacina BCG (70, 71).	89
Transplante	Foi demonstrado como sendo pelo menos tão eficaz quanto o TCT, mas menos afetado por doenças nos órgãos em estágio final que o TCT (22).	23

A tabela continua na próxima página

Tabela 7. Estudos publicados selecionados sobre QFT (continuação)

População/condição	Resultados e conclusões	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- γ , não levou em consideração variáveis de confundimento, como infecções por HIV ou helmintos (73). Segundo estudos vietnamitas, em 838 diabéticos autorrelatados com suspeitas de TB devido a radiografias do tórax anormais ou confirmados por cultura como tendo TB ativa (n = 128), a positividade de QFT foi igual ou superior aos pontos de corte do TCT de 10 e 15 mm (74).	9
Doença renal terminal	Os resultados positivos de QFT correlacionam-se melhor com os fatores de risco da TB do que com os do TCT, sendo menos associados à BCG (75).	45
Imigrantes	Os estudos demonstram que o QFT não é afetado pela BCG nem pela idade, ao contrário do TCT (74). Foi demonstrado que o QFT é o método mais rentável (76). Em cenários de carga reduzida, a maior parte dos casos de TB é proveniente de estrangeiros e da reativação de TB latente após a chegada (77). O maior estudo até o momento comparando QFT com TCT em crianças imigrantes apoia o uso preferencial de QFT em detrimento do TCT em testes de infecção latente por TB em crianças estrangeiras (46).	29

Informações técnicas

Resultados indeterminados

Os resultados indeterminados são pouco comuns e podem estar relacionados ao estado imunológico do indivíduo sendo testado, mas também podem estar relacionados a vários fatores técnicos, caso as instruções de uso anteriormente descritas não sejam seguidas.

Se suspeitar de problemas técnicos no armazenamento de reagente, na coleta de sangue ou no manuseio de amostras de sangue, repita todo o teste QFT-Plus com um novo espécime de sangue. É possível repetir o teste ELISA de plasmas estimulados se houver suspeita de lavagem inadequada ou de qualquer outro desvio de procedimento com o 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 coletar um novo espécime ou realizar outros procedimentos, conforme apropriado.

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. Para obter as informações de contato, consulte a contracapa.

Solução de problemas do ELISA

Desenvolvimento inespecífico de cores

Possível causa

- a) Lavagem incompleta da placa
- b) Contaminação cruzada de poços de ELISA
- c) Kit/componentes vencidos
- d) A Solução de substrato enzimático está contaminada
- e) Mistura do plasma nos tubos QFT-Plus antes da coleta

Solução

- 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.
- Tome cuidado ao pipetar e misturar amostras para minimizar os riscos.
- Certifique-se de 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.
- Descarte o substrato se apresentar coloração azul. Certifique-se de que sejam usados reservatórios limpos de reagente.
- Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma 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

- a) Erro de diluição da solução padrão
- b) Erro de pipetagem
- c) Temperatura de incubação muito baixa
- d) Tempo de incubação muito curto

Solução

- Certifique-se de que as diluições da solução padrão do kit sejam preparadas corretamente, de acordo com este folheto informativo.
- Certifique-se de que as pipetas sejam calibradas e usadas de acordo com as instruções do fabricante.
- A incubação do ELISA deve ser realizada em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$).
- A incubação da placa com o conjugado, com as soluções padrão e com as amostras deve durar 120 ± 5 minutos. A Solução de substrato enzimático é incubada na placa durante 30 minutos.

Solução de problemas do ELISA

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	Certifique-se de 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.

Fundo alto

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) Temperatura de incubação muito alta	A incubação do ELISA deve ser realizada em temperatura ambiente (22°C ± 5°C).
c) O kit/componentes venceram	Certifique-se de 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.

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 configuração 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.

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- γ 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. Drobniowski, 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- γ 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- γ 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- γ releasing assays is affected by BCG vaccination in HIV patients. *J. Infect.* 66, 376.
 56. Hsia, E.C. et al. (2012) Interferon- γ 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 α 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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 γ 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
Accessed 22 March 2019.

Símbolos

Os seguintes símbolos podem aparecer na embalagem e no rótulo:

Símbolo	Definição do símbolo
 2×96	Suficiente para 2×96 preparações de amostra
	Fabricante legal
	Símbolo de marcação CE-IVD
	Para uso em diagnóstico in vitro
	Código de lote
	Referência
	Número global de item comercial
	Data de validade
	Limites de temperatura
	Consultar as instruções de uso
	Não reutilizar
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Número de material
Rn	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão

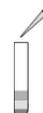
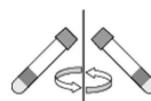
Informações de contato

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 ou entre em contato com um dos Departamentos de Serviço Técnico da QIAGEN (consulte a contracapa ou acesse www.qiagen.com).

Procedimento de teste abreviado

Estágio 1 – Incubação do sangue

1. Colete o sangue do paciente nos tubos de coleta de sangue e misture agitando-os dez (10) vezes para garantir que toda a superfície interna do tubo fique revestida com sangue. Este procedimento dissolverá os antígenos das paredes do tubo.
2. Incube os tubos verticalmente a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 16 a 24 horas.
3. Após a incubação, centrifugue os tubos por 15 minutos entre 2000 e 3000 x g RCF (g) para separar o plasma e as hemácias.
4. Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma antes da coleta. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.



Estágio 2 – IFN- γ ELISA

1. Coloque os componentes do ELISA, com exceção do Conjugado 100x concentrado, em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) por, pelo menos, 60 minutos.
2. Reconstitua a solução padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou deionizada. Prepare quatro (4) diluições de solução padrão.
3. Reconstitua o Conjugado 100x liofilizado com água deionizada ou destilada.

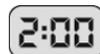


4. Prepare o conjugado na concentração de trabalho no Diluente verde e adicione 50 μ l a todos os poços.



5. Adicione 50 μ l de amostras de plasma de teste e 50 μ l de soluções padrão aos poços apropriados. Misture com o agitador.

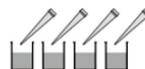
6. Incube em temperatura ambiente por 120 ± 5 minutos.



7. Lave os poços, no mínimo, 6 vezes com 400 μ l/poço de tampão de lavagem.



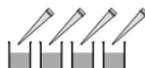
8. Adicione 100 μ l de Solução de substrato enzimático aos poços. Misture com o agitador.



9. Incube em temperatura ambiente por 30 minutos.



10. Adicione 50 μ 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.



Alterações significativas

Seção	Página	Alterações
Várias	Várias	Adição de instruções relacionadas ao uso do tubo de heparina de lítio ou de heparina de sódio
Várias	Várias	Adição de instruções relacionadas ao fluxo de trabalho de coleta de sangue a 2–8°C
Várias	Várias	A tampa da placa é agora um material necessário, mas que não é fornecido

Histórico de revisões do manual

Documento	Alterações
R6 04/2019	Alterações a heparina de lítio/heparina de sódio Novas instruções de trabalho para o fluxo de trabalho de coleta 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.).

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

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 folheto informativo e para uso com componentes contidos apenas no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo da sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes incluídos neste painel com quaisquer componentes não incluídos neste kit, exceto conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto e neste folheto informativo.
2. A não ser em relação às licenças expressamente indicadas, a QIAGEN não garante que este painel e/ou seu(s) uso(s) não infringem os direitos de terceiros.
3. Este kit e seus componentes são licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, recondicionados ou revendidos, salvo indicação contrária por parte da QIAGEN.
4. A QIAGEN especificamente renuncia a quaisquer outras licenças, declaradas ou implícitas, a não ser àquelas 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, veja www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, Todos os direitos reservados.

www.QuantiFERON.com

Pacífico Asiático | techservice-ap@qiagen.com

Europa | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Oriente Médio/África | techserviceQFT-eu@qiagen.com

América Latina (exceto Brasil e México) | techservice-latam@qiagen.com

Notas

Notas

