

Abril de 2019

Prospecto de QuantiFERON[®]-TB Gold Plus (QFT[®]-Plus) ELISA



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Versión 1



Para uso diagnóstico in vitro

Prueba de IFN- γ en sangre para medir las respuestas a los antígenos peptídicos ESAT-6 y CFP-10



622120, 622822



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Alemania



R6 1083163ES

Contenido

Uso previsto	5
Resumen y explicación de la prueba	5
Principios del ensayo	7
Tiempo necesario para la realización del ensayo	9
Componentes y almacenamiento	10
Materiales necesarios pero no suministrados	12
Manipulación y almacenamiento de muestras	13
Tubos de recogida de sangre	13
Reactivos del kit	13
Reactivos reconstituidos sin utilizar	13
Advertencias y precauciones	14
Advertencias	14
Precauciones	15
Obtención y manipulación de muestras	18
Instrucciones de uso	25
Fase 1: incubación de la sangre y extracción del plasma	25
Fase 2: ELISA para IFN- γ	26
Cálculos e interpretación de la prueba	31
Generación de curva estándar	31
Control de calidad de la prueba	32
Interpretación de los resultados	32
Limitaciones	35



Características de rendimiento	36
Estudios clínicos	36
Características del rendimiento del ensayo.....	42
Información técnica.....	47
Resultados indeterminados	47
Muestras de plasma coaguladas	47
Guía de resolución de problemas.....	48
Referencias	50
Símbolos	59
Información de contacto	60
Resumen del procedimiento de la prueba	61
Fase 1: incubación de la sangre	61
Fase 2: ELISA para IFN- γ	61
Modificaciones importantes	63
Historial de revisiones del manual	63

Uso previsto

QuantIFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) es un ensayo de diagnóstico in vitro que utiliza un combinado de péptidos que simula la actividad de las proteínas ESAT-6 y CFP-10 para estimular células en sangre total heparinizada. La detección de interferón- γ (IFN- γ) mediante el enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) sirve para detectar reacciones in vitro a estos antígenos peptídicos vinculadas a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus es una prueba indirecta destinada a detectar la infección por *M. tuberculosis* (incluida la enfermedad) concebida como complemento para estudios de determinación de riesgos, radiografías y otras evaluaciones médicas y diagnósticas.

Resumen y explicación de la prueba

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa causada por la infección de organismos del complejo *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), que normalmente se contagia a través de los núcleos en forma de gotitas que viajan por el aire procedentes de pacientes que padecen tuberculosis respiratoria. Un individuo puede enfermar de tuberculosis semanas o meses después del momento de la infección, aunque la mayoría permanecen sanos. La infección latente por tuberculosis (LTBI, latent tuberculosis infection), una dolencia asintomática intransmisible, persiste en algunos individuos, que pueden llegar a sufrir tuberculosis meses o años más tarde. El principal objetivo del diagnóstico de la LTBI es buscar tratamientos preventivos para la tuberculosis. Hasta hace poco, el único método para diagnosticar la LTBI era la prueba cutánea de la tuberculina (TST, tuberculin skin test). La sensibilidad de la piel ante la tuberculina aparece entre 2 y 10 semanas después de la infección. Sin embargo, algunos individuos infectados, incluidos quienes padecen una larga lista de problemas médicos que entorpecen el mecanismo inmunitario, aunque también otros pacientes que no los sufren no reaccionan ante la tuberculina. A la inversa, existen individuos con pocas probabilidades de infectarse por *M. tuberculosis* que muestran sensibilidad ante la tuberculina y dan un resultado positivo en la prueba cutánea tras haber sido vacunados con

el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), haber sido infectados con micobacterias distintas del complejo *M. tuberculosis* o debido a otros factores indeterminados.

Es necesario distinguir la LTBI de la tuberculosis, una enfermedad de declaración obligatoria, que normalmente afecta a los pulmones y al tracto respiratorio inferior pero que también puede afectar a otros sistemas de órganos. La tuberculosis se diagnostica a partir de signos físicos, radiológicos, histológicos, micobacteriológicos y datos extraídos de la anamnesis.

La prueba QFT-Plus mide la reacción inmunitaria celular (RIC) ante antígenos peptídicos que simulan ser proteínas micobacterianas. Estas proteínas, ESAT-6 y CFP-10, no aparecen en ninguna cepa de la BCG ni en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas, a excepción de *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. marinum* (1). Las personas infectadas por organismos del complejo MTB suelen tener en la sangre linfocitos capaces de reconocer a estos y otros antígenos micobacterianos. Este proceso de reconocimiento implica la generación y secreción de la citoquina IFN- γ . La detección y posterior cuantificación de IFN- γ constituyen la base de esta prueba.

Los antígenos que utiliza el ensayo QFT-Plus son una mezcla de peptídicos que simulan la acción de las proteínas ESAT-6 y CFP-10. Numerosos estudios han demostrado que estos antígenos peptídicos estimulan la reacción al IFN- γ en las células T de personas infectadas por *M. tuberculosis*, pero generalmente no de personas no infectadas o vacunadas con BCG sin la enfermedad o riesgo de LTBI (1–32). Sin embargo, los tratamientos médicos o las enfermedades que deterioran la función del sistema inmunitario pueden llegar a reducir la reacción al IFN- γ . Los pacientes con otro tipo de infecciones micobacterianas también podrían presentar reacción ante las proteínas ESAT-6 y CFP-10, puesto que los genes codificadores de dichas proteínas están presentes en *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. marinum* (1, 23). El ensayo QFT-Plus se utiliza como prueba para la detección de LTBI y como ayuda para el diagnóstico de la infección por el complejo *M. tuberculosis* en pacientes enfermos. Un resultado positivo secunda el diagnóstico de tuberculosis, pero hay que tener en cuenta que las infecciones debidas a otras micobacterias (p. ej., *M. kansasii*) pueden producir también resultados positivos. Son necesarios otras evaluaciones médicas y diagnósticas para confirmar o excluir una tuberculosis.

El ensayo QFT-Plus utiliza dos tubos diferentes de medición de antígeno TB: el TB Antigen Tube 1 (TB1) y el TB Antigen Tube 2 (TB2). Ambos tubos contienen antígenos peptídicos de los antígenos asociados al complejo MTB, ESAT-6 y CFP-10. El tubo TB1 contiene péptidos de ESAT-6 y CFP-10 diseñados para generar respuestas RIC a partir de linfocitos T cooperadores CD4⁺ y el tubo TB2, un conjunto adicional de péptidos cuya función es inducir respuestas RIC a partir de linfocitos T citotóxicos CD8⁺. En el transcurso natural de las infecciones por el complejo MTB, el papel de las células T CD4⁺ es fundamental para el control inmunológico gracias a la secreción de citoquinas IFN- γ . Las pruebas corroboran la importancia de las células T CD8⁺ que intervienen en la defensa del sujeto frente al complejo MTB mediante la secreción de IFN- γ y otros factores solubles, que activan los macrófagos que suprimen el crecimiento de MTB, matan las células infectadas o directamente lisan el MTB intracelular (33-35). Se han detectado células CD8⁺ específicas para MTB en sujetos con LTBI y tuberculosis activa en los que es frecuente detectar células CD8⁺ productoras de IFN- γ (36-38). Además, se ha descrito un aumento en la frecuencia de detección de linfocitos T CD8⁺ específicos para ESAT-6 y CFP-10 en sujetos con tuberculosis activa en comparación con sujetos afectados por LTBI, lo que puede estar relacionado con una exposición reciente al MTB (39-41). También se han detectado células T CD8⁺ específicas para MTB productoras de IFN- γ en sujetos con tuberculosis activa y coinfección por VIH (42, 43), así como en niños jóvenes con tuberculosis (44).

Principios del ensayo

El ensayo QFT-Plus utiliza tubos de recogida de sangre específicos para sangre total. La sangre se extrae en los tubos y se incuba entre 16 y 24 horas. Posteriormente se retira y analiza el plasma para determinar si se ha producido IFN- γ como reacción a los antígenos peptídicos.

La prueba QFT-Plus se lleva a cabo en dos fases. En primer lugar se recoge sangre total en cada uno de los QFT-Plus Blood Collection Tubes, que incluye un tubo Nil, un tubo TB1, un tubo TB2 y un tubo Mitogen. También existe la posibilidad de extraer la sangre en un tubo de recogida de sangre genérico con heparina de litio o heparina de sodio como anticoagulante y transferirla luego a los tubos para QFT-Plus.

El tubo Mitogen se puede utilizar como control positivo en la prueba QFT-Plus. Esto es importante en los casos en que existen dudas respecto al estado inmunitario del individuo.

El tubo Mitogen también sirve como control para asegurar una correcta manipulación e incubación de la sangre.

Los tubos para QFT-Plus se agitan para mezclar el antígeno con la sangre y deben incubarse a 37 °C lo antes posible durante las 16 horas posteriores a la recogida de sangre. Tras el periodo de incubación comprendido entre 16 y 24 horas, se centrifugan los tubos, se retira el plasma y se mide la cantidad producida de interferón IFN- γ (UI/ml) mediante el método ELISA. El ensayo QFT-Plus ELISA utiliza IFN- γ Standard humano recombinante que se ha analizado comparándolo con una preparación de IFN- γ de referencia (ref. de NIH: Gxg01-902-535). Los resultados de la muestra de la prueba se indican en Unidades internacionales por ml (UI/ml) relativas a la curva estándar preparada mediante el análisis de las diluciones del estándar suministrado con el kit.

Se sabe que los anticuerpos heterófilos (p. ej., humanos antirrattón) presentes en el suero o plasma de determinados sujetos causan interferencias con los inmunoanálisis. El efecto de los anticuerpos heterófilos en el ensayo QFT-Plus ELISA se minimiza mediante la adición de suero de ratón normal al diluyente verde y el uso de fragmentos de anticuerpos monoclonales F(ab')₂ como el anticuerpo de captura IFN- γ recubierto en la microplaca.

Se considera que el resultado del ensayo QFT-Plus es positivo si la producción de IFN- γ como reacción a cualquiera de los tubos de antígeno TB es claramente superior al valor en UI/ml de Nil para IFN- γ . La muestra de plasma del tubo Mitogen sirve como control positivo de IFN- γ para cada muestra analizada. Una reacción baja al Mitogen (<0,5 UI/ml) indica un resultado indeterminado cuando la muestra de sangre también presenta una reacción negativa ante los antígenos TB. Este resultado puede producirse con un número insuficiente de linfocitos, con una menor actividad de los mismos provocada por una manipulación incorrecta de las muestras, con un llenado/mezclado incorrecto del tubo Mitogen o con la incapacidad de los linfocitos del paciente de producir IFN- γ . Se pueden producir niveles elevados de IFN- γ en la muestra de Nil debido a la presencia de anticuerpos heterófilos o a la secreción intrínseca de IFN- γ . El tubo Nil ajusta el fondo (p. ej., niveles elevados de IFN- γ en circulación o la presencia de anticuerpos heterófilos). El nivel de IFN- γ en el tubo Nil se sustrae del nivel de IFN- γ en los tubos de antígeno TB y en el tubo Mitogen.

Tiempo necesario para la realización del ensayo

A continuación se indica una estimación del tiempo necesario para llevar a cabo el ensayo QFT-Plus ELISA, así como el tiempo necesario para analizar varias muestras si vienen en lotes:

Tubos de sangre para la
incubación a 37 °C:

de 16 a 24 horas

ELISA:

Aprox. 3 horas para una placa de ELISA

(22 personas)

<1 hora de trabajo

Añadir de 10 a 15 minutos para cada placa adicional

Componentes y almacenamiento

Tubos de recogida de sangre*		200 tubos	Envase de paciente individual	Envase de distribución	200 tubos HA	Envase de paciente individual HA	Envase de distribución HA
N.º de referencia		622526	622222	622423	623526	623222	623423
Número de pruebas/paquete		50	10	25	50	10	25
QuantiFERON Nil Tube (tapón gris y anillo blanco)	Nil	50 tubos	10 tubos	25 tubos			
QuantiFERON TB1 Tube (tapón verde y anillo blanco)	TB1	50 tubos	10 tubos	25 tubos			
QuantiFERON TB2 Tube (tapón amarillo y anillo blanco)	TB2	50 tubos	10 tubos	25 tubos			
QuantiFERON Mitogen Tube (tapón morado y anillo blanco)	Mitogen	50 tubos	10 tubos	25 tubos			
QuantiFERON Nil HA Tube (tapón gris y anillo amarillo)	Nil HA				50 tubos	10 tubos	25 tubos
QuantiFERON TB1 HA Tube (tapón verde y anillo amarillo)	TB1 HA				50 tubos	10 tubos	25 tubos
QuantiFERON TB2 HA Tube (tapón amarillo y anillo amarillo)	TB2 HA				50 tubos	10 tubos	25 tubos
QuantiFERON Mitogen HA Tube (tapón morado y anillo amarillo)	Mitogen HA				50 tubos	10 tubos	25 tubos
Prospecto de los QFT-Plus Blood Collection Tubes		1	1	1	1	1	1

* Algunas configuraciones del producto pueden no estar disponibles en algunos países. Póngase en contacto con el centro de atención al cliente de QIAGEN (encontrará la información en la página www.qiagen.com) para obtener más información sobre las configuraciones disponibles.

Componentes para ELISA† N.º de referencia	Kit ELISA para 2 placas 622120	Envase de referencia (laboratorio) 622822
Microplate Strips (Tiras de microplacas, 12 x 8 pocillos) revestidas con anticuerpos monoclonales murinos antihumano IFN- γ	2 tiras de microplacas de 96 pocillos	20 tiras de microplacas de 96 pocillos
IFN- γ Standard, lyophilized (estándar de IFN- γ , liofilizado; contiene IFN- γ humano recombinante, caseína bovina, 0,01% p/v de timerosal)	1 x vial (8 UI/ml después de su reconstitución)	10 x vial (8 UI/ml después de su reconstitución)
Green Diluent (Diluyente verde, contiene caseína bovina, suero de ratón normal, 0,01% p/v de timerosal)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Conjugado 100x concentrado y liofilizado, IFN- γ HRP murino antihumano, contiene 0,01% p/v de timerosal)	1 x 0,3 ml (después de su reconstitución)	10 x 0,3 ml (después de su reconstitución)
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampón de lavado 20x concentrado, pH 7,2, contiene 0,05% v/v de ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (solución enzimática de sustrato, contiene H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (solución enzimática de parada, contiene 0,5 M H ₂ SO ₄)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Prospecto de QFT-Plus ELISA	1	1

† Consulte la página 15 para conocer las indicaciones de peligro y precaución.

Materiales necesarios pero no suministrados

- Incubador de 37 °C ± 1 °C*. No se necesita CO₂
- Pipetas calibradas de volumen variable* para manejar entre 10 µl y 1.000 µl con tiras desechables
- Pipeta multicanal calibrada* capaz de dispensar 50 µl y 100 µl con puntas desechables
- Tapa para la placa
- Agitador de microplacas*
- Agua desionizada o destilada, 2 litros
- Lavador de microplacas (se recomienda un lavador automatizado)
- Lector de microplacas* equipado con un filtro de 450 nm y un filtro de referencia entre 620 nm y 650 nm

* Asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Manipulación y almacenamiento de muestras

Tubos de recogida de sangre

- Conservar los tubos de recogida de sangre a una temperatura de 4 °C a 25 °C.

Reactivos del kit

- Guarde los reactivos del kit a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C.
- Proteja en todo momento la solución enzimática de sustrato de la luz directa del sol.

Reactivos reconstituidos sin utilizar

Consulte la página 27 para obtener las instrucciones sobre cómo reconstituir los reactivos.

- El estándar reconstituido del kit puede conservarse durante 3 meses como máximo si se almacena a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

Anote la fecha de reconstitución del estándar del kit.

- Una vez reconstituido, el conjugado 100x concentrado que no se haya utilizado debe volver a almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C y debe utilizarse durante los 3 meses siguientes.

Anote la fecha de reconstitución del conjugado.

- El conjugado listo para el uso debe utilizarse en las 6 horas siguientes a su preparación.
- El tampón de lavado listo para el uso puede almacenarse a temperatura ambiente un máximo de 2 semanas.

Advertencias y precauciones

Solo para uso de diagnóstico in vitro.

Advertencias

- Un resultado negativo del QFT-Plus no descarta la posibilidad de una infección por *M. tuberculosis* o de que se padezca tuberculosis: los falsos negativos pueden deberse a la etapa de la infección en que se encuentre el paciente (p. ej., si la muestra se ha obtenido antes de que se desarrolle la respuesta celular inmunitaria), a enfermedades asociadas que afecten al mecanismo inmunitario, a una incorrecta manipulación de los tubos de recogida de sangre después de la venopunción, a una realización errónea del ensayo o a otras variables inmunológicas.
- Un resultado positivo del QFT-Plus tampoco debe considerarse como prueba única o definitiva de la existencia de una infección por *M. tuberculosis*. Una realización incorrecta del ensayo puede generar falsos positivos.
- Después de obtener un resultado positivo para el QFT-Plus, deben realizarse otros ensayos médicos y de diagnóstico para comprobar la existencia de una tuberculosis activa (p. ej., frotis y cultivo BAR, radiografía de tórax).
- Aunque las proteínas ESAT-6 y CFP-10 no están presentes en ninguna de las cepas de BCG ni en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas, es posible que un resultado positivo del ensayo QFT-Plus se deba a una infección por *M. kansasii*, *M. szulgai* o *M. marinum*. Si se sospecha de la existencia de tales infecciones, deberán realizarse pruebas alternativas.

Precauciones

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener información adicional, consulte las hojas de datos sobre seguridad (safety data sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits de QIAGEN.



PRECAUCIÓN: manipule la sangre y el plasma humanos como material potencialmente infeccioso. Cumpla las directrices pertinentes para la manipulación de sangre y productos sanguíneos. Elimine las muestras y los materiales que hayan estado en contacto con la sangre o los productos sanguíneos según la normativa federal, nacional y local.

Las siguientes indicaciones de peligro y precaución hacen referencia a los componentes del kit QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA.

Indicaciones de peligro



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Contiene: ácido sulfúrico. ¡Advertencia! Puede ser corrosivo para los metales. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

¡Advertencia! Causa irritación leve de la piel. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.



QuantiFERON Green Diluent

Contiene: 5-hidroxi-1-(4-sulfonil)-4-(4-sulfonilazo)pirazol-3-carboxilato de trisodio. Contiene: tartrazina. ¡Advertencia! Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Contiene: mezcla de 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-2H-isotiazol-3-ona (3:1). Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos a largo plazo. Evitar su emisión en el medio ambiente.

Indicaciones de precaución

Pedir instrucciones especiales antes del uso. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. **EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL** (o el cabello): Quitarse inmediatamente la ropa contaminada, manchada o salpicada. Lavarse la piel con agua o ducharse. **EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS:** Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. En caso de exposición manifiesta o presunta: consultar a un médico. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLÓGICA o a un médico. En caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Guardar bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado.

Más información

Hojas de datos sobre seguridad: www.qiagen.com/safety

- Cualquier desviación respecto al procedimiento indicado en el *Prospecto de QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA* puede generar resultados erróneos. Lea las instrucciones atentamente antes de proceder.

-
- No utilice el kit si algún frasco de reactivo muestra signos de estar dañado o perder líquido.
 - **Importante:** Inspeccione los viales antes de utilizarlos. No utilice viales de conjugado o de estándar de IFN- γ que muestren signos de daños o en los que el sello de goma no esté intacto. No utilice viales rotos. Adopte las precauciones de seguridad apropiadas para eliminar los viales de forma segura. Recomendación: Use un destaponador de viales para abrir los viales de conjugado o de estándar de IFN- γ a fin de minimizar el riesgo de lesiones producidas por las tapas metálicas de rosca.
 - No mezcle ni utilice las tiras de microplacas, estándar de IFN- γ , diluyente verde o conjugado 100x concentrado de diferentes lotes del kit QFT-Plus. Otros reactivos (tampón de lavado 20x concentrado, solución enzimática de sustrato y solución enzimática de parada) pueden intercambiarse entre kits siempre y cuando los reactivos no hayan caducado y se anote la información de los lotes.
 - Elimine los reactivos no utilizados y las muestras biológicas de acuerdo con la normativa local, regional y nacional correspondiente.
 - No utilice los QFT-Plus Blood Collection Tubes o el kit ELISA después de la fecha de caducidad indicada.
 - Se deben seguir en todo momento los procedimientos de laboratorio correctos.
 - Asegúrese de que el equipo de laboratorio se ha calibrado/validado para el uso.

Obtención y manipulación de muestras

El ensayo QFT Plus utiliza los siguientes tubos de recogida:

1. Tubos QuantiFERON Nil (tapón gris y anillo blanco)
2. Tubos QuantiFERON TB1 (tapón verde y anillo blanco)
3. Tubos QuantiFERON TB2 (tapón amarillo y anillo blanco)
4. Tubos QuantiFERON Mitogen (tapón morado y anillo blanco)
5. Tubos QuantiFERON HA Nil (tapón gris y anillo amarillo)
6. Tubos QuantiFERON HA TB1 (tapón verde y anillo amarillo)
7. Tubos QuantiFERON HA TB2 (tapón amarillo y anillo amarillo)
8. Tubos QuantiFERON HA Mitogen (tapón morado y anillo amarillo)

Los antígenos se secan y adhieren a la pared interior del tubo de recogida de sangre, por lo que es imprescindible mezclar cuidadosamente el contenido de los tubos con la sangre. Cuando la sangre se extrae en tubos para QFT-Plus, estos deben mantenerse y transportarse a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$); se deben llevar al incubador a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ lo antes posible y durante las 16 horas posteriores a la recogida. De manera alternativa, puede extraer la sangre en un tubo de recogida de sangre con heparina de litio o heparina de sodio para almacenarla antes de transferirla a los QFT-Plus y a la incubación. Las muestras de sangre extraídas en heparina de litio o heparina de sodio se pueden almacenar hasta 16 horas a temperatura ambiente ($17\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y, a continuación, se deben transferir a tubos QFT-Plus. Las muestras de sangre en tubos con heparina de litio o heparina de sodio también se pueden almacenar a $2\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta 48 horas antes de transferirla a tubos QFT-Plus. Consulte la sección "Recogida de sangre en un único tubo con heparina de litio o heparina de sodio y transferencia a los QFT-Plus Blood Collection Tubes".

Extracción directa en los QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Etiquete los tubos correctamente.

Asegúrese de que cada tubo (Nil, TB1, TB2 y Mitogen) se pueda identificar por su etiqueta o por otros medios cuando se retire el tapón.

Se recomienda apuntar la hora y la fecha de la recogida de sangre.

2. Extraiga 1 ml de sangre de cada paciente mediante venopunción directamente en uno de los QFT-Plus Blood Collection Tubes. Esta operación debería ser tarea exclusiva de un flebotomista cualificado.

Nota importante: los tubos se deben encontrar a una temperatura comprendida entre 17 y 25 °C en el momento de llenarlos de sangre.

Los QFT-Plus Blood Collection Tubes estándar pueden utilizarse hasta 810 metros por encima del nivel del mar. Los QFT-Plus Blood Collection Tubes de HA (altitud elevada) pueden utilizarse a una altitud entre 1.020 metros y 1.875 metros por encima del nivel del mar.

Como los tubos de 1 ml absorben la sangre relativamente despacio, mantenga el tubo adherido a la aguja durante 2-3 segundos cuando parezca que está lleno del todo. De este modo conseguirá extraer el volumen correcto.

- La marca negra del lateral de los tubos indica el intervalo validado comprendido entre 0,8 y 1,2 ml. Si el nivel de sangre de un tubo está fuera del intervalo de la marca indicativa, debería extraerse una muestra de sangre nueva. Si el llenado de los tubos es inferior o superior al rango de entre 0,8 ml y 1,2 ml, pueden obtenerse resultados erróneos.
- Si utiliza una aguja con aletas para extraer la sangre, utilice un tubo de purga para asegurarse de que el conducto está lleno de sangre antes de transferirla a los tubos para QFT-Plus.
- Si utiliza QFT-Plus Blood Collection Tubes a una altitud de más de 810 metros, o si el volumen de sangre extraído es insuficiente, se puede extraer la sangre con una jeringa y transferir inmediatamente después 1 ml a cada uno de los 4 tubos. Por motivos de seguridad, la mejor forma de realizar este proceso es

quitar la aguja de la jeringa tomando las precauciones oportunas, quitar los tapones de los 4 tubos para QFT-Plus y añadir 1 ml de sangre a cada uno (hasta llegar al centro de la marca negra situada en el lateral de la etiqueta del tubo). Vuelva a colocar bien los tapones y mezcle como se describe a continuación. Asegúrese de que cada tubo (Nil, TB1, TB2 y Mitogen) se pueda identificar por su etiqueta o por otros medios cuando se retire el tapón.

3. Inmediatamente después de llenar los tubos, agítelos diez (10) veces aplicando únicamente la fuerza necesaria para cubrir de sangre toda la superficie interna del tubo. Con ello se consigue disolver el antígeno de las paredes del tubo.

Nota importante: Los tubos se deben encontrar a una temperatura comprendida entre 17 y 25 °C en el momento de agitarlos. Si agita el tubo con demasiada fuerza, puede provocar una alteración del gel, lo que alteraría los resultados.

4. Tras el etiquetado, el llenado y la agitación, coloque los tubos en un incubador a 37 °C ± 1 °C lo antes posible, y siempre durante las 16 horas siguientes a la obtención de la sangre. Antes de la incubación, mantenga y transporte los tubos a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C). Si los tubos para QFT-Plus no se incuban a 37 °C directamente después de la recogida de sangre y agitarlos, invierta los tubos para que se mezclen 10 veces antes de la incubación a 37 °C.
5. Incube los tubos para QFT-Plus EN POSICIÓN VERTICAL a 37 °C ± 1 °C durante un periodo comprendido entre 16 y 24 horas. El incubador no requiere CO₂ ni humidificación.

Recogida de sangre en un único tubo con heparina de litio o heparina de sodio y transferencia a los QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Puede extraer la sangre en un tubo de recogida de sangre con heparina de litio o de sodio como anticoagulante y transferirla luego a los QFT-Plus Blood Collection Tubes. Utilice solo heparina de litio o de sodio como anticoagulante sanguíneo porque los demás anticoagulantes interfieren en el ensayo. Etiquete los tubos correctamente.

Se recomienda apuntar en la etiqueta del tubo la hora y la fecha de la recogida de sangre.

Importante: Los tubos de recogida de sangre deben estar a temperatura ambiente (17-25 °C) en el momento de la recogida de sangre.

2. Llene un tubo de recogida de sangre de heparina de litio o de sodio (volumen mínimo 5 ml) y mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo varias veces para disolver la heparina. Esta operación debería ser tarea exclusiva de un flebotomista cualificado.
3. Opciones de tiempo de retención y de temperatura para tubos con heparina de litio o de sodio antes de la transferencia y la incubación en QFT-Plus Blood Collection Tubes (consulte las figuras 1-3: opciones de recogida de sangre).

Opción 1 – Almacenamiento y manipulación a temperatura ambiente de tubos con heparina de litio o de sodio. La sangre extraída en tubos con heparina de litio o de sodio debe mantenerse a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C) durante un máximo de 16 horas desde la recogida antes de transferirla a QFT-Plus Blood Collection Tubes y antes de la incubación posterior.

Opción 2 – Almacenamiento refrigerado y manipulación de tubos con heparina de litio o de sodio

Importante: Se deben seguir en orden los pasos del a al d del procedimiento.

- a. La sangre extraída en un tubo con heparina de litio o de sodio puede conservarse a temperatura ambiente (17 °C-25 °C) hasta 3 horas tras la recogida de sangre.
- b. La sangre extraída en un tubo con heparina de litio o de sodio puede refrigerarse (2 °C-8 °C) hasta 48 horas.
- c. Tras la refrigeración, el tubo con heparina de litio o de sodio debe estabilizarse a temperatura ambiente (17 °C-25 °C) antes de transferir la sangre a los QFT-Plus Blood Collection Tubes.
- d. Los QFT-Plus Blood Collection Tubes alicuotados deben incubarse a 37 °C dentro de un periodo de 2 horas tras transferir la sangre.

Si los QFT-Plus Blood Collection Tubes no se incuban a 37 °C justo después de transferir la sangre a los QFT-Plus Blood Collection Tubes y agitarlos, invierta los tubos para que se mezclen 10 veces antes de la incubación a 37 °C. El tiempo total desde la extracción de sangre hasta la incubación en los QFT-Plus Blood Collection Tubes no debe superar las 53 horas.

4. Transferencia de una muestra de sangre de un tubo con heparina de litio o de sodio a los QFT-Plus Blood Collection Tubes:
 - a. Etiquete cada QFT-Plus Blood Collection Tube correctamente.

Asegúrese de que cada tubo (Nil, TB1, TB2 y Mitogen) se pueda identificar por su etiqueta o por otros medios cuando se retire el tapón. Se recomienda trasladar la hora y fecha apuntadas de la recogida de sangre de los tubos con heparina de litio o de sodio a los QFT-Plus Blood Collection Tubes.
 - b. Las muestras deben mezclarse uniformemente invirtiendo con cuidado antes de transferirlas a los QFT-Plus Blood Collection Tubes.
 - c. La transferencia debe ser de forma aséptica y tomando las precauciones oportunas para quitar los tapones de los cuatro QFT-Plus Blood Collection Tubes y añadir 1 ml de sangre a cada uno. Vuelva a colocar los tapones y mezcle tal como se describe más abajo. Asegúrese de que cada tubo (Nil, TB1, TB2 y Mitogen) se pueda identificar por su etiqueta o por otros medios cuando se retire el tapón.
5. Mezcle los tubos. Inmediatamente después de llenar los QFT-Plus Blood Collection Tubes, agítelos diez (10) veces aplicando únicamente la fuerza necesaria para cubrir de sangre toda la superficie interna del tubo. Con ello se consigue disolver el antígeno de las paredes del tubo.

Si agita el tubo con demasiada fuerza, puede provocar una alteración del gel, lo que alteraría los resultados.

6. Tras el etiquetado, el llenado y la agitación, coloque los tubos en el incubador a 37 °C ± 1 °C dentro de las 2 horas siguientes. Si los QFT-Plus Blood Collection Tubes no se incuban a 37 °C justo después de extraer la sangre y agitarlos, invierta los tubos para

que se mezclen 10 veces (x10) antes de la incubación a 37 °C (consulte las figuras 1-3 de la siguiente página para ver las opciones de recogida de sangre).

7. Incube los QFT-Plus Blood Collection Tubes EN POSICIÓN VERTICAL a 37 °C ± 1 °C durante un periodo comprendido entre 16 y 24 horas. El incubador no requiere CO₂ ni humidificación.

Realice la extracción en los QFT-Plus Blood Collection Tubes y manténgalos a temperatura ambiente.

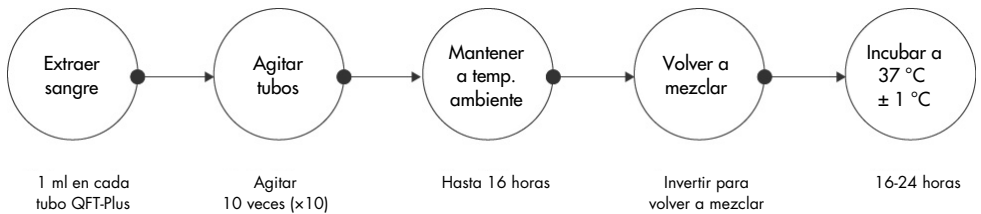


Figura 1. Opción de recogida de sangre: extraiga directamente en los QFT-Plus Blood Collection Tubes y manténgalos a temperatura ambiente. El tiempo total desde la extracción de sangre en los QFT-Plus Blood Collection Tubes hasta la incubación a 37 °C no debe superar las 16 horas.

Realice la extracción en un tubo con heparina de litio o de sodio y manténgalo a temperatura ambiente.



Figura 2. Opción de recogida de sangre: Realice la extracción en un tubo con heparina de litio o de sodio y manténgalo a temperatura ambiente. El tiempo total desde la extracción de sangre en un tubo con heparina de litio o de sodio hasta la incubación a 37 °C no debe superar las 16 horas.

Realice la extracción en tubos con heparina de litio o de sodio y manténgalos a 2 °C-8 °C.

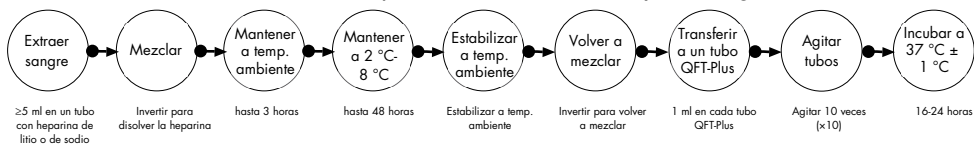


Figura 3. Opción de recogida de sangre: realice la extracción en un tubo con heparina de litio o de sodio y manténgalo a 2 °C-8 °C. El tiempo total desde la extracción de sangre en un tubo con heparina de litio o de sodio hasta la incubación a 37 °C no debe superar las 53 horas.

Instrucciones de uso

Fase 1: incubación de la sangre y extracción del plasma

Materiales suministrados

- QFT-Plus Blood Collection Tubes (consulte el apartado 3)

Materiales necesarios (pero no suministrados)

- Consulte el apartado 3

Procedimiento

1. Si la sangre no se coloca en el incubador inmediatamente después de su obtención, vuelva a mezclar los tubos invirtiéndolos 10 veces inmediatamente antes de la incubación.
2. Incube los tubos EN POSICIÓN VERTICAL a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por un periodo comprendido entre 16 y 24 horas. El incubador no requiere CO₂ ni humidificación.
3. Una vez finalizada la incubación a 37 °C , los tubos de recogida de sangre pueden conservarse entre 4 °C y 27 °C durante 3 días antes de centrifugarlos.
4. Después de la incubación de los tubos a 37 °C , centrifúgelos durante 15 minutos a una velocidad comprendida entre 2.000 y $3.000 \times \text{RCF}$ (g) para obtener el plasma. El tapón de gelatina separa las células del plasma. Si esto no ocurre, vuelva a centrifugar los tubos.

Es posible obtener el plasma sin centrifugar, pero es necesario extremar la precaución al máximo para retirar el plasma sin alterar las células.

5. Las muestras de plasma solo se deben extraer con ayuda de una pipeta.

Nota importante: Después del centrifugado, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de la extracción. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.

Las muestras de plasma pueden cargarse directamente desde los tubos de recogida de sangre centrifugados a la placa ELISA para QFT-Plus, incluso si se utilizan equipos ELISA automatizados.

Las muestras de plasma pueden almacenarse durante 28 días a una temperatura entre 2 y 8 °C o, después de la extracción del plasma, por debajo de -20 °C durante periodos más largos.

Se necesita un volumen mínimo de 150 µl de plasma para garantizar la idoneidad de las muestras de la prueba.

Fase 2: ELISA para IFN-γ

Materiales suministrados

- Kit QFT-Plus ELISA (consulte el apartado 3)

Materiales necesarios pero no suministrados

- Consulte el apartado 3.

Procedimiento

1. Todas las muestras de plasma y los reactivos, excepto el conjugado 100x concentrado deben estar a temperatura ambiente ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) antes de ser utilizados. Espere por lo menos 60 minutos para permitir el equilibrado.
2. Retire las tiras innecesarias del bastidor, vuelva a cerrar la bolsita de aluminio y colóquela de nuevo en la nevera donde quedará almacenada hasta que se necesite.
Deje por lo menos 1 tira para los estándares del QFT-Plus y tiras suficientes para el número de sujetos que se quieran analizar (consulte la Figura 5). Después, guarde el bastidor para usarlo con el resto de las tiras.
3. Reconstituya el estándar de IFN-γ añadiendo el volumen de agua desionizada o destilada que se indica en la etiqueta del vial. Mezcle cuidadosamente para evitar la formación de

espuma y lograr así una solubilización completa. Después de reconstituir el estándar con el volumen indicado se obtiene una solución con una concentración de 8,0 UI/ml.

Nota importante: El volumen para reconstitución del estándar del kit varía de un lote a otro. Use el calibrador (estándar o patrón) reconstituido del kit para producir una dilución 1 en 2, seguido de series de diluciones 1 en 4 de IFN- γ en diluyente verde (GD) (consulte la Figura 4). El S1 (estándar 1) contiene 4,0 UI/ml, el S2 (estándar 2) contiene 1,0 UI/ml, el S3 (estándar 3) contiene 0,25 UI/ml y el S4 (estándar 4) contiene 0 UI/ml (solamente GD). Los estándares deben analizarse al menos por duplicado. Prepare diluciones nuevas del estándar del kit para cada ensayo ELISA.

Procedimiento recomendado para estándares duplicados
Marque los 4 tubos "S1", "S2", "S3", "S4".
Añada 150 μ l de GD a S1, S2, S3 y S4.
Añada 150 μ l del estándar del kit a S1 y mezcle bien.
Transfiera 50 μ l de S1 a S2 y mezcle bien.
Transfiera 50 μ l de S2 a S3 y mezcle bien.
GD por sí solo sirve como estándar cero (S4).

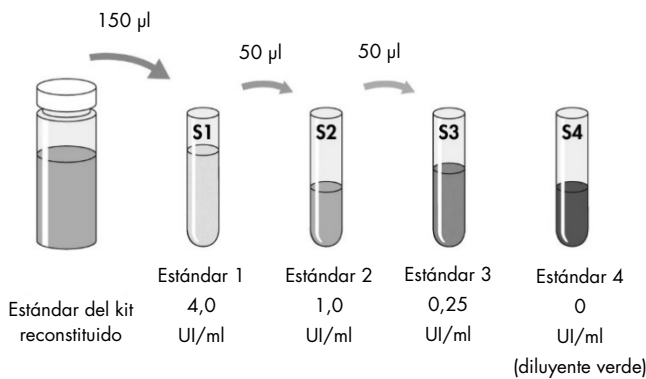


Figura 4. Preparación de la curva del estándar.

4. Reconstituya el conjugado 100x concentrado liofilizado con 0,3 ml de agua desionizada o destilada. Mezcle cuidadosamente para minimizar la formación de espuma y lograr así una solubilización completa del conjugado.

El conjugado listo para utilizar se prepara diluyendo la cantidad necesaria de conjugado 100x concentrado en diluyente verde (Tabla 1. Preparación del conjugado). Devuelva el conjugado 100x concentrado sin usar a una temperatura de 2 °C a 8 °C justo después del uso. Utilice exclusivamente diluyente verde.

Tabla 1. Preparación del conjugado

Número de tiras	Volumen de conjugado 100x concentrado	Volumen de diluyente 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. Mezcle bien las muestras de plasma procedentes de los tubos de recogida de sangre que hayan sido almacenadas (refrigeradas o congeladas) antes de verterlas en el pocillo ELISA. Nota importante: Si las muestras de plasma se añaden directamente desde los tubos para QFT-Plus centrifugados, evite mezclar el plasma. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.
6. Añada 50 µl de conjugado recién preparado listo para usar a los pocillos de ELISA mediante una pipeta multicanal.

7. Añada 50 µl de muestras de plasma para analizar a los pocillos correspondientes usando una pipeta multicanal (consulte la distribución recomendada de muestras en la Figura 5). Para terminar, añada 50 µl a cada uno de los estándares 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. Distribución recomendada de muestras (22 pruebas por placa)

S1 (estándar 1), S2 (estándar 2), S3 (estándar 3), S4 (estándar 4)

1 N (muestra 1, plasma de Nil), 1 TB1 (muestra 1, plasma de TB1), 1 TB2 (muestra 1, plasma de TB2),

1 M (muestra 1, plasma de Mitogen)

8. Tape cada una de las placas y mezcle bien el conjugado y las muestras de plasma/estándares durante 1 minuto en un agitador de microplacas. Evite las salpicaduras.
9. Tape cada una de las placas e incúbelas a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 120 ± 5 minutos.
- No exponga las placas a la luz directa del sol durante la incubación.
10. Durante la incubación, diluya una parte del tampón de lavado 20x concentrado con 19 partes de agua desionizada o destilada y mezcle bien. Se incluye suficiente tampón de lavado 20x concentrado para preparar 2 litros de tampón de lavado listo para utilizar.
- Lave los pocillos con 400 µl de tampón de lavado listo para usar durante al menos 6 ciclos. Se recomienda utilizar un lavador de placas automatizado.
- Es muy importante lavar bien las placas para que el análisis dé los resultados esperados. Asegúrese de que todos los pocillos están completamente llenos de tampón de lavado

hasta el borde antes de iniciar cada ciclo de lavado. Se recomienda un período de remojo de al menos 5 segundos entre cada ciclo.

Añada desinfectante normal de laboratorio al depósito de evacuación y siga los procedimientos establecidos para descontaminar materiales potencialmente infecciosos.

11. Coloque las placas boca abajo sobre un paño absorbente sin pelusa y dé unos toquitos para escurrir los restos de tampón de lavado que puedan quedar. Añada 100 µl de solución enzimática de sustrato a cada pocillo, tape cada placa y mezcle bien con un agitador de microplacas.
12. Tape cada una de las placas e incúbelas a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos.

No exponga las placas a la luz directa del sol durante la incubación.

13. Después del período de incubación de 30 minutos, añada 50 µl de solución enzimática de parada a cada pocillo y mezcle.

Se añadirá la solución enzimática de parada a los pocillos en el mismo orden y aproximadamente a la misma velocidad que el sustrato en el paso 11.

14. Mida la densidad óptica (Optical Density, OD) de cada pocillo en los 5 minutos siguientes a la detención de la reacción utilizando un lector de microplacas con un filtro de 450 nm y un filtro de referencia de 620 nm a 650 nm. Los valores de OD (Optical Density) se utilizan para calcular los resultados.

Cálculos e interpretación de la prueba

El programa de análisis de QFT-Plus se utiliza para analizar los datos obtenidos y calcular los resultados. Puede obtenerlo desde www.QuantiFERON.com. Asegúrese de utilizar la versión más actualizada del programa de análisis de QFT-Plus.

El programa evalúa la calidad del análisis, genera una curva estándar y proporciona un resultado de la prueba para cada sujeto, calculado tal y como se describe en el apartado Interpretación de los resultados.

En lugar de utilizar el programa de análisis de QFT-Plus, pueden determinarse los resultados con el siguiente método.

Generación de curva estándar

(Cuando no se utiliza el programa de QFT-Plus)

Determine los valores de OD medios de las réplicas del estándar del kit para cada placa.

Genere una curva estándar en escala $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ mediante el trazado del $\log_{(e)}$ de la OD media (eje y) con relación al $\log_{(e)}$ de la concentración de IFN- γ en los estándares en UI/ml (eje x), sin incluir el estándar cero en el cálculo. Calcule la línea que mejor se adapte a la curva estándar mediante análisis regresivo.

Utilice la curva estándar para determinar la concentración de IFN- γ (UI/ml) en cada una de las muestras de plasma de la prueba, utilizando para ello el valor de OD de cada muestra.

Estos cálculos pueden realizarse con diversos paquetes de software que existen en el mercado para lectores de microplacas, así como con hojas de cálculos o programas estadísticos habituales (como por ejemplo Microsoft® Excel®). Se recomienda usar estos paquetes para calcular el análisis de regresión, el coeficiente de variación (coefficient of variation, % CV) de los estándares y el coeficiente de correlación (r) de la curva estándar.

Control de calidad de la prueba

La exactitud de los resultados de la prueba dependerá de la precisión de la curva estándar que se genere. Por consiguiente, deben revisarse los resultados extraídos de los estándares antes de interpretar los resultados correspondientes a las muestras analizadas.

Para que el ensayo ELISA se considere válido:

- El valor de OD medio para el estándar 1 debe ser $\geq 0,600$.
- El % CV de los valores OD de las réplicas del estándar 1 y el estándar 2 debe ser $\leq 15\%$.
- Los valores OD de las réplicas del estándar 3 y del estándar 4 no deben alejarse en más de 0,040 unidades de densidad óptica de su media.
- El coeficiente de correlación (r) calculado a partir de los valores medios de absorbancia de los estándares debe ser $\geq 0,98$.

El programa de análisis de QFT-Plus calcula y muestra los valores de estos parámetros de control de calidad.

Si no se cumplen los requisitos indicados, se considera que el análisis no es válido y es preciso repetirlo.

El valor de OD medio para el estándar cero (diluyente verde) debería ser $\leq 0,150$. Si el valor de OD medio es $> 0,150$, debería revisarse el procedimiento de lavado de placas.

Interpretación de los resultados

Los resultados del ensayo QFT-Plus se interpretarán según los siguientes criterios (Tabla 2):

Nota importante: para diagnosticar o descartar una tuberculosis, o para evaluar la probabilidad de una infección latente por tuberculosis (LTBI), es necesario recabar una serie de datos epidemiológicos, históricos, médicos y diagnósticos que habrá que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados del QFT-Plus.

Tabla 2. Interpretación de los resultados del QFT-Plus

Nil (UI/ml)	TB1 menos Nil (UI/ml)	TB2 menos Nil (UI/ml)	Mitogen menos Nil(UI/ml)*	Resultado del QFT-Plus	Informe/Interpretación
≤8,0	≥0,35 y ≥25% del valor de Nil	Cualquiera	Cualquiera	Positivo [†]	Infección por <i>M. tuberculosis</i> probable
	Cualquiera	≥0,35 y ≥25% del valor de Nil			
	<0,35 O ≥0,35 y <25% del valor de Nil	<0,35 O ≥0,35 y <25% del valor de Nil	≥0,5	Negativo	Infección por <i>M. tuberculosis</i> IMprobable
>8,0 [§]	<0,35 O ≥0,35 y <25% del valor de Nil	<0,35 O ≥0,35 y <25% del valor de Nil	<0,5	Indeterminado [‡]	La probabilidad de infección por <i>M. tuberculosis</i> no se puede determinar
		Cualquiera		Indeterminado [‡]	La probabilidad de infección por <i>M. tuberculosis</i> no se puede determinar

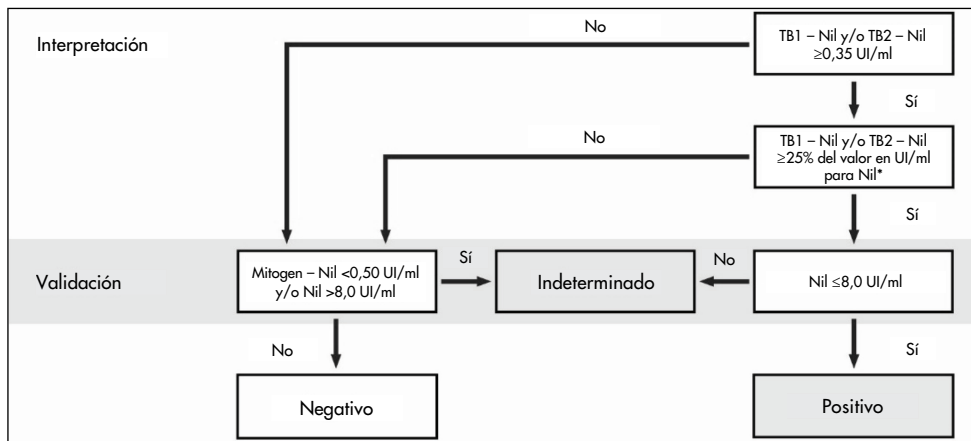
* Las reacciones al control positivo del Mitogen (y en ocasiones a los antígenos TB) pueden estar fuera del rango del lector de microplacas. Esto no afecta a los resultados de la prueba. El software QFT-Plus notifica los valores >10 ml como >10 UI/ml.

[†] Si no se sospecha una infección por *M. tuberculosis*, un resultado inicialmente positivo puede confirmarse volviendo a analizar por duplicado las muestras de plasma originales con el ensayo QFT-Plus ELISA. Si el análisis duplicado de una o de ambas réplicas da positivo, se considerará que el individuo ha dado positivo en la prueba.

[‡] Consulte el apartado "Resolución de problemas" para conocer las posibles causas.

[§] En estudios clínicos, menos del 0,25% de los sujetos presentaron niveles de IFN- γ de >8,0 UI/ml para el valor de Nil.

Es imposible establecer correlación alguna entre el nivel de IFN- γ medido y la fase o el grado de infección, de respuesta inmunitaria o la probabilidad de que la enfermedad entre en su fase activa. Es extraño obtener una respuesta positiva al antígeno TB en personas negativas al Mitogen, aunque se han dado casos en pacientes con tuberculosis. Esto indica que la respuesta del IFN- γ al antígeno TB es superior que a la del Mitogen, lo que es factible porque el nivel de Mitogen no estimula al máximo los linfocitos para que produzcan IFN- γ .



* Para que TB1 menos Nil o TB2 menos Nil sea válido, $\geq 25\%$ del valor en UI/ml de Nil debe proceder del mismo tubo que el resultado original de $\geq 0,35$ UI/ml.

Figura 6. Diagrama para la interpretación del QFT-Plus

Limitaciones

Los resultados del análisis QFT-Plus deben completarse con la epidemiología del individuo, estado físico actual y otras pruebas diagnósticas.

Los sujetos que presentan valores de Nil superiores a 8,0 UI/ml se clasifican como "indeterminados" porque las reacciones a los antígenos TB superiores en un 25% se consideran fuera de los límites de medición del ensayo.

Pueden darse resultados poco fiables o indeterminados si:

- No se siguen los pasos descritos en este prospecto.
- Existen volúmenes excesivos de IFN- γ en circulación o hay anticuerpos heterófilos
- Han pasado más de 16 horas entre la extracción de la muestra de sangre y la incubación a 37 °C. Esto no se aplica si se utiliza un tubo de heparina de litio o de sodio y se sigue el proceso de mantenerlo a 2-8 °C.

Características de rendimiento

Estudios clínicos

En la práctica no es posible evaluar la sensibilidad ni especificidad del ensayo QFT-Plus al no existir una prueba estándar definida para el diagnóstico de LTBI. La especificidad del QFT-Plus se ha determinado mediante aproximación a partir de las tasas de falsos positivos en personas de bajo riesgo (sin factores de riesgo conocidos) de infección por tuberculosis. La sensibilidad también se ha determinado mediante aproximación a partir de la evaluación de grupos de pacientes con tuberculosis activa confirmada mediante cultivo.

Especificidad

Se realizó un estudio para evaluar la especificidad del ensayo QFT-Plus con 409 sujetos. Los datos demográficos y los factores de riesgo de exposición a la tuberculosis se determinaron mediante un cuestionario estándar en el momento de la prueba.

Del resumen de datos obtenidos de los 2 grupos de pacientes con bajo riesgo (sin factores de riesgo conocidos) para la infección por tuberculosis, la especificidad global del QFT-Plus fue del 97,6% (399/409) (Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 3. Resultados del estudio sobre la especificidad del QFT-Plus según el lugar donde se realizó

Estudio	Positivo	Negativo	Indeterminado	Especificidad (IC 95%)
Japón	4	203	0	98% (95-100%)
Australia	6	196	0	97% (94-99%)

Tabla 4. Resultados del estudio sobre la especificidad del QFT-Plus según el TB Antigen Tube

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

Sensibilidad para la tuberculosis activa

Mientras no exista una prueba estándar definitiva para el diagnóstico de LTBI, se acepta el método del cultivo microbiológico de *M. tuberculosis*, ya que los pacientes con la enfermedad están infectados por definición. Para evaluar la sensibilidad del QFT-Plus se analizaron los sujetos procedentes de 4 centros de estudio en Australia y Japón sospechosos de padecer tuberculosis y cuya infección por *M. tuberculosis* se confirmó posteriormente mediante cultivo (Tabla 5 y Tabla 6). Los pacientes habían recibido un tratamiento de menos de 14 días antes de la recogida de sangre para el ensayo QFT-Plus.

Del resumen de datos obtenidos de los 4 grupos de pacientes positivos para *M. tuberculosis* mediante cultivo, la sensibilidad global del QFT-Plus para la tuberculosis activa fue del 95,3% (164/172). De los 4 grupos, 159 pacientes resultaron positivos mediante TB1 y TB2, 1 paciente resultó positivo mediante TB1 solamente y 4 pacientes resultaron positivos mediante TB2 solamente. Un total de 1,1% (2/174) de los resultados fueron indeterminados. El resultado para TB2 identificó correctamente 1 paciente confirmado mediante cultivo que hubiera resultado indeterminado (Mitogen bajo) solamente con el resultado para TB1 (consulte la Tabla 5 y la Tabla 6).

Tabla 5. Resultados del estudio sobre la sensibilidad del QFT-Plus según el lugar donde se realizó

Centros de estudio	Positivo	Negativo	Indeterminado	Sensibilidad del QFT-Plus* (IC 95%)
Centro de Japón 1	36	7	0	84% (69-93)
Centro de Japón 2	53	1	2	98% (90-100)
Centro de Japón 3	54	0	0	100% (93-100)
Centro de Australia	21	0	0	100% (84-100)

* La sensibilidad se basa en el número total de pruebas válidas, excluyendo los resultados indeterminados.

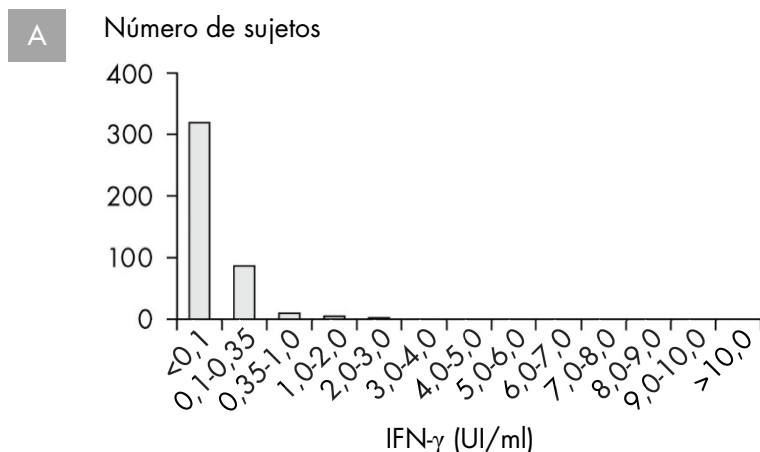
Tabla 6. Resultados del estudio sobre la sensibilidad del QFT-Plus según el TB Antigen Tube

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

* La sensibilidad se basa en el número total de pruebas válidas, excluyendo los resultados indeterminados.

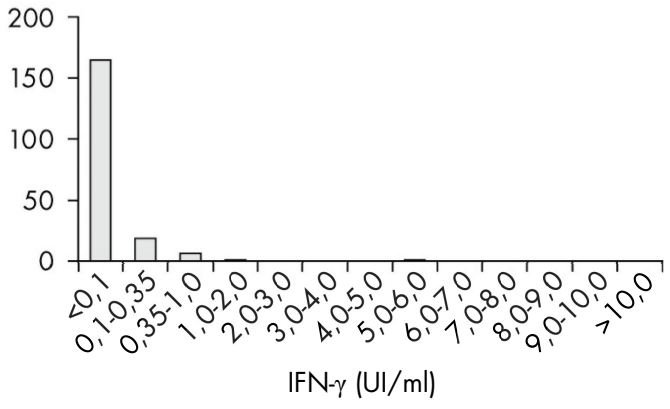
Distribuciones de respuesta observadas: estratificación del riesgo

En los ensayos clínicos se observaron varias respuestas del IFN- γ a los tubos de TB1, TB2 y de control y se estratificó el riesgo de infección por *M. tuberculosis* (Figuras 7-9). El grupo de riesgo mixto está formado por sujetos representativos de una población de ensayo general, formada por sujetos con y sin factores de riesgo de la exposición a la tuberculosis y en los que es poco frecuente la tuberculosis activa (es decir, LTBI).



B

Número de sujetos



C

Número de sujetos

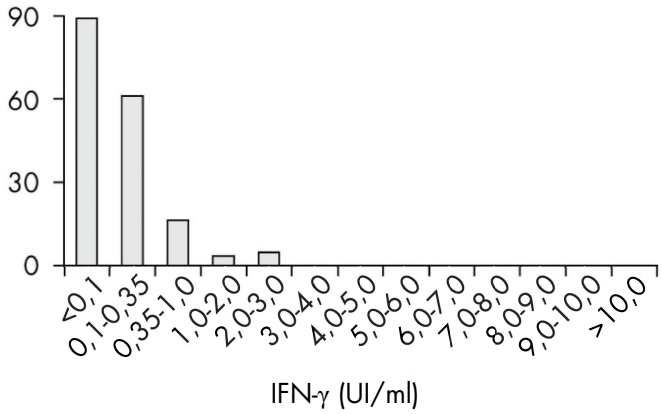


Figura 7. Distribución de Nil. **A.** Distribución de valores de Nil en la población de bajo riesgo (n = 409). **B.** Distribución de valores de Nil en la población de riesgo mixto (n = 194). **C.** Distribución de valores de Nil en la población con infección por *M. tuberculosis* confirmada mediante cultivo (n = 174).

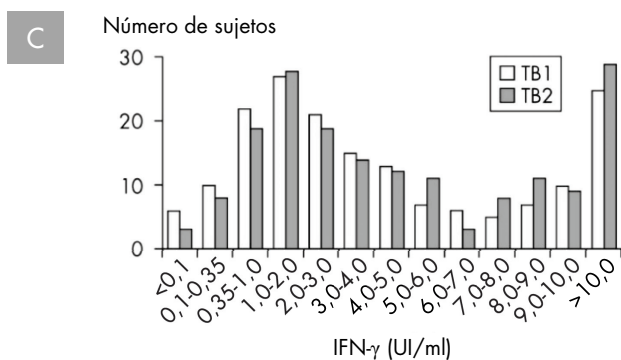
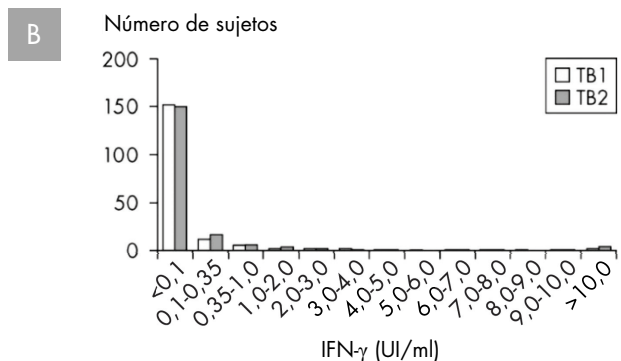
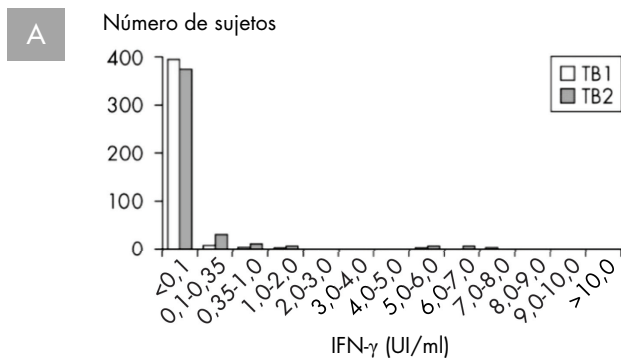


Figura 8. Distribución de TB1 y TB2 (sustracción de nulo). **A.** Distribución de valores de TB1 y TB2 (sustracción de nulo) en la población de bajo riesgo (n = 409). **B.** Distribución de valores de TB1 y TB2 (sustracción de nulo) en la población de riesgo mixto (n = 194). **C.** Distribución de valores de TB1 y TB2 (sustracción de nulo) en la población con infección por *M. tuberculosis* confirmada mediante cultivo (n = 174).

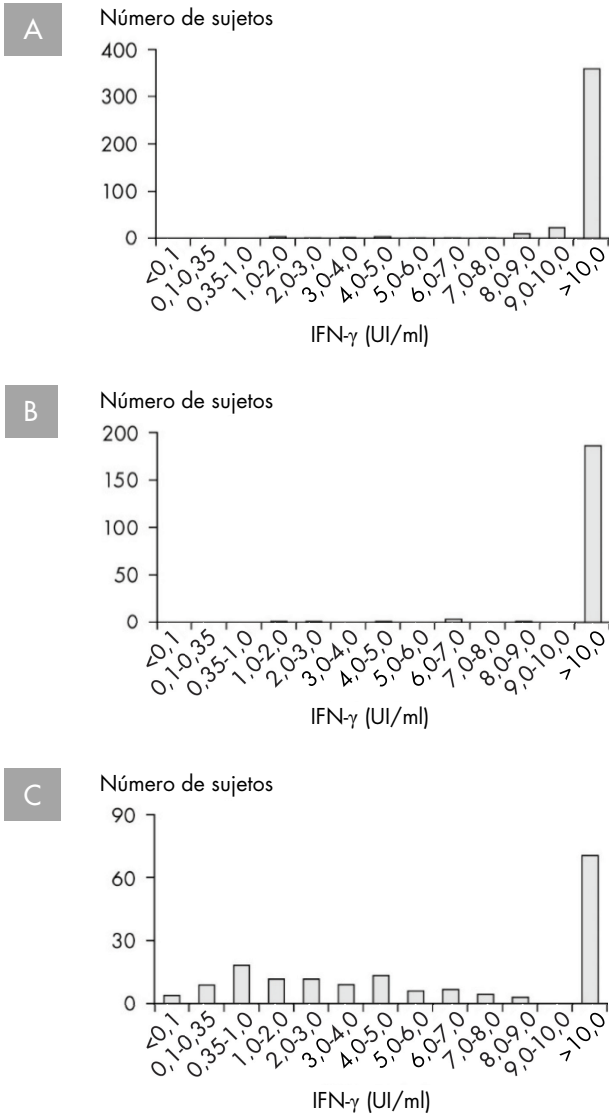


Figura 9. Distribución de Mitógeno (sustracción de nulo). **A.** Distribución de valores de Mitógeno (sustracción de nulo) en la población de bajo riesgo (n = 409). **B.** Distribución de valores de Mitógeno (sustracción de nulo) en la población de riesgo mixto (n = 194). **C.** Distribución de valores de Mitógeno (sustracción de nulo) en la población con infección por *M. tuberculosis* confirmada mediante cultivo (n = 169).

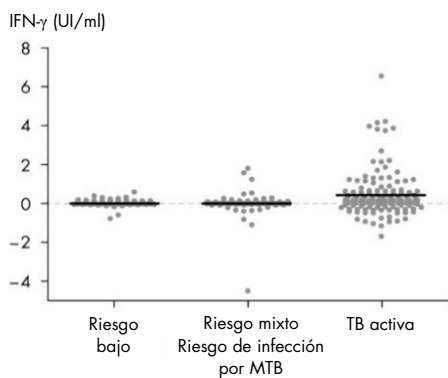


Figura 10. Diferencia observada entre valores de TB1 y TB2 (sustracción de nulo), estratificada por riesgo. Población de riesgo bajo (n = 409), población de riesgo mixto (n = 189) y población con infección por *M. tuberculosis* confirmada mediante cultivo (n = 141). Se restaron los valores de TB1 de los valores de TB2. Se excluyeron los sujetos con valores de TB1 o TB2 >10,0 UI/ml por estar fuera del intervalo lineal del ensayo.

Características del rendimiento del ensayo

Se ha demostrado la linealidad del ensayo QFT-Plus ELISA mediante la colocación aleatoria de 5 réplicas de 11 grupos de plasma de concentraciones conocidas de IFN- γ en la placa de ELISA. La línea de regresión lineal tiene una pendiente de $1,002 \pm 0,011$ y un coeficiente de correlación de 0,99 (Figura 11).

El límite de detección del QFT-Plus ELISA es de 0,065 UI/ml, y no se ha demostrado el efecto gancho a dosis altas (prozona) con concentraciones de IFN- γ de hasta 10.000 UI/ml.

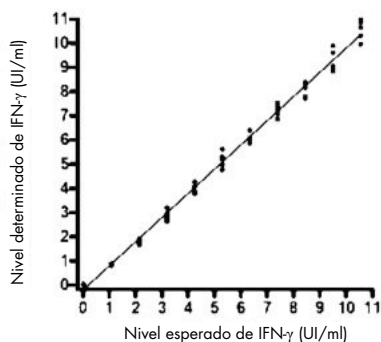


Figura 11. Perfil de linealidad del QFT-Plus ELISA

La imprecisión intra e interanálisis (% CV) del QFT-Plus ELISA se estimó mediante el análisis de 20 muestras de plasma con diferentes concentraciones de IFN- γ en réplicas de 3, en 3 laboratorios distintos, en 3 días no consecutivos y con 3 usuarios distintos. Todo ello supone un total de 27 análisis por muestra, en 9 series analíticas distintas. Una de las muestras era un control de nulos con una concentración de IFN- γ calculada de 0,08 UI/ml (IC del 95%: 0,07-0,09). Para las 19 muestras de plasma restantes, las concentraciones estaban comprendidas entre 0,33 (IC del 95%: 0,31-0,34) y 7,7 UI/ml (IC del 95%: 7,48-7,92).

La estimación de la imprecisión dentro de la misma serie analítica o intranálisis se realizó con el promedio de los valores % CV de cada muestra de plasma con IFN γ de cada placa para análisis (n = 9); el resultado para la imprecisión osciló entre un 4,1 y un 9,1% CV. El promedio de la covarianza dentro de una misma serie (IC de \pm 95%) fue de 6,6% \pm 0,6%. El promedio del plasma con cero IFN- γ fue de 14,1% CV.

La imprecisión total o interanálisis se determinó mediante la comparación de las 27 concentraciones calculadas de IFN- γ para cada muestra de plasma. La imprecisión interanálisis osciló entre un 6,6 y un 12,3% CV. El promedio global de % CV (IC de \pm 95%) fue de 8,7% \pm 0,7%. El plasma con cero IFN- γ presentó un 26,1% CV. Cabe esperar este nivel de variación debido a la baja concentración calculada de IFN- γ y la variación relativa a una estimación baja de concentración siempre será mayor que la de concentraciones superiores.

La reproducibilidad de la prueba QFT-Plus se determinó con muestras de sangre de 102 sujetos con factores de riesgo mixto para la infección por *M. tuberculosis*. Se valoraron tres usuarios y condiciones de laboratorio distintos.

En total se llevaron a cabo 3 determinaciones diagnósticas por cada sujeto, con un total de 306 para todos los sujetos. En general, la reproducibilidad de diagnóstico obtenida fue del 99% (IC del 95%: 97,2-99,7), con un diagnóstico concordante para 303 de las 306 determinaciones. La variación se debe a los resultados de 3 sujetos con valores cercanos al valor de corte.

Diagnóstico de LTBI

Se han publicado varios estudios que secundan la validez del QFT, precursor del QFT-Plus, en distintas poblaciones con riesgo de infección por MTB. En la Tabla 7 se resumen los principales resultados de algunos de estos estudios.

Tabla 7. Selección de estudios publicados sobre QFT

Población/Condición	Resultados y conclusiones	Número total de estudios publicados
Infantil	Validez demostrada en niños, incluidos niños menores de 5 años (45-46), con una exactitud mayor a la de los ensayos IGRA basados en ELISpot (8). El mayor estudio hasta la fecha sobre la comparación entre el ensayo QFT y la prueba TST realizado con niños de Vietnam, Filipinas y México corrobora el uso preferencial del QFT en lugar de la TST para la detección de LTBI en niños nacidos en el extranjero (46). Un estudio de contactos limitados determina un mejor valor predictivo que la prueba TST en niños (47) y un riesgo de progresión hasta desarrollar la tuberculosis 8 veces mayor al cabo de dos años entre los convertidores QFT con relación a los no convertidores (48). La discordancia QFT-negativo/TST-positivo es alta en niños vacunados con BCG (46, 49), pero no se ha detectado ningún impacto en la respuesta del Mitogen en niños menores de 5 años (49), y la tasa de indeterminación para el cribado rutinario de niños inmigrantes es baja (46).	152
Mujeres embarazadas	En zonas de carga baja, el QFT ofrece un buen rendimiento en todos los trimestres del embarazo con resultados comparables a los de las mujeres no embarazadas, resulta mucho más específico, con una sensibilidad comparable y puede ser un mejor predictor de la progresión de la enfermedad que la prueba TST (50). En áreas de carga alta, el QFT resultó ser más estable a lo largo de todo el embarazo y mucho más cercano a la prevalencia de LTBI de fondo en comparación con la prueba TST, a pesar de que los autores llegaron a la conclusión de que el embarazo incide tanto en el ensayo QFT como en la prueba TST (51).	6

La tabla continúa en la página siguiente

Tabla 8. Selección de estudios publicados sobre QFT (continuación)

Población/Condición	Resultados y conclusiones	Número total de estudios publicados
VIH/SIDA	Tanto los ensayos IGRA como la prueba TST se ven afectados por la infección por VIH y el conjunto de pruebas sugiere que deberían tomarse precauciones en el momento de interpretar los resultados con niveles de CD4+ <200 (52). Se ha demostrado que la incidencia en el ensayo QFT es menor que en los ensayos IGRA basados en ELISpot y la prueba TST (53-55). La comodidad de los ensayos IGRA, realizados en una sola visita, prevalece sobre la prueba TST, que presenta unas tasas de seguimiento muy bajas en este tipo de población (53).	101
Terapias inmunodepresoras	La incidencia de las terapias inmunodepresoras es menor en el ensayo QFT que en la prueba TST y ofrece una mejor correlación con los factores de riesgo de la tuberculosis (23, 27). QFT ha demostrado una alta sensibilidad en pacientes con enfermedades reumáticas (23; 56, 57) y una mayor especificidad que la prueba TST, lo que minimiza los falsos positivos y reduce el tratamiento no necesario que se adoptaría con la prueba TST (23, 57, 58).	112
Profesionales sanitarios	Más específico, con un menor número de falsos positivos que la prueba TST y más rentable que la prueba TST (59-62). La variabilidad en valores cercanos al umbral es esperable en análisis en serie debido al punto de corte dicotómico y a la variabilidad inherente de una prueba biológica (63). Los estudios ponen de manifiesto unas tasas de conversión/reversión superiores a las de la prueba TST en los análisis en serie de profesionales sanitarios de bajo riesgo (64, 65). Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos reconocen que la flexibilidad del criterio para definir la conversión IGRA puede generar mayor conversión que la observada con los criterios cuantitativos más restrictivos de la prueba TST; además, las estrategias enfocadas a la repetición de los análisis han demostrado su eficacia para la gestión del fenómeno de conversión/reversión (65-68).	111
Sospechosos de padecer tuberculosis	Valores VPP y VPN superiores a los de la prueba TST (47); comodidad de una sola visita para los pacientes con pocas posibilidades de volver (63), mejor correlación de la exposición (69), especialmente en sujetos vacunados con BCG y poblaciones de países donde se administra la vacuna BCG (70, 71).	89
Sujetos trasplantados	Eficacia al menos equiparable a la de la prueba TST, pero con un menor impacto de la insuficiencia en fase terminal de órganos que la prueba TST (22).	23

La tabla continúa en la página siguiente

Tabla 9. Selección de estudios publicados sobre QFT (continuación)

Población/Condición	Resultados y conclusiones	Número total de estudios publicados
Diabetes	Pruebas contradictorias a partir de un número reducido de publicaciones realizadas con un número limitado de sujetos. Un estudio realizado en una área de carga baja estableció que la sensibilidad del QFT no se ve afectada por la diabetes en pacientes con tuberculosis (72). Un estudio realizado en Tanzania, un lugar con una alta carga de la enfermedad, y que sugería un impacto negativo de la diabetes con relación a la producción de IFN- γ , no valoró factores de confusión como el VIH y las infecciones helmínticas (73). En estudios vietnamitas, 838 sujetos que manifestaron ellos mismos ser diabéticos y sospechosos de tener tuberculosis a partir de placas de tórax anómalas o por la confirmación mediante cultivo de tuberculosis activa (n = 128), la positividad del QFT fue equivalente o superior a los puntos de corte de 10 y 15 mm de la prueba TST (74).	9
Enfermedad renal terminal	Los resultados positivos del QFT se correlacionan con los factores de riesgo de la tuberculosis mejor que la prueba TST y están menos relacionados con BCG (75).	45
Emigrantes	Los estudios demuestran que el ensayo QFT no se ve afectado ni por BCG ni por la edad, a diferencia de la prueba TST (74). Por lo tanto, el ensayo QFT resulta ser el método más rentable (76). En zonas de carga baja, la mayoría de los casos de tuberculosis provienen de nacidos en el extranjero y de la reactivación de tuberculosis latente tras la llegada (77). El mayor estudio hasta la fecha sobre la comparación entre el ensayo QFT y la prueba TST realizado con niños inmigrantes propone el uso preferencial del QFT en lugar de la prueba TST para la detección de la tuberculosis latente en niños nacidos en el extranjero (46).	29

Información técnica

Resultados indeterminados

Los resultados indeterminados son poco habituales y pueden estar relacionados con el estado inmunológico del individuo o con varios factores técnicos en caso de no seguir las instrucciones de uso indicadas.

Si existen sospechas de que se hayan producido fallos o errores técnicos durante el almacenamiento de reactivos o la recogida o manipulación de las muestras de sangre, repita toda la prueba QFT-Plus con otras muestras de sangre nuevas. Cuando el motivo puede deberse a que el material no se ha lavado bien o a que se han cometido errores de procedimiento, puede realizarse de nuevo la prueba ELISA con plasmas estimulados. A no ser que se haya producido un error en la prueba ELISA, los resultados indeterminados por valores bajos de Mitogen o valores altos de Nil no deberían cambiar al realizar de nuevo la prueba. Los resultados indeterminados deben referirse como tales. Corresponde a los médicos optar por extraer una segunda muestra o realizar otro tipo de pruebas.

Muestras de plasma coaguladas

Si en las muestras de plasma almacenadas durante mucho tiempo aparecen coágulos de fibrina, centrifúguelas para sedimentar los coágulos y facilitar así el pipeteado del plasma.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Si desea obtener más información, también puede consultar la información técnica que encontrará en www.QuantiFERON.com. Consulte la contracubierta para obtener la información de contacto.

Resolución de problemas para ELISA

Coloración indeterminada

Posible causa

Solución

- | | |
|--|--|
| a) Placa mal lavada | Lave la placa al menos 6 veces con 400 µl de tampón de lavado por pocillo. Puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado dependiendo del lavador. Debe dejarse un período de remojo de al menos 5 segundos entre los ciclos. |
| b) Contaminación cruzada entre los pocillos de ELISA | Extreme la precaución durante el pipeteado y la mezcla de la muestra para minimizar el riesgo. |
| c) Kit o componentes caducados | Asegúrese de que el kit no esté caducado. Compruebe que el estándar reconstituido y el conjugado 100x concentrado se utilizan durante los tres meses siguientes a la fecha de reconstitución. |
| d) La solución enzimática de sustrato está contaminada | Deseche el sustrato si presenta una coloración azul. Utilice depósitos de reactivos limpios. |
| e) Plasma mezclado en tubos para QFT-Plus antes de su extracción | Después del centrifugado, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de la extracción. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel. |

Valores bajos de densidad óptica para los estándares

Posible causa

Solución

- | | |
|---|---|
| a) Error de dilución del estándar | Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar del kit, siguiendo las instrucciones de este prospecto. |
| b) Error de pipeteado | Compruebe que las pipetas estén calibradas y utilícelas según las instrucciones del fabricante. |
| c) Temperatura de incubación demasiado baja | La incubación para ELISA debe realizarse a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C). |
| d) Tiempo de incubación demasiado corto | La incubación de la placa del conjugado, estándares y muestras debe durar 120 ± 5 minutos. La solución de sustrato enzimático se incuba en la placa durante 30 minutos. |

Resolución de problemas para ELISA

- | | |
|--|--|
| i) Filtro de lectura de placa incorrecto | La placa debe leerse a 450 nm con un filtro de referencia de entre 620 y 650 nm. |
| f) Reactivos demasiado fríos | Todos los reactivos, a excepción del conjugado 100x concentrado, deben estar a temperatura ambiente antes de empezar el ensayo. Este paso puede tardar una hora aproximadamente. |
| g) Kit o componentes caducados | Asegúrese de que el kit no esté caducado. Compruebe que el estándar reconstituido y el conjugado 100x concentrado se utilizan durante los 3 meses siguientes a la fecha de reconstitución. |

Fondo elevado

Posible causa

Solución

- | | |
|--|--|
| a) Placa mal lavada | Lave la placa al menos 6 veces con 400 µl de tampón de lavado por pocillo. Puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado dependiendo del lavador. Debe dejarse un período de remojo de al menos 5 segundos entre los ciclos. |
| b) Temperatura de incubación demasiado elevada | La incubación para ELISA debe realizarse a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C). |
| c) El kit o los componentes ha(n) caducado | Asegúrese de que el kit no esté caducado. Compruebe que el estándar reconstituido y el conjugado 100x concentrado se utilizan durante los 3 meses siguientes a la fecha de reconstitución. |
| d) La solución enzimática de sustrato está contaminada | Deseche el sustrato si presenta una coloración azul. Utilice depósitos de reactivos limpios. |

Curva estándar no lineal y variabilidad entre duplicados

Posible causa

Solución

- | | |
|--|--|
| a) Placa mal lavada | Lave la placa al menos 6 veces con 400 µl de tampón de lavado por pocillo. Puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado dependiendo del lavador. Debe dejarse un período de remojo de al menos 5 segundos entre los ciclos. |
| b) Error al diluir el estándar | Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar, siguiendo las instrucciones de este prospecto. |
| c) Mezclado mal realizado | Mezcle bien los reactivos mediante inversión o agitación vorticial suave antes de dispensarlos en la placa. |
| d) Técnica de pipeteado irregular o interrupción durante la preparación del ensayo | Las muestras deben mezclarse con los estándares de forma fluida, sin interrupciones. Todos los reactivos deben estar preparados antes de comenzar el ensayo. |

QIAGEN y sus distribuidores ponen a su disposición de forma gratuita toda la información del producto y las guías técnicas. También puede visitar www.QuantiFERON.com.

Referencias

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. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 4, e55.
14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology* 13, 270.
15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J. Infect.* 56, 348.
16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 198, 33.
17. Kang, Y.A. et al. (2005) Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* 293, 2756.

-
18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 1146.
 19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss. Med. Wkly.* 138, 267.
 20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 737.
 21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* 146, 761.
 22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 7, 2797.
 23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 84.
 24. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12, 513.
 25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. *Emerging Infect. Dis.* 12, 1383.
 26. Pai, M. et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA* 293, 2746.

-
27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol.* 35, 776.
 28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur. Respir. J.* 32, 524.
 29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 3, 981.
 30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 2799.
 31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin. Biochem.* 40, 913.
 32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, 681.
 33. Turner, J. et al. (1996) Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. *Immunology* 87, 339.
 34. Brookes, R.H. et al. (2003) CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. *Eur. J. Immunol.* 33, 3293.
 35. Stenger, S. et al. (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282, 121.

36. Lalvani, A. et al. (1998) Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 270.
37. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. J. Immunol. 166, 439.
38. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. PLoS Pathol. 3, 1240.
39. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. J. Immunol. 187, 2222.
40. Rozot, V. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur. J. Immunol. 43, 1568.
41. Nikolova, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 75, 277.
42. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.009. Epub.
43. Ongaya, A. et al. (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis 93, S60.
44. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 185, 206.

45. Long, G., Ji-Chun, M., Min, Jin-Long, L., Jin-Hui, T. (2014) Interferon- 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. Cheallagh, 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-Jespén, 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

Los símbolos siguientes pueden aparecer en el embalaje y las etiquetas:

Símbolo	Definición del símbolo
 2 x 96	Suficiente para 2 x 96 preparaciones de muestras
	Fabricante legal
	Símbolo de marcado CE-IVD
	Para uso diagnóstico in vitro
	Código de lote
	Número de referencia
	Número mundial de artículo comercial
	Fecha de caducidad
	Limitación de temperatura
	Consultar las instrucciones de uso
	No reutilizar
	Mantener alejado de la luz solar
	Número de material
Rn	“R” es la revisión de las Instrucciones de uso y “n” es el número de revisión

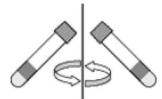
Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, llame al número gratuito 00800-22-44-6000, visite el Centro de servicio técnico en www.qiagen.com/contact o póngase en contacto con uno de los departamentos del servicio técnico de QIAGEN (consulte la contraportada o visite el sitio www.qiagen.com).

Resumen del procedimiento de la prueba

Fase 1: incubación de la sangre

1. Recoja la sangre del paciente en los tubos de recogida de sangre y mezcle el contenido agitando los tubos diez (10) veces con la fuerza suficiente para que toda la superficie interna del tubo se cubra de sangre. Con ello se consigue disolver el antígeno de las paredes del tubo.
2. Incube los tubos en posición vertical a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16 a 24 horas.
3. Después de la incubación, centrifugue los tubos durante 15 minutos a $2.000\text{-}3.000 \times g$ RCF (g) para separar el plasma de los glóbulos rojos.
4. Después del centrifugado, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de la extracción. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.



Fase 2: ELISA para IFN- γ

1. Equilibre los componentes de ELISA, excepto el conjugado 100x concentrado, a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante un mínimo de 60 minutos.
2. Reconstituya el estándar del kit hasta 8,0 UI/ml con agua desionizada o destilada. Prepare cuatro (4) diluciones de estándar.
3. Reconstituya el conjugado 100x concentrado liofilizado con agua desionizada o destilada.



4. Prepare conjugado listo para usar con diluyente verde y añada 50 μ l a cada uno de los pocillos.



5. Añada 50 μ l de las muestras de plasma de la prueba y 50 μ l de los patrones a los pocillos correspondientes. Mezcle con un agitador.

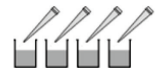
6. Deje incubar durante 120 ± 5 minutos a temperatura ambiente.



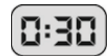
7. Lave los pocillos al menos 6 veces con 400 μ l de tampón de lavado por pocillo.



8. Añada 100 μ l de solución enzimática de sustrato a los pocillos. Mezcle con un agitador.



9. Deje incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.



10. Añada 50 μ l de solución enzimática de parada a todos los pocillos. Mezcle con un agitador.



11. Lea los resultados a 450 nm con un filtro de referencia de entre 620 y 650 nm.



12. Analice los resultados.



Modificaciones importantes

Apartado	Página	Modificaciones
Diversas	Diversas	Se han añadido instrucciones sobre el uso de tubos con heparina de litio o de sodio
Diversas	Diversas	Se han añadido instrucciones sobre el proceso de recogida de sangre a 2 °C-8 °C
Diversas	Diversas	La tapa de la placa, aunque se requiere, no se suministra

Historial de revisiones del manual

Documento	Modificaciones
R6 04/2019	Cambios relativos a la heparina de litio o de sodio Nuevas instrucciones de trabajo para el proceso de recogida de sangre a 2 °C-8 °C Se han eliminado las tapas de las placas de QF

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

Acuerdo de licencia limitada para QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este prospecto, así como utilizarse únicamente con los componentes suministrados con el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en este kit, excepto lo descrito en los protocolos proporcionados con el producto y este prospecto.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este panel y/o su(s) uso(s) no infrinjan derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y en ningún caso se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender, salvo que QIAGEN indique lo contrario.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para consultar los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN. Todos los derechos reservados.

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacífico | techservice-ap@qiagen.com

Europa | techserviceQFT-eu@qiagen.com

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

Latinoamérica (sin incluir Brasil ni México) | techservice-latam@qiagen.com

Notas

Notas

