

Avril 2019

Notice du QuantiFERON[®]- TB Gold Plus (QFT[®]-Plus) ELISA



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Version 1



Pour utilisation diagnostique in vitro

Test d'IFN- γ sur sang total mesurant les réponses aux antigènes peptidiques de ESAT-6 et CFP-10



622120, 622822



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Allemagne



R6 1083163FR

Sommaire

Utilisation prévue.....	5
Résumé et explication du test.....	5
Principes du dosage	7
Temps requis pour effectuer le dosage	10
Composants et stockage.....	11
Matériel nécessaire, mais non fourni	13
Stockage et manipulation des prélèvements	14
Tubes de prélèvement sanguin	14
Réactifs du kit	14
Réactifs reconstitués et inutilisés.....	14
Avertissements et précautions	15
Avertissements	15
Précautions.....	16
Prélèvement et manipulation des échantillons	19
Instructions d'utilisation.....	25
Étape 1 : incubation du sang et collecte du plasma	25
Étape 2 : IFN- γ ELISA.....	26
Calculs et interprétation du test.....	31
Génération de la courbe d'étalonnage	31
Contrôle qualité du test	32

Interprétation des résultats	32
Limitations.....	35
Caractéristiques de performances.....	36
Études cliniques.....	36
Caractéristiques de performances du dosage.....	42
Informations techniques	47
Résultats indéterminés	47
Échantillons de plasma coagulés	47
Guide de dépannage.....	48
Références	50
Symboles.....	59
Coordonnées	60
Résumé de la procédure du test.....	61
Étape 1 : incubation du sang.....	61
Étape 2 : IFN- γ ELISA.....	61
Changements significatifs	63
Historique des versions de la notice	63

Utilisation prévue

Le dosage du QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) est un test diagnostique *in vitro* utilisant un mélange de peptides qui imitent les protéines ESAT-6 et CFP-10 afin de stimuler les cellules dans le sang total hépariné. La détection de l'interféron- γ (IFN- γ) par le dosage immunoenzymatique (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) est utilisée pour identifier les réponses *in vitro* aux antigènes peptidiques associés à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT-Plus est un test indirect de dépistage de l'infection par *M. tuberculosis* (y compris de la maladie), qui est conçu pour être utilisé en lien avec l'évaluation des risques, les examens radiographiques ainsi que les autres évaluations médicales et diagnostiques.

Résumé et explication du test

La tuberculose est une maladie contagieuse provoquée par une infection par les organismes du complexe *M. tuberculosis* (MTB) (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) qui est généralement transmise aux nouveaux hôtes par voie aérienne par l'intermédiaire des gouttelettes émises par les patients atteints de tuberculose pulmonaire. Un individu nouvellement infecté peut tomber malade en l'espace de quelques semaines à quelques mois, mais la plupart des individus infectés restent en bonne santé. L'infection tuberculeuse latente (ITL), un trouble asymptomatique non contagieux, persiste chez certaines personnes qui peuvent développer une tuberculose quelques mois ou quelques années plus tard. Le principal objectif du diagnostic de l'ITL est d'envisager un traitement médical pour prévenir la maladie de la tuberculose. Le test cutané à la tuberculine (TCT) était jusqu'à récemment la seule méthode disponible de diagnostic de l'ITL. La sensibilité cutanée à la tuberculine se développe entre 2 et 10 semaines après l'infection. Toutefois, certains individus infectés ne répondent pas à la tuberculine, notamment ceux qui souffrent d'une variété d'affections perturbant les fonctions immunitaires, mais aussi d'autres qui ne souffrent pas de ces problèmes. À l'inverse,

certaines individus ayant peu de risques de présenter une infection par *M. tuberculosis* montrent une sensibilité à la tuberculine et ont des résultats positifs au TCT après vaccination par le BCG (Bacille Calmette-Guérin), après une infection par mycobactérie autre que le complexe *M. tuberculosis* ou en raison d'autres facteurs indéterminés.

Il faut distinguer l'ITL de la maladie de la tuberculose, un trouble à déclaration obligatoire qui affecte généralement les poumons et les voies respiratoires inférieures, mais peut aussi toucher d'autres systèmes organiques. La maladie de la tuberculose est diagnostiquée à partir des antécédents et d'exams physiques, radiologiques, histologiques et mycobactériologiques.

QFT-Plus est un test conçu pour détecter des réponses immunes à médiation cellulaire (IMC) aux antigènes peptidiques qui imitent les protéines mycobactériennes. Ces protéines, ESAT-6 et CFP-10, sont absentes de toutes les souches du BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses, à l'exception de *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum* (1). Les individus infectés par les organismes du complexe MTB présentent généralement des lymphocytes sanguins qui reconnaissent ces antigènes ainsi que d'autres antigènes mycobactériens. Ce processus de reconnaissance implique la génération et la sécrétion de la cytokine IFN- γ . La détection et la quantification d'IFN- γ constituent la base de ce test.

Les antigènes utilisés dans QFT-Plus sont un mélange de peptides qui imitent les protéines ESAT-6 et CFP-10. De nombreuses études ont démontré que ces antigènes peptidiques stimulaient la production d'IFN- γ par les lymphocytes T des individus infectés par *M. tuberculosis*, mais que cela n'était généralement pas le cas chez les individus non infectés ou vaccinés par le BCG ne présentant ni maladie ni risque d'ITL (1–32). Toutefois, les traitements médicaux ou les troubles perturbant la fonction immunitaire peuvent réduire la production d'IFN- γ . Les patients souffrant de certaines autres infections mycobactériennes peuvent aussi présenter une réponse à ESAT-6 et CFP-10, car les gènes codant ces protéines sont présents dans *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum* (1, 23). Le test QFT-Plus constitue à la fois un test de dépistage d'ITL et une aide au diagnostic de l'infection au complexe *M. tuberculosis* chez les patients malades. Un résultat positif appuie le diagnostic de la maladie de la tuberculose, mais des infections par d'autres mycobactéries (p.ex. *M. kansasii*)

peuvent aussi entraîner des résultats positifs. D'autres évaluations médicales et diagnostiques sont nécessaires pour confirmer ou exclure la maladie de la tuberculose.

Le test QFT-Plus comporte deux tubes d'antigènes de TB distincts : TB Antigen Tube 1 (TB1) et TB Antigen Tube 2 (TB2). Les deux tubes contiennent des antigènes peptidiques dérivés des antigènes associés au complexe MTB, ESAT-6 et CFP-10. Le tube TB1 contient des peptides dérivés des protéines ESAT-6 et CFP-10, qui sont conçus pour entraîner des réponses IMC de la part des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺. Le tube TB2 contient un ensemble supplémentaire de peptides ciblés pour l'induction de réponses IMC de la part des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺. Dans le déroulement naturel de l'infection à MTB, les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle essentiel dans le contrôle immunologique grâce à leur sécrétion de cytokine IFN- γ . D'après des données probantes récentes, les lymphocytes T CD8⁺ participent à la défense de l'hôte contre MTB en produisant de l'IFN- γ et d'autres facteurs solubles, qui activent les macrophages pour stopper la croissance de MTB, détruisent les cellules infectées ou lysent directement le MTB intracellulaire (33-35). Des lymphocytes CD8⁺ spécifiques à MTB ont été détectés chez des sujets avec ILT et la maladie de la tuberculose active, chez lesquels on peut fréquemment trouver les lymphocytes CD8⁺ produisant de l'IFN- γ (36–38). De plus, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à ESAT-6 et CFP-10 semblent être plus fréquemment détectés chez les sujets avec TB active que chez les sujets avec ITL et peuvent être associés à une exposition récente à MTB (39–41). En outre, les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques à MTB produisant de l'IFN- γ ont également été détectés chez les sujets avec TB active présentant une co-infection au VIH (42, 43) et chez les jeunes enfants avec la maladie TB (44).

Principes du dosage

Le dosage QFT-Plus fait appel à des tubes spéciaux de prélèvement sanguin qui sont utilisés pour le prélèvement du sang total. L'incubation du sang est réalisée dans les tubes pendant 16 à 24 heures avant la collecte du plasma et la recherche d'IFN- γ produit en réponse aux antigènes peptidiques.

Le test QFT-Plus est effectué en deux étapes. Dans un premier temps, le sang total est prélevé dans chacun des QFT-Plus Blood Collection Tubes, qui incluent un tube Nil, un tube TB1, un tube TB2 et un tube Mitogen. Le sang peut aussi être collecté dans un seul tube de prélèvement sanguin générique contenant de l'héparine de lithium ou de l'héparine de sodium comme anticoagulant avant d'être transféré dans les tubes QFT-Plus.

Le tube Mitogen est utilisé avec le test QFT-Plus comme contrôle positif, ce qui peut s'avérer important en cas de doute sur le statut immunitaire de l'individu. Il permet également de contrôler la bonne manipulation et la bonne incubation du sang.

Les tubes QFT-Plus doivent être agités pour mélanger les antigènes avec le sang et incubés à 37 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement. Après une période d'incubation de 16 à 24 heures, les tubes sont centrifugés, le plasma est collecté et la quantité d'IFN- γ (UI/ml) est mesurée par ELISA. Le QFT-Plus ELISA utilise un étalon d'IFN- γ humain recombinant, qui est dosé par rapport à une préparation d'IFN- γ de référence (réf. NIH : Gxg01-902-535). Les résultats de l'échantillon de test sont exprimés en unités internationales par ml (UI/ml) par rapport à une courbe d'étalonnage établie en testant des dilutions de l'étalon fourni dans le kit.

La présence d'anticorps hétérophiles (p.ex. des anticorps humains antisouris) dans le sérum ou le plasma de certains individus peut interférer avec les dosages immunoenzymatiques. L'effet des anticorps hétérophiles sur le test QFT-Plus ELISA est réduit au minimum par l'ajout de sérum normal de souris au diluant vert et par l'utilisation de fragments d'anticorps monoclonaux F(ab')₂ comme anticorps de capture anti-IFN- γ adsorbés dans les puits de la microplaque.

Un dosage QFT-Plus est considéré comme positif si la réponse d'IFN- γ de l'un des deux tubes d'antigènes de TB est nettement supérieure à la valeur d'IFN- γ du tube Nil en UI/ml. L'échantillon de plasma du tube Mitogen sert de contrôle positif de la réponse d'IFN- γ pour chaque prélèvement testé. Une faible réponse au Mitogen (< 0,5 UI/ml) indique un résultat indéterminé lorsqu'un échantillon sanguin présente aussi un résultat négatif aux antigènes TB.

Cela peut survenir dans le cas d'un nombre insuffisant de lymphocytes, d'une activité lymphocytaire réduite en raison d'une mauvaise manipulation de l'échantillon, d'un remplissage/mélange incorrect du tube Mitogen ou de l'incapacité des lymphocytes du patient à générer de l'IFN- γ . L'échantillon Nil peut présenter des teneurs élevées en IFN- γ en présence d'anticorps hétérophiles ou d'une sécrétion intrinsèque d'IFN- γ . Le tube Nil compense le bruit de fond (p.ex. teneurs excessives en IFN- γ circulant ou présence d'anticorps hétérophiles). La teneur en IFN- γ du tube Nil est soustraite de la teneur en IFN- γ des tubes d'antigènes TB et du Mitogen.

Temps requis pour effectuer le dosage

Le temps requis pour effectuer le test QFT-Plus ELISA est estimé ci-dessous ; le temps requis pour tester plusieurs échantillons regroupés en lots est aussi indiqué :

Incubation à 37 °C des tubes de sang : 16 à 24 heures

ELISA : environ 3 heures pour une microplaque d'ELISA
(22 individus)
<1 heure de travail
Ajouter 10 à 15 minutes pour chaque microplaque supplémentaire

Composants et stockage

Tubes de prélèvement sanguin*		200 tubes	Pack pour patient unique	Pack de distribution	200 tubes HA	Pack pour patient unique HA	Pack de distribution HA
Référence catalogue		622526	622222	622423	623526	623222	623423
Nombre de tests/pack		50	10	25	50	10	25
QuantiFERON Nil Tube (bouchon gris, anneau blanc)	Nil	50 tubes	10 tubes	25 tubes			
QuantiFERON TB1 Tube (bouchon vert, anneau blanc)	TB1	50 tubes	10 tubes	25 tubes			
QuantiFERON TB2 Tube (bouchon jaune, anneau blanc)	TB2	50 tubes	10 tubes	25 tubes			
QuantiFERON Mitogen Tube (bouchon violet, anneau blanc)	Mitogen	50 tubes	10 tubes	25 tubes			
QuantiFERON Nil HA Tube (bouchon gris, anneau jaune)	Nil HA (test à haute altitude)				50 tubes	10 tubes	25 tubes
QuantiFERON TB1 HA Tube (bouchon vert, anneau jaune)	TB1 HA (test à haute altitude)				50 tubes	10 tubes	25 tubes
QuantiFERON TB2 HA Tube (bouchon jaune, anneau jaune)	TB2 HA (test à haute altitude)				50 tubes	10 tubes	25 tubes
QuantiFERON Mitogen HA Tube (bouchon violet, anneau jaune)	Mitogen HA (test à haute altitude)				50 tubes	10 tubes	25 tubes
Notice des QFT-Plus Blood Collection Tubes		1	1	1	1	1	1

* Toutes les configurations de produits ne sont pas disponibles dans chaque pays. Contacter le service client QIAGEN (coordonnées sur www.qiagen.com) pour plus d'informations sur les configurations disponibles à la commande.

Composants ELISA [†] Référence catalogue	Kit 2 microplaques ELISA	Pack de laboratoire de référence
	622120	622822
Microplate Strips (barrettes pour microplaque) (12 × 8 puits) tapissées d'anticorps monoclonaux murins anti-IFN- γ humain	2 barrettes pour microplaque à 96 puits	20 barrettes pour microplaque à 96 puits
IFN- γ Standard (étalon d'IFN- γ), lyophilisé (contient de l'IFN- γ humain recombinant, de la caséine bovine, du thiomersal à 0,01 % m/v)	1 flacon (8 UI/ml après reconstitution)	10 flacons (8 UI/ml après reconstitution)
Green Diluent (diluant vert) (contient de la caséine bovine, du sérum normal de souris, du thiomersal à 0,01 % m/v)	1 × 30 ml	10 × 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (concentré de conjugué 100x), lyophilisé (anticorps murins anti-IFN γ humain conjugués à la peroxydase de raifort ; contient du thiomersal à 0,01 % m/v)	1 × 0,3 ml (après reconstitution)	10 × 0,3 ml (après reconstitution)
Wash Buffer 20x Concentrate (concentré de tampon de lavage 20x) (pH 7,2 ; contient du ProClin® 300 à 0,05 % v/v)	1 × 100 ml	10 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (solution de substrat enzymatique) (contient H ₂ O ₂ et 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine)	1 × 30 ml	10 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (solution d'arrêt de la réaction enzymatique) (contient H ₂ SO ₄ 0,5 M)	1 × 15 ml	10 × 15 ml
Notice du QFT-Plus ELISA	1	1

[†] Voir page 16 pour les précautions à prendre et les risques encourus.

Matériel nécessaire, mais non fourni

- Incubateur à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}^*$. CO₂ non requis
- Pipettes à volume variable* étalonnées pour dispenser des volumes de 10 µl à 1 000 µl avec des cônes jetables
- Pipettes multicanaux* étalonnées pour dispenser des volumes de 50 µl et 100 µl avec cônes jetables
- Couvercle de microplaque
- Agitateur de microplaque*
- Eau déionisée ou distillée, 2 litres
- Laveur de microplaques (laveur automatique recommandé)
- Lecteur de microplaque* avec filtre à 450 nm et filtre de référence entre 620 nm et 650 nm

* Vérifier que les appareils ont été contrôlés et étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

Stockage et manipulation des prélèvements

Tubes de prélèvement sanguin

- Stocker les tubes de prélèvement sanguin entre 4 °C et 25 °C.

Réactifs du kit

- Stocker les réactifs du kit entre 2 °C et 8 °C.
- Veiller à toujours protéger la solution de substrat enzymatique de la lumière directe du soleil.

Réactifs reconstitués et inutilisés

Pour des instructions sur la reconstitution des réactifs, voir page 27.

- L'étalon du kit reconstitué peut être conservé jusqu'à 3 mois s'il est stocké entre 2 °C et 8 °C.

Noter la date à laquelle l'étalon du kit a été reconstitué.

- Après la reconstitution, le conjugué concentré 100x inutilisé doit être stocké entre 2 °C et 8 °C et utilisé dans les 3 mois.

Noter la date à laquelle le conjugué a été reconstitué.

- Le conjugué à la concentration de travail doit être utilisé dans les 6 heures suivant sa préparation.
- Le tampon de lavage à la concentration de travail peut être stocké à température ambiante jusqu'à 2 semaines.

Avertissements et précautions

Pour utilisation diagnostique in vitro uniquement.

Avertissements

- Un résultat négatif au test QFT-Plus n'exclut pas la possibilité d'une infection par *M. tuberculosis* ou d'une tuberculose active : les résultats faux négatifs peuvent être dus au stade de l'infection (p.ex. échantillon obtenu avant le développement de la réponse immunitaire cellulaire), à des troubles comorbides qui affectent les fonctions immunitaires, à une mauvaise manipulation des tubes de prélèvement sanguin après la ponction veineuse, à une mauvaise réalisation du dosage ou à d'autres variables immunologiques.
- Un résultat positif au test QFT-Plus ne doit pas constituer la preuve unique ou définitive d'une infection par *M. tuberculosis*. Les performances insuffisantes du dosage peuvent entraîner des faux positifs.
- Un résultat positif au test QFT-Plus doit être suivi d'autres évaluations médicales et diagnostiques de la tuberculose active (p.ex. frottis et culture des BAAR, radiographie du thorax).
- Bien qu'ESAT-6 et CFP-10 soient absents de toutes les souches du BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses connues, un résultat positif au test QFT-Plus peut être dû à une infection par *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. Si de telles infections sont suspectées, d'autres tests doivent être effectués.

Précautions

En cas de manipulation de produits chimiques, porter systématiquement une blouse de laboratoire adéquate, des gants jetables et des lunettes de protection. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne, dans un format PDF compact et pratique, à l'adresse www.qiagen.com/safety, où il est possible de trouver, de consulter et d'imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.



ATTENTION : manipuler le sang et le plasma humains comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Respecter les recommandations appropriées en matière de manipulation du sang et des produits sanguins. Jeter les échantillons et le matériel en contact avec le sang ou les produits sanguins conformément aux réglementations nationales, régionales et locales en vigueur.

Les remarques suivantes sur les risques et conseils de prudence s'appliquent aux composants du QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA.

Risques encourus



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution

Contient de l'acide sulfurique. Avertissement ! Peut être corrosif pour les métaux. Provoque une irritation cutanée. Provoque une sévère irritation des yeux. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Avertissement ! Provoque une légère irritation cutanée. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.



QuantiFERON Green Diluent

Contient du 5-hydroxy-1-(4-sulfophényl)-4-(4-sulfophénylazo)pyrazole-3-carboxylate de trisodium. Contient de la tartrazine. Avertissement ! Peut provoquer une allergie cutanée. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Contient un mélange de 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one et de 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Éviter tout rejet dans l'environnement.

Conseils de prudence

Consulter les instructions spéciales avant utilisation. Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. **EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU** (ou les cheveux) : enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher. **EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX** : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. En cas d'exposition avérée ou suspectée : consulter un médecin. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin. Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation. Garder sous clef. Éliminer le contenu/récipient dans une usine de traitement des déchets agréée.

Autres informations

Fiches de données de sécurité (FDS) : www.qiagen.com/safety

- Le non-respect des consignes de la notice du *QuantIFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA* peut entraîner l'obtention de résultats erronés. Lire attentivement les instructions avant toute utilisation.
- Ne pas utiliser le kit si un flacon de réactif présente des signes d'endommagement ou de fuite avant son utilisation.
- Important : examiner les flacons avant de les utiliser. Ne pas utiliser les flacons de conjugué ou de standard IFN- γ s'ils semblent endommagés ou si l'étanchéité du joint en caoutchouc a été altérée. Ne pas manipuler de flacons cassés. Prendre les précautions nécessaires pour les éliminer en toute sécurité. Recommandation : utiliser une pince à dessertir pour ouvrir les flacons de conjugué ou de standard IFN- γ afin de réduire les risques de blessures avec la capsule en métal.
- Ne pas mélanger ou utiliser les barettes pour microplaque, le standard IFN- γ , le diluant vert ou le conjugué concentré 100x provenant de différents lots de kit QFT-Plus. Les autres réactifs (concentré de tampon de lavage 20x, solution de substrat enzymatique et solution de blocage d'enzyme) peuvent être échangés entre les kits si les réactifs ne sont pas périmés et si les détails du lot sont enregistrés.
- Éliminer les réactifs inutilisés et les échantillons biologiques conformément aux réglementations locales, régionales et nationales.
- Ne pas utiliser les QFT-Plus Blood Collection Tubes ou le kit ELISA après la date d'expiration.
- Des procédures de laboratoire correctes doivent être suivies en permanence.
- Vérifier que l'équipement de laboratoire a été étalonné/validé pour utilisation.

Prélèvement et manipulation des échantillons

QFT-Plus fait appel aux tubes de prélèvement suivants :

1. QuantiFERON Nil Tubes (bouchon gris avec anneau blanc)
2. QuantiFERON TB1 Tubes (bouchon vert avec anneau blanc)
3. QuantiFERON TB2 Tubes (bouchon jaune avec anneau blanc)
4. QuantiFERON Mitogen Tubes (bouchon violet avec anneau blanc)
5. QuantiFERON HA Nil Tubes (bouchon gris avec anneau jaune)
6. QuantiFERON HA TB1 Tubes (bouchon vert avec anneau jaune)
7. QuantiFERON HA TB2 Tubes (bouchon jaune avec anneau jaune)
8. QuantiFERON HA Mitogen Tubes (bouchon violet avec anneau jaune)

Les antigènes ont été séchés sur la paroi interne des tubes de prélèvement sanguin ; il est donc essentiel que le contenu des tubes soit soigneusement mélangé avec le sang. Pour le sang prélevé directement dans les tubes QFT-Plus, les tubes QFT-Plus doivent être conservés et transportés à température ambiante ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$), puis placés dans un incubateur à 37 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement sanguin. Le sang peut également être prélevé dans un simple tube contenant de l'héparine de lithium ou de l'héparine de sodium pour le stockage avant le transfert dans un QFT-Plus et l'incubation. Les prélèvements sanguins effectués dans un tube d'héparine de lithium ou d'héparine de sodium peuvent être stockés pendant un maximum de 16 heures à température ambiante ($17\text{--}25\text{ °C}$), puis transférés dans des tubes QFT-Plus directement après la collecte. Les prélèvements sanguins dans des tubes d'héparine de lithium ou d'héparine de sodium peuvent aussi être stockés entre $2\text{ et }8\text{ °C}$ pendant un maximum de 48 heures avant le transfert dans les tubes QFT-Plus. Consulter la section « Prélèvement sanguin dans un simple tube d'héparine de lithium ou d'héparine de sodium, puis transfert dans des QFT-Plus Blood Collection Tubes ».

Prélèvement direct dans des QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Étiqueter les tubes de façon appropriée.

Veiller à ce que chaque tube (Nil, TB1, TB2 et Mitogen) soit identifiable par son étiquette ou par d'autres moyens une fois que le bouchon est retiré.

Il est recommandé de noter l'heure et la date du prélèvement sanguin.

2. Pour chaque patient, collecter 1 ml de sang par ponction veineuse directement dans chacun des QFT-Plus Blood Collection Tubes. Cette procédure doit être effectuée par un préleveur expérimenté.

Remarque importante : les tubes doivent être à une température de 17 °C à 25 °C au moment du remplissage.

Les QFT-Plus Blood Collection Tubes ordinaires peuvent être utilisés jusqu'à une altitude de 810 mètres au-dessus du niveau de la mer. Les QFT-Plus Blood Collection Tubes pour haute altitude peuvent être utilisés à une altitude comprise entre 1 020 et 1 875 mètres au-dessus du niveau de la mer.

Comme le prélèvement sanguin se fait relativement lentement dans des tubes de 1 ml, maintenir le tube sur l'aiguille pendant 2 à 3 secondes une fois qu'il semble s'être complètement rempli. Cela permet de s'assurer que le bon volume est prélevé.

- La marque noire sur le côté des tubes indique la plage de 0,8–1,2 ml du volume autorisé. Si le niveau de sang obtenu dans un tube est en dehors de la plage définie par la marque, prélever un nouvel échantillon sanguin. Le remplissage excessif ou insuffisant des tubes en dehors de la plage de 0,8 à 1,2 ml peut entraîner des résultats erronés.
- Si le prélèvement sanguin est effectué avec une aiguille à ailettes, utiliser un tube de « purge » pour que le tube soit rempli de sang avant d'employer les tubes QFT-Plus.
- En cas d'utilisation des QFT-Plus Blood Collection Tubes à une altitude supérieure à 810 m, ou si le volume de sang prélevé est trop faible, les utilisateurs peuvent collecter le sang à l'aide d'une seringue et en transférer immédiatement 1 ml dans chacun des 4 tubes. Pour des raisons de sécurité, la meilleure façon de procéder

consiste à retirer l'aiguille de la seringue en respectant les procédures de sécurité appropriées, à retirer les bouchons des 4 tubes QFT-Plus et à ajouter 1 ml de sang dans chaque tube (jusqu'au centre de la marque noire située sur le côté de l'étiquette du tube). Replacer correctement les bouchons et mélanger comme décrit ci-dessous. Veiller à ce que chaque tube (Nil, TB1, TB2 et Mitogen) soit identifiable par son étiquette ou par d'autres moyens une fois que le bouchon est retiré.

3. Immédiatement après avoir rempli les tubes, les agiter dix (10) fois suffisamment fort pour s'assurer que toute la paroi interne du tube est enduite de sang. Cela permet de dissoudre les antigènes sur les parois du tube.

Remarque importante : les tubes doivent être à une température de 17 °C à 25 °C au moment de l'agitation. Une agitation trop énergique des tubes peut provoquer une perturbation du gel et entraîner des résultats aberrants.

4. Après les avoir étiquetés, remplis et agités, transférer les tubes dans un incubateur à 37 °C ± 1 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement. Avant l'incubation, conserver et transporter les tubes à température ambiante (22 °C ± 5 °C). Si les tubes QFT-Plus ne sont pas incubés à 37 °C directement après le prélèvement sanguin et l'agitation, retourner les tubes 10 fois pour les mélanger avant l'incubation à 37 °C.
5. Incuber les tubes QFT-Plus en position VERTICALE à 37 ± 1 °C pendant 16 à 24 heures. L'incubateur ne requiert ni CO₂ ni humidification.

Prélèvement sanguin dans un simple tube d'héparine de lithium ou de sodium, puis transfert dans des QFT-Plus Blood Collection Tubes

1. Le sang peut être collecté dans un seul tube de prélèvement sanguin générique contenant de l'héparine de lithium ou de l'héparine de sodium comme anticoagulant avant d'être transféré dans les QFT-Plus Blood Collection Tubes. Utiliser uniquement l'héparine de lithium ou de sodium comme anticoagulant, car les autres anticoagulants interfèrent avec le dosage. Étiqueter les tubes de façon appropriée.

Il est recommandé d'étiqueter chaque tube avec l'heure et la date du prélèvement sanguin.

Important : les tubes de prélèvement sanguin doivent être à température ambiante (17–25 °C) au moment du prélèvement.

2. Remplir un tube de prélèvement sanguin avec héparine de lithium ou de sodium (volume minimal de 5 ml) et mélanger doucement en retournant le tube plusieurs fois pour dissoudre l'héparine. Cette procédure doit être effectuée par un préleveur expérimenté.
3. Options pour le temps d'attente et la température pour les tubes d'héparine de lithium ou de sodium avant le transfert et l'incubation dans les QFT-Plus Blood Collection Tubes (voir figures 1–3 pour les options de prélèvement du sang).

Option 1 : conservation et manipulation d'un tube d'héparine de lithium ou de sodium à température ambiante Le sang collecté dans un tube d'héparine de lithium ou de sodium doit être conservé à température ambiante (22 °C ± 5 °C) pour une durée qui ne peut dépasser 16 heures entre le moment du prélèvement et le transfert et l'incubation dans des QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Option 2 : conservation et manipulation d'un tube d'héparine de lithium ou de sodium réfrigéré

Important : les étapes a–d de la procédure doivent être suivies dans l'ordre.

- a. Le sang collecté dans un tube d'héparine de lithium ou de sodium doit être conservé à température ambiante (17–25 °C) pour une durée maximale de 3 heures après le prélèvement.
- b. Le sang collecté dans un tube d'héparine de lithium ou de sodium peut être réfrigéré (2–8 °C) pour une durée maximale de 48 heures.
- c. Après réfrigération, le tube d'héparine de lithium ou de sodium doit se stabiliser à température ambiante (17–25 °C) avant le transfert dans des QFT-Plus Blood Collection Tubes.
- d. Les QFT-Plus Blood Collection Tubes aliquotés doivent être placés dans l'incubateur à 37 °C dans les 2 heures suivant le transfert du sang.

Si les QFT-Plus Blood Collection Tubes ne sont pas incubés à 37 °C directement après le transfert et l'agitation dans les QFT-Plus Blood Collection Tubes, retourner les tubes

10 fois avant l'incubation à 37 °C. Le délai total entre le prélèvement sanguin et l'incubation dans les QFT-Plus Blood Collection Tubes ne doit pas dépasser 53 heures.

4. Transfert d'un prélèvement sanguin d'un tube d'héparine de lithium ou de sodium aux QFT-Plus Blood Collection Tubes :

- a. Étiqueter chaque QFT-Plus Blood Collection Tube de façon appropriée.

Veiller à ce que chaque tube (Nil, TB1, TB2 et Mitogen) soit identifiable par son étiquette ou par d'autres moyens une fois que le bouchon est retiré. Il est recommandé de reporter l'heure et la date du prélèvement sanguin des tubes d'héparine de lithium ou de sodium sur les QFT-Plus Blood Collection Tubes.

- b. Les échantillons doivent être mélangés uniformément en les retournant avant la distribution dans les QFT-Plus Blood Collection Tubes.

- c. La distribution doit être réalisée dans des conditions d'asepsie et dans le respect des procédures de sécurité appropriées, en retirant les bouchons des 4 QFT-Plus Blood Collection Tubes et en ajoutant 1 ml de sang dans chaque tube. Replacer correctement les bouchons des tubes et mélanger comme décrit ci-dessous. Veiller à ce que chaque tube (Nil, TB1, TB2 et Mitogen) soit identifiable par son étiquette ou par d'autres moyens une fois que le bouchon est retiré.

5. Mélanger les tubes. Immédiatement après avoir rempli les QFT-Plus Blood Collection Tubes, les agiter dix (10) fois suffisamment fort pour s'assurer que toute la paroi interne du tube est enduite de sang. Cela permet de dissoudre les antigènes sur les parois du tube.

Une agitation trop énergique des tubes peut provoquer une perturbation du gel et entraîner des résultats aberrants.

6. Après les avoir étiquetés, remplis et agités, transférer les tubes dans un incubateur à 37 °C ± 1 °C dans les 2 heures suivant le prélèvement. Si les QFT-Plus Blood Collection Tubes ne sont pas incubés à 37 °C directement après le prélèvement sanguin et l'agitation, retourner les tubes 10 fois (10x) pour les mélanger avant l'incubation à 37 °C. (Voir figures 1–3 page suivante pour les options de collecte du sang.)

7. Incuber les QFT-Plus Blood Collection Tubes en position VERTICALE à 37 ± 1 °C pendant 16 à 24 heures. L'incubateur ne requiert ni CO₂ ni humidification.

Effectuer le prélèvement dans les QFT-Plus Blood Collection Tubes et les conserver à température ambiante.

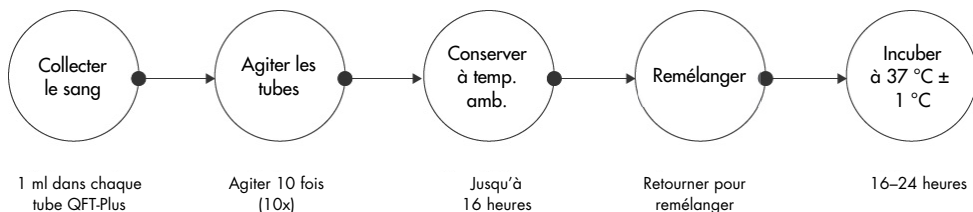


Figure 1. Option de prélèvement sanguin : effectuer directement le prélèvement dans les QFT-Plus Blood Collection Tubes et les conserver à température ambiante.

Le délai total entre le prélèvement sanguin dans les QFT-Plus Blood Collection Tubes et l'incubation à 37 °C ne doit pas dépasser 16 heures.

Effectuer le prélèvement dans un tube d'héparine de lithium ou de sodium et le conserver à température ambiante.

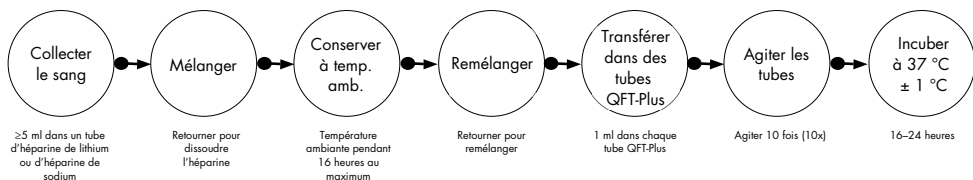


Figure 2. Option de prélèvement sanguin : effectuer le prélèvement dans un tube d'héparine de lithium ou de sodium et le conserver à température ambiante.

Le délai total entre le prélèvement sanguin dans le tube d'héparine de lithium ou de sodium et l'incubation à 37 °C ne doit pas dépasser 16 heures.

Effectuer le prélèvement dans des tubes d'héparine de lithium ou de sodium et les conserver à 2-8 °C.

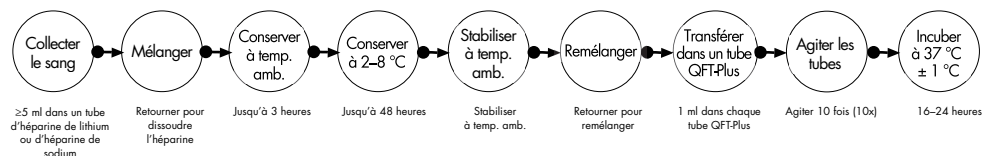


Figure 3. Option de prélèvement sanguin : effectuer le prélèvement dans un tube d'héparine de lithium ou de sodium et le conserver à 2-8 °C.

Le délai total entre le prélèvement sanguin dans le tube d'héparine de lithium ou de sodium et l'incubation à 37 °C ne doit pas dépasser 53 heures.

Instructions d'utilisation

Étape 1 : incubation du sang et collecte du plasma

Matériel fourni

- QFT-Plus Blood Collection Tubes (voir section 3)

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Voir section 3

Procédure

1. Si le sang n'est pas incubé immédiatement après le prélèvement, les tubes doivent être remélangés en les retournant 10 fois avant l'incubation.
2. Incuber les tubes en position VERTICALE à 37 ± 1 °C pendant 16 à 24 heures. L'incubateur ne requiert ni CO₂ ni humidification.
3. Après l'incubation à 37 °C, les tubes de prélèvement sanguin peuvent être conservés entre 4 °C et 27 °C pendant un maximum de 3 jours avant la centrifugation.
4. Après l'incubation des tubes à 37 °C, la collecte du plasma est facilitée si les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes avec une FCR entre 2 000 et 3 000 (*g*). La couche de gel doit alors séparer les cellules du plasma. Si ce n'est pas le cas, les tubes doivent être recentrifugés.

Il est possible de collecter le plasma sans centrifugation, mais il faut faire particulièrement attention à le retirer sans perturber les cellules.

5. Les échantillons de plasma doivent être collectés uniquement à l'aide d'une pipette.

Remarque importante : après la centrifugation, éviter de mélanger le plasma par aspiration-refoulement avec la pipette ou par tout autre moyen avant de le collecter. Pendant l'ensemble de la procédure, prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel.

Les échantillons de plasma peuvent être chargés directement des tubes de prélèvement sanguin centrifugés dans la microplaque QFT-Plus ELISA, y compris lorsque des stations de travail ELISA automatiques sont utilisées.

Les échantillons de plasma peuvent être stockés jusqu'à 28 jours entre 2 °C et 8 °C ou, s'ils sont collectés, en dessous de -20 °C pendant des périodes prolongées.

Pour des échantillons de test appropriés, collecter au moins 150 µl de plasma.

Étape 2 : IFN- γ ELISA

Matériel fourni

- Kit QFT-Plus ELISA (voir section 3)

Matériel nécessaire, mais non fourni

- Voir section 3.

Procédure

1. L'ensemble des échantillons de plasma et des réactifs, sauf le conjugué concentré 100x, doit être amené à température ambiante (22 ± 5 °C) avant d'être utilisé. Attendre au moins 60 minutes pour la stabilisation.
2. Retirer du cadre les barrettes superflues, les remettre dans la poche en aluminium fermée et les replacer au réfrigérateur pour les stocker jusqu'à leur utilisation.

Prévoir au moins 1 barrette pour les étalons de QFT-Plus et suffisamment de barrettes pour le nombre de sujets testés (voir Figure 5). Après utilisation, conserver le cadre pour une utilisation ultérieure avec les barrettes restantes.

3. Reconstituer le standard IFN- γ avec le volume d'eau déionisée ou distillée indiqué sur l'étiquette du flacon. Mélanger délicatement afin de réduire la formation de mousse et de garantir une solubilisation complète. La reconstitution de l'étalon au volume indiqué donne une solution à une concentration de 8,0 UI/ml.

Remarque importante : le volume de reconstitution de l'étalon du kit diffère en fonction des lots.

Utiliser l'étalon du kit reconstitué pour effectuer une dilution 1/2 suivie d'une série de dilutions 1/4 de l'IFN- γ dans le diluant vert (GD) (voir Figure 4). S1 (l'étalon 1) contient 4,0 UI/ml, S2 (l'étalon 2) contient 1,0 UI/ml, S3 (l'étalon 3) contient 0,25 UI/ml et S4 (l'étalon 4) contient 0 UI/ml (GD seul). Les étalons doivent être dosés au moins en duplicats. Préparer des dilutions fraîches de l'étalon du kit pour chaque test ELISA.

Procédure recommandée pour les étalons dupliqués

Marquer les 4 tubes « S1 », « S2 », « S3 », « S4 ».

Ajouter 150 μ l de GD dans S1, S2, S3, S4.

Ajouter 150 μ l d'étalon du kit dans S1 et mélanger soigneusement.

Transférer 50 μ l de S1 à S2 et mélanger soigneusement.

Transférer 50 μ l de S2 à S3 et mélanger soigneusement.

Le GD seul sert d'étalon zéro (S4).

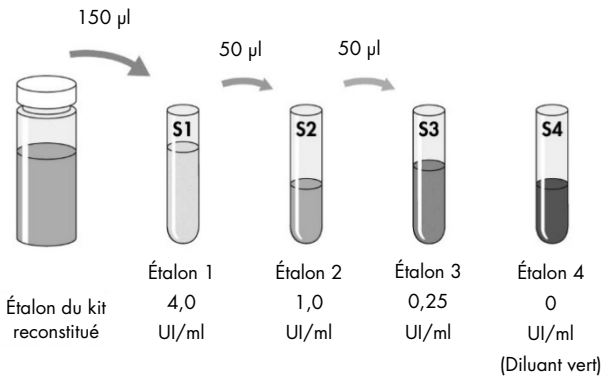


Figure 4. Préparation de la courbe d'étalonnage.

- Reconstituer le conjugué concentré 100x lyophilisé avec 0,3 ml d'eau déionisée ou distillée. Mélanger délicatement afin de réduire la formation de mousse et de garantir une solubilisation complète du conjugué.

Le conjugué à la concentration de travail est préparé en diluant la quantité requise de conjugué concentré 100x reconstitué dans le diluant vert (Tableau 1. Préparation du conjugué.). Stocker de nouveau toute fraction non utilisée de conjugué concentré 100x entre 2 °C et 8 °C immédiatement après utilisation. Utiliser uniquement le diluant vert.

Tableau 1. Préparation du conjugué.

Nombre de barrettes	Volume de conjugué concentré 100x	Volume de diluant vert
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

- Pour les échantillons de plasma collectés dans les tubes de prélèvement sanguin puis stockés (réfrigérés ou congelés), mélanger les échantillons avant de les ajouter au puits ELISA.

Remarque importante : si les échantillons de plasma sont ajoutés directement depuis les tubes QFT-Plus centrifugés, tout mélange du plasma doit être évité. Pendant l'ensemble de la procédure, prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel.

- Ajouter 50 µl du conjugué à la concentration de travail fraîchement préparé dans les puits ELISA requis à l'aide d'une pipette multicanal.

7. Ajouter 50 µl d'échantillons de plasma de test dans les puits appropriés à l'aide d'une pipette multicanal (voir Figure 5 pour la configuration de microplaque recommandée). Enfin, ajouter 50 µl de chacun des étalons 1 à 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 TB2	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

Figure 5. Configuration d'échantillons recommandée (22 tests par microplaque).

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

1 N (échantillon 1. Plasma Nil), 1 TB1 (échantillon 1. Plasma TB1), 1 TB2 (échantillon 1. Plasma TB2), 1 M (échantillon 1. plasma Mitogen)

8. Couvrir chaque microplaque et mélanger le conjugué et les échantillons/étalons de plasma soigneusement en utilisant un agitateur de microplaque pendant 1 minute. Éviter les projections de liquide.
9. Couvrir chaque microplaque et incuber à température ambiante ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) pendant 120 ± 5 minutes.

Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.

10. Au cours de l'incubation, diluer une mesure du concentré de tampon de lavage 20x avec 19 mesures d'eau déionisée ou distillée et mélanger soigneusement. La quantité de concentré de tampon de lavage 20x fournie est suffisante pour préparer 2 litres de tampon de lavage à la concentration de travail.

Laver les puits avec 400 µl de tampon de lavage à la concentration de travail pendant au moins 6 cycles. Il est recommandé d'utiliser un laveur de plaques automatique.

Il est essentiel de procéder soigneusement au lavage avant d'exécuter le dosage. Veiller à ce que chaque puits soit rempli à ras bord de tampon de lavage pour chaque cycle de lavage. Un temps de trempage d'au moins 5 secondes est recommandé entre chaque cycle.

Un désinfectant de laboratoire ordinaire doit être ajouté au réservoir d'effluent et les procédures établies pour la décontamination de matériel potentiellement infectieux doivent être suivies.

11. Tapoter les microplaques face vers le bas sur une serviette absorbante non pelucheuse pour éliminer le reste de tampon de lavage. Ajouter 100 µl de solution de substrat enzymatique dans chaque puits, couvrir chaque microplaque et mélanger soigneusement à l'aide d'un agitateur de microplaque.
12. Couvrir chaque microplaque et incuber à température ambiante ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) pendant 30 minutes.

Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.

13. Après la période d'incubation de 30 minutes, ajouter 50 µl de la solution d'arrêt de la réaction enzymatique à chaque puits et mélanger.

La solution d'arrêt de la réaction enzymatique doit être ajoutée aux puits dans le même ordre et avec à peu près la même rapidité que le substrat déposé à l'étape 11.

Mesurer la densité optique (DO) de chaque puits au cours des 5 minutes suivant l'arrêt de la réaction en utilisant un lecteur de microplaque équipé d'un filtre à 450 nm et d'un filtre de référence entre 620 nm et 650 nm. Les valeurs de DO sont utilisées pour calculer les résultats.

Calculs et interprétation du test

Le logiciel d'analyse QFT-Plus peut être utilisé pour traiter les données brutes et calculer les résultats. Il est disponible sur www.QuantiFERON.com. Vérifier que la version la plus récente du logiciel d'analyse QFT Plus est utilisée.

Le logiciel effectue une évaluation de contrôle qualité du dosage, génère une courbe d'étalonnage et fournit un résultat de test pour chaque sujet, comme décrit dans la section « Interprétation des résultats ».

Au lieu d'utiliser le logiciel d'analyse QFT-Plus, les résultats peuvent être déterminés selon la méthode suivante.

Génération de la courbe d'étalonnage

(si le logiciel d'analyse QFT-Plus n'est pas utilisé)

Déterminer les valeurs de DO moyennes des réplicats de l'étalon du kit pour chaque microplaque.

Établir une courbe d'étalonnage $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ en traçant le $\log_{(e)}$ de la DO moyenne (axe des y) en fonction du $\log_{(e)}$ de la concentration en IFN- γ des étalons en UI/ml (axe des x), en omettant l'étalon zéro dans ces calculs. Déterminer la droite de régression correspondant le mieux à la courbe d'étalonnage.

Utiliser la courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration en IFN- γ (UI/ml) de chacun des échantillons de plasma du test à l'aide de la valeur de DO de chaque échantillon.

Ces calculs peuvent être effectués à l'aide des packs logiciels disponibles avec les lecteurs de microplaque ainsi qu'avec les tableurs ou logiciels statistiques classiques (comme Microsoft® Excel®). Il est recommandé d'utiliser ces packs logiciels pour calculer l'analyse de régression,

le coefficient de variation (CV en %) pour les étalons et le coefficient de corrélation (r) de la courbe d'étalonnage.

Contrôle qualité du test

La fiabilité des résultats du test dépend de la précision de la courbe d'étalonnage. Il faut donc examiner les résultats dérivés des étalons avant d'interpréter les résultats des échantillons de test.

Pour que le test par ELISA soit valide :

- La valeur de DO moyenne de l'étalon 1 doit être $\geq 0,600$.
- Le CV des valeurs de DO des réplicats de l'étalon 1 et de l'étalon 2 doit être $\leq 15\%$.
- Les valeurs de DO des réplicats pour l'étalon 3 et l'étalon 4 ne doivent pas s'écarter de plus de 0,040 unité de densité optique de leur valeur moyenne.
- Le coefficient de corrélation (r) calculé à partir des valeurs d'absorbance moyennes des étalons doit être $\geq 0,98$.

Le logiciel d'analyse QFT-Plus calcule et rapporte ces paramètres de contrôle qualité.

Si les critères ci-dessus ne sont pas respectés, l'analyse n'est pas valide et doit être répétée.

La valeur de DO moyenne de l'étalon zéro (diluant vert) doit être $\leq 0,150$. Si la valeur de DO moyenne est $> 0,150$, la procédure de lavage des microplaques doit être réévaluée.

Interprétation des résultats

Les résultats de QFT-Plus sont interprétés en fonction des critères suivants (Tableau 2) :

Remarque importante : le diagnostic ou l'exclusion de la tuberculose maladie, ainsi que l'évaluation de la probabilité d'une ITL, exigent de prendre en compte les antécédents et les résultats épidémiologiques, médicaux et diagnostiques pour l'interprétation des résultats de QFT-Plus.

Tableau 2. Interprétation des résultats de QFT-Plus.

Nil (UI/ml)	TB1 moins Nil (UI/ml)	TB2 moins Nil (UI/ml)	Mitogen moins Nil (UI/ml)*	Résultat de QFT-Plus	Rapport/interprétation
	≥0,35 et ≥25 % de la valeur du tube Nil	Toute valeur	Toute valeur	Positif†	Infection par <i>M. tuberculosis</i> probable
	Toute valeur	≥0,35 et ≥25 % de la valeur du tube Nil			
≤8,0	<0,35 ou ≥0,35 et <25 % de la valeur du tube Nil	<0,35 ou ≥0,35 et <25 % de la valeur du tube Nil	≥ 0,5	Négatif	Infection par <i>M. tuberculosis</i> NON probable
	<0,35 ou ≥0,35 et <25 % de la valeur du tube Nil	<0,35 ou ≥0,35 et <25 % de la valeur du tube Nil	<0,5	Indéterminé‡	Impossible de déterminer la probabilité d'une infection par <i>M. tuberculosis</i>
>8,0§		Toute valeur		Indéterminé‡	Impossible de déterminer la probabilité d'une infection par <i>M. tuberculosis</i>

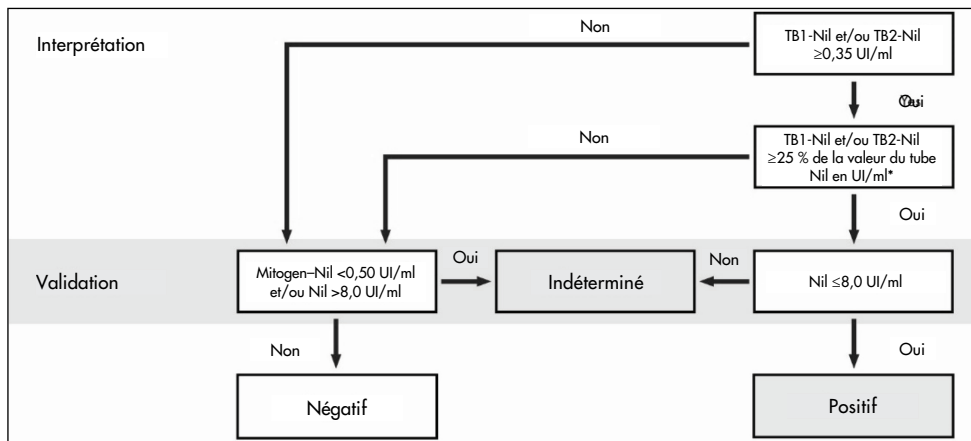
* Les réponses au contrôle positif Mitogen (et parfois antigènes TB) peuvent être en dehors de la plage du lecteur de microplaque. Cela n'a pas d'impact sur les résultats du test. Les valeurs >10 ml sont rapportées par le logiciel QFT-Plus comme >10 UI/ml.

† Si l'infection par *M. tuberculosis* n'est pas suspectée, les résultats initialement positifs peuvent être confirmés par un nouveau test des échantillons de plasma d'origine en duplicats dans le test QFT-Plus ELISA. Si le test répété d'un ou des deux réplicats est positif, l'individu doit être considéré comme positif au test.

‡ Voir la section « Dépannage » pour les causes possibles.

§ Dans les études cliniques, moins de 0,25 % des sujets présentaient des teneurs en IFN-γ qui étaient >8,0 UI/ml pour le tube Nil.

L'ampleur de la teneur en IFN-γ mesurée ne peut être corrélée au stade ou au degré de l'infection, au niveau de la réponse immunitaire ou à la probabilité de progression vers la maladie active. Une réponse positive aux antigènes TB chez les personnes négatives au Mitogen est rare, mais a déjà été observée chez les patients atteints de la maladie de la tuberculose. Cela indique que la réponse de l'IFN-γ aux antigènes TB est supérieure à la réponse au Mitogen, ce qui est possible, car la teneur en Mitogen ne stimule pas au maximum la production d'IFN-γ par les lymphocytes.



* Pour que TB1 moins Nil ou TB2 moins Nil soient valides, la quantité $\geq 25\%$ de la valeur du tube Nil en UI/ml doit provenir du même tube que pour le résultat $\geq 0,35$ UI/ml d'origine.

Figure 6. Diagramme d'interprétation de QFT-Plus.

Limitations

Les résultats du test QFT-Plus doivent être utilisés en lien avec les antécédents épidémiologiques, le statut médical actuel et les autres évaluations diagnostiques de chaque individu.

Les individus dont les valeurs du tube Nil sont supérieures à 8,0 UI/ml sont considérés comme ayant des résultats « indéterminés », car une réponse 25 % plus élevée aux antigènes TB peut se situer hors de la plage de mesure du dosage.

Des résultats non fiables ou indéterminés peuvent survenir dans les cas suivants :

- Déviations par rapport à la procédure décrite dans cette notice
- Teneurs excessives en IFN- γ circulant ou présence d'anticorps hétérophiles
- Délai de plus de 16 heures entre le prélèvement de l'échantillon sanguin et l'incubation à 37 °C. Cela ne s'applique pas en cas d'utilisation de la procédure avec tube d'héparine de lithium ou d'héparine de sodium entre 2 et 8 °C.

Caractéristiques de performances

Études cliniques

Comme il n'existe pas de test normalisé pour l'ITL, l'estimation de la sensibilité et de la spécificité pour QFT-Plus ne peut être effectuée dans la pratique. La spécificité de QFT-Plus a été estimée par approximation en évaluant les taux de faux positifs chez les personnes présentant un faible risque (aucun facteur de risque connu) d'infection tuberculeuse. La sensibilité a été estimée par approximation en évaluant des groupes de patients souffrant de la tuberculose active confirmée en culture.

Spécificité

Une étude d'évaluation de la spécificité de QFT-Plus a été réalisée chez 409 sujets. Les données démographiques et les facteurs de risque d'exposition à la tuberculose ont été déterminés à l'aide d'une enquête normalisée effectuée au moment du test.

Dans un résumé des résultats obtenus pour 2 groupes de patients présentant un faible risque (aucun facteur de risque connu) d'infection tuberculeuse, la spécificité globale de QFT-Plus était de 97,6 % (399/409) (Tableau 3 et Tableau 4).

Tableau 3. Résultats de l'étude de spécificité de QFT-Plus par site d'étude.

Étude	Positif	Négatif	Indéterminé	Spécificité (IC 95 %)
Japon	4	203	0	98 % (95–100 %)
Australie	6	196	0	97 % (94–99 %)

Tableau 4. Résultats de l'étude de spécificité de QFT-Plus par TB Antigen Tube.

Étude	TB1	TB2	QFT-Plus
Positif	5	10	10
Négatif	404	399	399
Indéterminé	0	0	0
Spécificité (IC 95 %)	98,8 % (97,2–99,6)	97,6 % (95,6–98,8)	97,6 % (95,6–98,8)

Sensibilité pour la tuberculose active

Bien qu'il n'existe pas de test normalisé pour l'ITL, la culture microbiologique de *M. tuberculosis* peut en tenir lieu avantageusement, car les patients atteints de la maladie sont par définition infectés. Les individus de 4 sites d'étude en Australie et au Japon, chez lesquels une tuberculose était suspectée – l'infection par *M. tuberculosis* ayant ensuite été confirmée par culture, ont été testés pour évaluer la sensibilité de QFT-Plus (Tableau 5 et Tableau 6). Les patients avaient reçu moins de 14 jours de traitement avant le prélèvement sanguin pour le test QFT-Plus.

Dans un résumé des résultats obtenus pour les 4 groupes de patients positifs à la culture de *M. tuberculosis*, la sensibilité globale de QFT-Plus pour la tuberculose active était de 95,3 % (164/172). Dans les 4 groupes, 159 patients étaient positifs pour les deux tubes, TB1 et TB2, 1 patient était positif pour le TB1 uniquement et 4 patients étaient positifs pour le TB2 uniquement. Un total de 1,1 % (2/174) des résultats était indéterminé. Le résultat TB2 a correctement identifié 1 patient confirmé en culture dont le résultat TB1 seul aurait été indéterminé (Mitogen faible) (voir Tableau 5 et Tableau 6).

Tableau 5. Résultats de l'étude de sensibilité de QFT-Plus par site d'étude.

Sites d'étude	Positif	Négatif	Indéterminé	Sensibilité de QFT-Plus* (IC 95 %)
Site japonais 1	36	7	0	84 % (69–93)
Site japonais 2	53	1	2	98 % (90–100)
Site japonais 3	54	0	0	100 % (93–100)
Site australien	21	0	0	100 % (84–100)

* La sensibilité repose sur le nombre total de tests valides et exclut les résultats indéterminés.

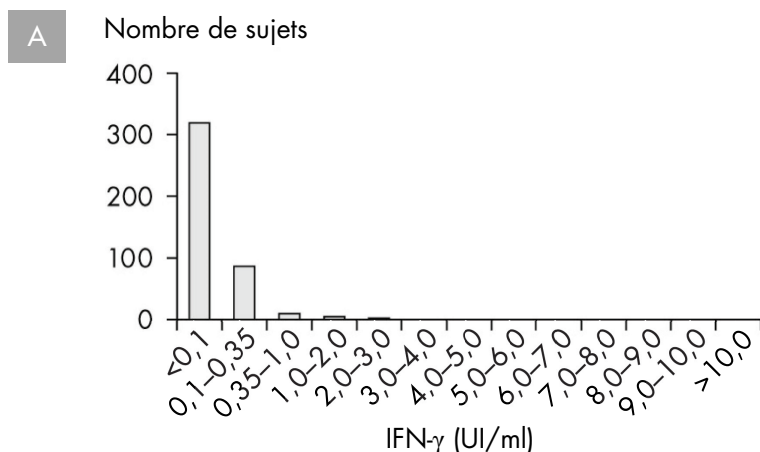
Tableau 6. Résultats de l'étude de sensibilité de QFT-Plus par TB Antigen Tube

	TB1	TB2	QFT-Plus
Positif	160	163	164
Négatif	11	9	8
Indéterminé	3	2	2
Sensibilité† (IC 95 %)	93,6% (88,8–96,7)	94,8 % (90,3–97,6)	95,3 % (90,9–97,9)

* La sensibilité repose sur le nombre total de tests valides et exclut les résultats indéterminés.

Distributions des réponses observées, stratifiées en fonction du risque

Une série de réponses de l'IFN- γ à TB1, TB2 et aux tubes de contrôle a été observée dans le cadre d'essais cliniques et stratifiée en fonction du risque d'infection par *M. tuberculosis* (figures 7–9). Le groupe à risque modéré est constitué de sujets représentatifs d'une population générale de test et inclut des sujets avec ou sans facteurs de risque d'exposition à la tuberculose et chez lesquels la tuberculose active est improbable (c'est-à-dire avec ITL).



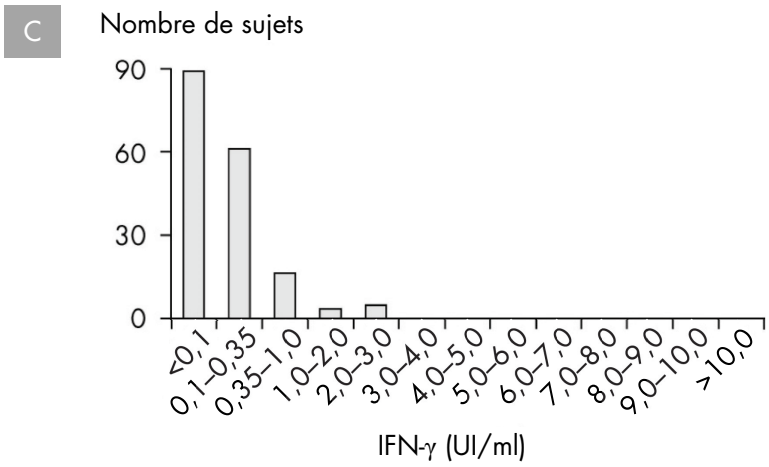
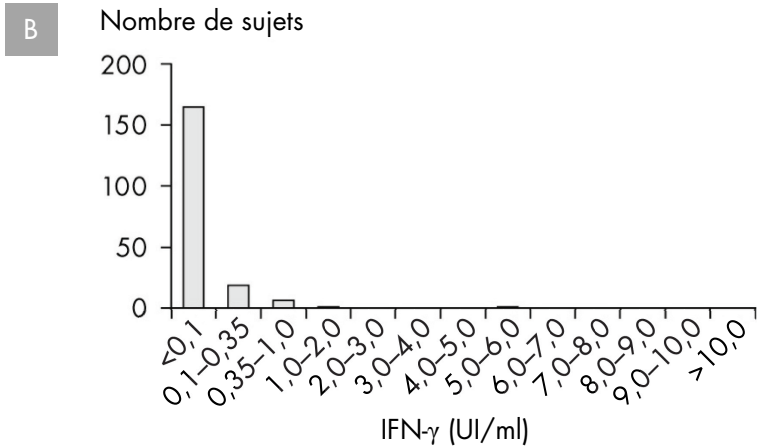


Figure 7. Distribution des valeurs du tube Nil. **A.** Distribution des valeurs du tube Nil dans une population à faible risque (n=409). **B.** Distribution des valeurs du tube Nil dans une population à risque modéré (n=194). **C.** Distribution des valeurs du tube Nil dans une population avec infection par *M. tuberculosis* confirmée par culture. *M. tuberculosis* infection (n=174).

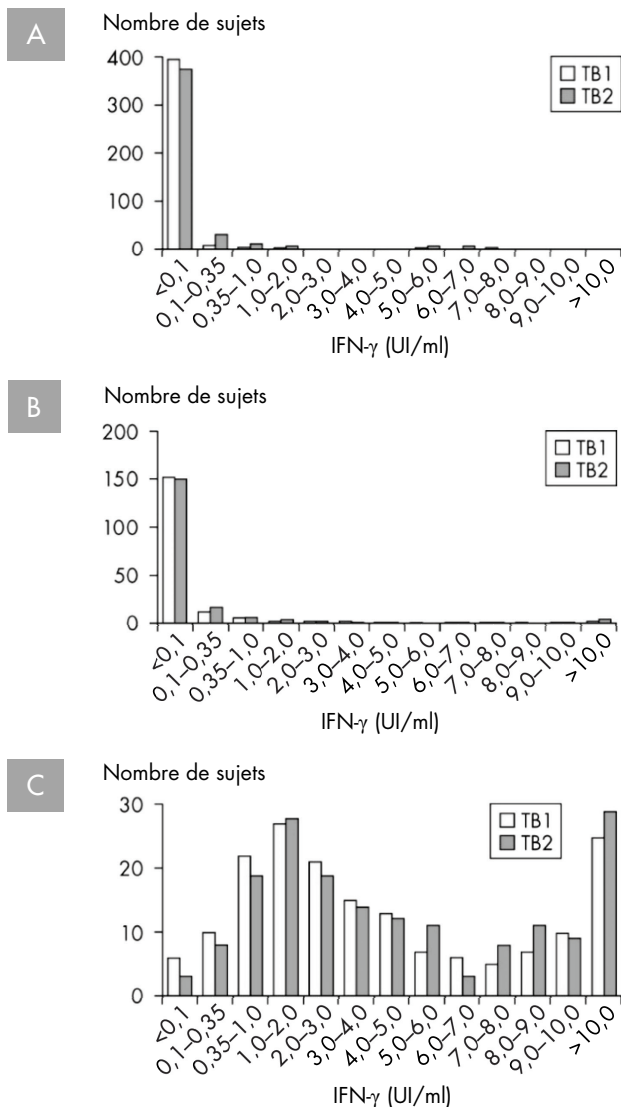


Figure 8. Distribution de TB1 et TB2 (Nil soustrait). **A.** Distribution des valeurs de TB1 et TB2 (Nil soustrait) dans une population à faible risque (n=409). **B.** Distribution des valeurs de TB1 et TB2 (Nil soustrait) dans une population à risque modéré (n=194). **C.** Distribution des valeurs de TB1 et TB2 (Nil soustrait) dans une population avec infection par *M. tuberculosis* confirmée par culture (n=174).

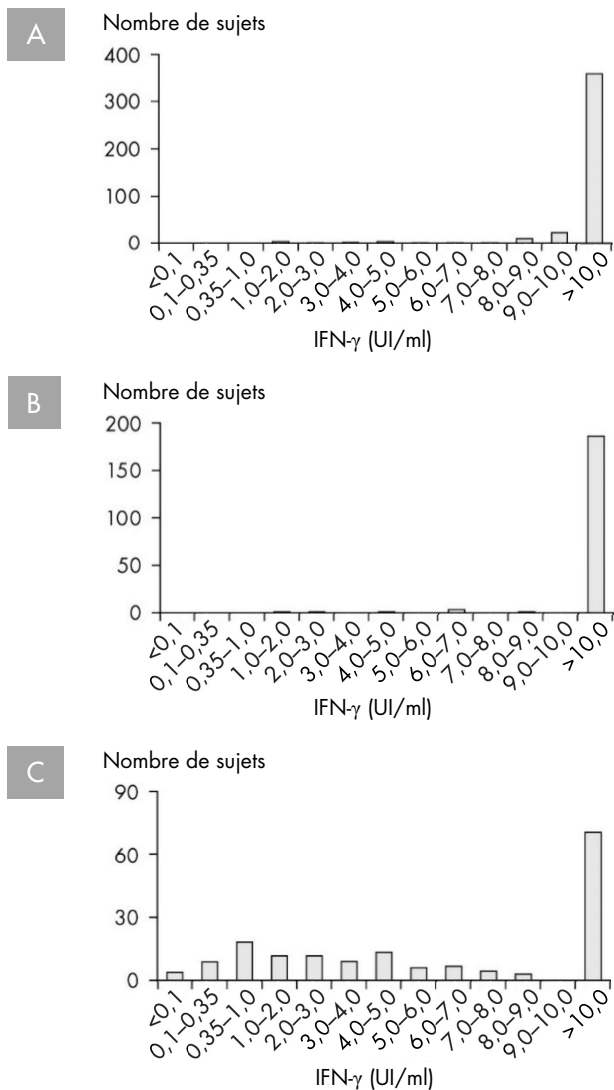


Figure 9. Distribution des valeurs du tube Mitogen (Nil soustrait). **A.** Distribution des valeurs du tube Mitogen (Nil soustrait) dans une population à faible risque (n=409). **B.** Distribution des valeurs du tube Mitogen (Nil soustrait) dans une population à risque modéré (n=194). **C.** Distribution des valeurs du tube Mitogen (Nil soustrait) dans une population avec infection par *M. tuberculosis* confirmée par culture (n=169).

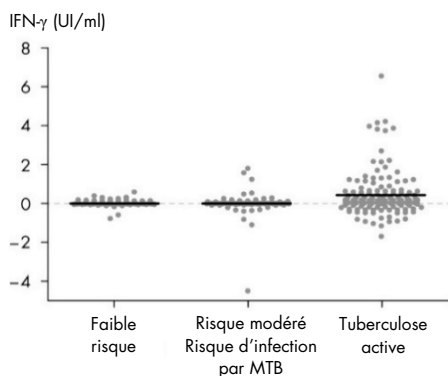


Figure 10. Différence observée entre les valeurs de TB1 et TB2 (Nil soustrait), stratifiée en fonction du risque. Population à faible risque (n=409), population à risque modéré (n=189) et population avec infection par *M. tuberculosis* confirmée par culture (n=141). Les valeurs de TB1 ont été soustraites des valeurs de TB2. Les sujets présentant des valeurs de TB1 ou TB2 >10,0 UI/ml ont été exclus, car ils se situent en dehors de la plage linéaire du dosage.

Caractéristiques de performances du dosage

La linéarité du QFT-Plus ELISA a été démontrée en plaçant 5 réplicats de 11 pools de plasma de concentrations en IFN- γ connues de manière aléatoire sur la microplaque ELISA. La droite de régression linéaire présente une pente de $1,002 \pm 0,011$ et un coefficient de corrélation de 0,99 (Figure 11).

La limite de détection du QFT-Plus ELISA est de 0,065 UI/ml et il n'existe aucune preuve d'effet crochet à haute dose (effet prozone) avec des concentrations en IFN- γ atteignant 10 000 UI/ml.

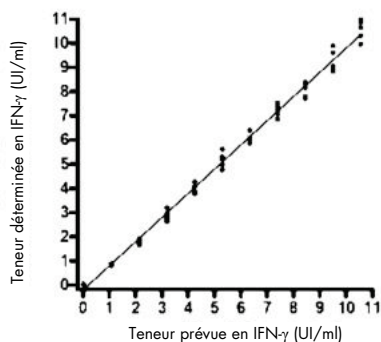


Figure 11. Profil de linéarité du QFT-Plus ELISA.

L'imprécision intra- et interdosage (CV en %) de QFT-Plus ELISA a été estimée. Pour cela, 3 opérateurs différents ont testé 20 échantillons de plasma avec différentes concentrations en IFN- γ en réplicats de 3, dans 3 laboratoires différents et pendant 3 jours non consécutifs. Par conséquent, chaque échantillon a été testé 27 fois dans le cadre de 9 dosages indépendants. L'un des échantillons était un contrôle Nil avec une concentration en IFN- γ calculée de 0,08 UI/ml (IC 95 % : 0,07–0,09). Pour les 19 échantillons de plasma restants, les concentrations étaient comprises entre 0,33 (IC 95 % : 0,31–0,34) et 7,7 UI/ml (IC 95 % : 7,48–7,92).

L'imprécision intradosage (au sein d'un même dosage) a été estimée en calculant la moyenne des coefficients de variation (CV en %) de chaque plasma de test contenant de l'IFN- γ provenant de chaque analyse de microplaque ($n = 9$). L'imprécision était comprise entre 4,1 et 9,1 % (CV). La covariance intradosage moyenne (IC \pm 95 %) était de 6,6 % \pm 0,6%. La moyenne du plasma IFN- γ zéro était de 14,1 % (CV).

L'imprécision totale ou interdosage a été déterminée en comparant les 27 concentrations en IFN- γ calculées pour chaque plasma de test. L'imprécision interdosage était comprise entre 6,6 et 12,3 % (CV). Le CV moyen global (IC \pm 95 %) était de 8,7 % \pm 0,7 %. Le plasma IFN- γ zéro présentait un CV de 26,1 %. Ce niveau de variation est prévisible, car la concentration calculée en IFN- γ est faible et la variation pour une estimation de concentration basse est supérieure à celle des concentrations plus élevées.

La reproductibilité du test QFT-Plus a été déterminée à l'aide d'échantillons sanguins de 102 sujets présentant des facteurs de risque modéré d'infection à *M. tuberculosis*. Trois opérateurs différents et trois conditions de laboratoires différentes ont été évalués.

Trois déterminations diagnostiques par sujet ont été réalisées, soit un total de 306 déterminations diagnostiques pour l'ensemble des sujets. Globalement, la reproductibilité diagnostique était de 99 % (IC 95 % : 97,2–99,7), le résultat diagnostique étant concordant pour 303 des 306 déterminations. Les résultats de 3 sujets qui étaient proches de la valeur seuil étaient à l'origine de la variation totale.

Diagnostic de l'ITL

Un certain nombre d'études publiées démontrent les performances du QFT, le précurseur du QFT-Plus, dans plusieurs populations présentant un risque d'infection par MTB. Les principales conclusions de certaines de ces études sont indiqués dans le Tableau 7.

Tableau 7. Sélection d'études publiées sur le QFT.

Population/condition	Résultats et conclusions	Nombre total d'études publiées
Pédiatrie	Performances prouvées chez les enfants, y compris les enfants de moins de 5 ans (45–46), avec une précision supérieure à celle du test IGRA reposant sur le test ELISpot (8). La plus importante étude à ce jour comparant le QFT et le TCT chez des enfants du Viêt Nam, des Philippines et du Mexique plaide en faveur de l'utilisation du QFT plutôt que du TCT pour dépister l'ITL chez les enfants nés à l'étranger (46). Une étude de contacts limitée révèle une meilleure valeur prédictive que le TCT chez les enfants (47) et un risque 8 fois supérieur de progression vers la maladie de la tuberculose dans les deux ans chez les sujets pour lesquels le QFT montrait une conversion comparativement aux sujets sans conversion (48). La discordance « QFT négatif/TCT positif » est élevée chez les enfants vaccinés par le BCG (46, 49), mais aucun impact sur la réponse au Mitogen n'a été constaté chez les enfants de moins de 5 ans (49) et le taux de résultats indéterminés était faible lors du dépistage de routine des enfants immigrants (46).	152
Grossesse	Dans une région à faible incidence tuberculeuse, les performances du QFT sont identiques pour chaque trimestre de la grossesse, les résultats étant comparables à ceux des femmes non enceintes. La spécificité du QFT est largement supérieure et sa sensibilité au moins égale. En outre, le QFT pourrait mieux prédire la progression de la maladie que le TCT (50). Dans une région à forte incidence tuberculeuse, les performances du QFT se sont avérées plus stables tout au long de la grossesse. Le QFT a fourni une approximation plus précise de la prévalence de fond de l'ITL comparativement au TCT, mais les auteurs ont conclu que la grossesse affectait aussi bien le QFT que le TCT (51).	6

Suite du tableau page suivante

Tableau 7. Sélection d'études publiées sur le QFT (suite).

Population/condition	Résultats et conclusions	Nombre total d'études publiées
VIH/SIDA	Les tests IGRA et TCT sont tous deux affectés par l'infection au VIH. Plusieurs données probantes indiquent que les résultats doivent être interprétés avec précaution chez les sujets présentant un taux de CD4+ < 200 (52). Il a été démontré que le QFT est moins affecté que le TCT et le test IGRA reposant sur ELISpot (53–55). Le test IGRA s'effectuant en une seule visite, il permet de surmonter le problème des faibles taux de retour chez cette population, contrairement au TCT (53).	101
Traitements immunosuppresseurs	Le QFT est moins affecté par les traitements immunosuppresseurs que le TCT et présente une meilleure corrélation avec les facteurs de risque de la TB (23, 27). Le QFT présente une sensibilité élevée chez les patients avec affection rhumatismale (23, 56, 57), ainsi qu'une spécificité supérieure au TCT, ce qui réduit le risque de faux positifs et de traitements inutiles qu'entraînerait le TCT (23, 57, 58).	112
Professionnels de santé	Il a été démontré que ce test présente une spécificité supérieure, avec un nombre de faux positifs inférieur, au TCT et qu'il est plus rentable que le TCT (59–62). La variabilité à proximité du seuil est un résultat attendu avec les tests en série, en raison du seuil dichotomique et de la variabilité inhérente à un test biologique (63). Les études ont indiqué des taux de conversion/réversion supérieurs à ceux du TCT lors de tests en série chez des professionnels de la santé à faible risque (64, 65). Le CDC américain reconnaît que le critère souple utilisé pour définir la conversion du test IGRA peut entraîner plus de conversions que celles observées avec les critères quantitatifs plus stricts du TCT. En outre, il a été démontré que les stratégies de réexécution des tests sont plus efficaces dans la gestion du phénomène de conversion/réversion (65–68).	111
Contacts de TB	VPP et VPN supérieures à celles du TCT (47) ; avantage de la visite unique pour les sujets risquant de ne pas se représenter (63) ; meilleure corrélation à l'exposition (69), particulièrement chez les personnes vaccinées par le BCG et les populations provenant de pays pratiquant la vaccination par le BCG (70, 71).	89
Transplantation	Il a été démontré que le test est au moins aussi efficace que le TCT, mais moins affecté par une affection organique en phase terminale que le TCT (22).	23

Suite du tableau page suivante

Tableau 7. Sélection d'études publiées sur le QFT (suite).

Population/condition	Résultats et conclusions	Nombre total d'études publiées
Diabète	Des résultats contradictoires ont été publiés dans un faible nombre d'études incluant un faible nombre de sujets. Selon une étude effectuée dans une zone géographique à faible incidence tuberculeuse, la sensibilité du QFT n'est pas affectée par le diabète chez les patients avec TB (72). Une étude menée en Tanzanie, une région à forte incidence tuberculeuse, suggérant un impact négatif du diabète sur la production d'IFN- γ , n'a pas pris en compte les facteurs de confusion tels que les infections au VIH et aux helminthes (73). Dans des études menées au Viêt Nam, 838 patients se déclarant diabétiques et chez lesquels la TB était suspectée en raison de radiographies du thorax anormales ou chez lesquels la TB active était confirmée par culture (n=128), la positivité au QFT était supérieure ou égale aux seuils de 10 et 15 mm du TCT (74).	9
Maladie rénale en phase terminale	Les résultats positifs au QFT présentent une meilleure corrélation avec les facteurs de risque pour la TB que le TCT et ils sont moins associés avec le BCG (75).	45
Migrants	Les études démontrent que le QFT n'est pas affecté par le BCG et par l'âge, contrairement au TCT (74). Il a été démontré que le QFT est la méthode la plus rentable (76). Dans les régions à faible incidence tuberculeuse, la majorité des cas de TB vient de personnes nées à l'étranger et à des réactivations de la TB latente après arrivée (77). La plus importante étude à ce jour comparant le QFT et le TCT chez des enfants immigrants préconise l'utilisation du QFT plutôt que du TCT pour dépister l'infection TB latente chez les enfants nés à l'étranger (46).	29

Informations techniques

Résultats indéterminés

Les résultats indéterminés sont peu fréquents et peuvent être liés au statut immunitaire de l'individu testé, mais aussi à un certain nombre de facteurs techniques si les instructions d'utilisation ci-dessus ne sont pas respectées.

Si des problèmes techniques sont suspectés avec le stockage des réactifs, le prélèvement du sang ou la manipulation des échantillons sanguins, répéter tout le test QFT-Plus avec un nouveau prélèvement sanguin. Il est possible de répéter le test ELISA de plasmas stimulés si un lavage insuffisant ou un autre écart de procédure avec le test ELISA sont suspectés. Les résultats indéterminés dus à de faibles valeurs du tube Mitogen ou des valeurs élevées du tube Nil ne doivent pas changer si le test est répété, sauf en cas d'erreur avec le test ELISA. Les résultats indéterminés doivent être rapportés comme tels. Les médecins peuvent choisir de prescrire un nouveau prélèvement ou d'autres procédures s'ils le jugent nécessaire.

Échantillons de plasma coagulés

Si des caillots de fibrine apparaissent pendant le stockage à long terme des échantillons de plasma, centrifuger les échantillons pour culotter la matière coagulée et faciliter le pipetage du plasma.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous permettre de résoudre les problèmes éventuels. Pour de plus amples informations, voir également les informations techniques fournies sur : www.QuantiFERON.com. Pour les coordonnées, voir quatrième de couverture.

Dépannage du dosage ELISA

Développement de couleur non spécifique

Cause possible	Solution
a) Lavage insuffisant de la plaque	Laver la plaque au moins 6 fois avec 400 µl de tampon de lavage par puits. Plus de 6 cycles de lavage peuvent s'avérer nécessaires en fonction du laveur utilisé. Un temps de trempage d'au moins 5 secondes doit être utilisé entre chaque cycle.
b) Contamination croisée des puits ELISA	Faire attention lors du pipetage et du mélange des échantillons pour réduire le risque de contamination.
c) Kit/composants périmés	Veiller à utiliser le kit avant la date d'expiration. Faire en sorte que l'étalon reconstitué et le conjugué concentré 100x soient utilisés dans les trois mois suivant la date de reconstitution.
d) La solution de substrat enzymatique est contaminée	Jeter le substrat en cas de coloration bleue. Vérifier la propreté des réservoirs de réactifs.
e) Mélange du plasma dans les tubes QFT-Plus avant la collecte	Après la centrifugation, éviter de mélanger le plasma par aspiration-refoulement avec la pipette ou par tout autre moyen avant de le collecter. Pendant l'ensemble de la procédure, prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel.

Faible densité optique mesurée pour les étalons

Cause possible	Solution
a) Erreur de dilution de l'étalon	Vérifier que les dilutions de l'étalon du kit sont préparées correctement et conformément à cette notice.
b) Erreur de pipetage	Vérifier que les pipettes sont calibrées et utilisées conformément aux instructions du fabricant.
c) Température d'incubation trop faible	L'incubation du dosage ELISA doit être effectuée à température ambiante (22 °C ± 5 °C).
d) Période d'incubation trop courte	L'incubation de la microplaque avec le conjugué, les étalons et les échantillons doit durer 120 ± 5 minutes. La solution de substrat enzymatique est incubée dans la microplaque pendant 30 minutes.

Dépannage du dosage ELISA

- | | |
|--|--|
| e) Utilisation du mauvais filtre de lecteur de microplaque | La microplaque doit être lue à 450 nm avec un filtre de référence de 620 à 650 nm. |
| f) Les réactifs sont trop froids | Tous les réactifs, à l'exception du conjugué concentré 100x, doivent être amenés à température ambiante avant le début du dosage. Cela prend environ une heure. |
| g) Kit/composants périmés | Veiller à utiliser le kit avant la date d'expiration. Faire en sorte que l'étalon reconstitué et le conjugué concentré 100x soient utilisés dans les 3 mois suivant la date de reconstitution. |

Bruit de fond élevé

Cause possible

Solution

- | | |
|---|--|
| a) Lavage insuffisant de la plaque | Laver la plaque au moins 6 fois avec 400 µl de tampon de lavage par puits. Plus de 6 cycles de lavage peuvent s'avérer nécessaires en fonction du laveur utilisé. Un temps de trempage d'au moins 5 secondes doit être utilisé entre chaque cycle. |
| b) Température d'incubation trop élevée | L'incubation du dosage ELISA doit être effectuée à température ambiante (22 °C ± 5 °C). |
| c) Kit/composants périmés | Veiller à utiliser le kit avant la date d'expiration. Faire en sorte que l'étalon reconstitué et le conjugué concentré 100x soient utilisés dans les 3 mois suivant la date de reconstitution. |
| d) La solution de substrat enzymatique est contaminée | Jeter le substrat en cas de coloration bleue. Vérifier la propreté des réservoirs de réactifs. |

Courbe d'étalonnage non linéaire et variabilité des duplicats

Cause possible

Solution

- | | |
|---|--|
| a) Lavage insuffisant de la plaque | Laver la plaque au moins 6 fois avec 400 µl de tampon de lavage par puits. Plus de 6 cycles de lavage peuvent s'avérer nécessaires en fonction du laveur utilisé. Un temps de trempage d'au moins 5 secondes doit être utilisé entre chaque cycle. |
| b) Erreur de dilution de l'étalon | Vérifier que les dilutions de l'étalon sont préparées correctement et conformément à cette notice. |
| c) Mélange insuffisant | Mélanger soigneusement les réactifs par inversion ou en les vortexant doucement avant de les ajouter à la microplaque. |
| d) Technique de pipetage irrégulière ou interruption pendant la mise en place du dosage | L'ajout des échantillons et des étalons doit être effectué de manière continue. Tous les réactifs doivent être préparés avant le début du dosage. |

Les informations sur les produits et les guides techniques sont disponibles gratuitement auprès de QIAGEN, par l'intermédiaire de votre distributeur ou sur le site www.QuantiFERON.com.

Références

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

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

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

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

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

-
45. Long, G., Ji-Chun, M., Min, Jin-Long, L., Jin-Hui, T. (2014) Interferon- γ release assay for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in children younger than 5 years: a meta-analysis. *Clin. Pediatr.* 53, 1255.
 46. Howley, M.M. et al. (2015) Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and tuberculin skin tests among immigrant children being screened for latent tuberculosis infection. *Ped. Infect. Dis.* 34, 35.
 47. Diel, R., Loddenkemper, R., Niemann, S., Meywald-Walter, K., and Nienhaus, A. (2011) Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon- γ release assay for developing active tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 88.
 48. Machingadaize, S. et al. (2012) Predictive value of recent QuantiFERON conversion for tuberculosis disease in adolescents. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186, 1051.
 49. Riazi, S. et al. (2012) Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children using interferon-gamma release assays (IGRAs). *Allergy Asthma Proc.* 33, 217.
 50. Lighter-Fisher, J. and Surette, A-M. (2012) Performance of an interferon-gamma release assay to diagnose latent tuberculosis infection during pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 119, 1088.
 51. Mathud, J.S. et al. (2014) Pregnancy differentially impacts performance of latent tuberculosis diagnostics in a high-burden setting. *PLoS ONE* 9, e92308.
 52. Hoffman, M. and Ravn, P. (2010) The use of interferon-gamma release assays in HIV-positive individuals. *Eur. Infect. Dis.* 4, 23.
 53. Cheallaigh, C.N. et al. (2013) Interferon gamma release assays for the diagnosis of latent TB infection in HIV-infected individuals in a low TB burden country. *PLoS ONE* 8, e53330.














-
54. Ramos, J. M. et al. (2012) Contribution of interferon gamma release assays testing to the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected patients: A comparison of QuantiFERON-TB gold in tube, T-SPOT.TB and tuberculin skin test. *BMC Infect. Dis.* 12, 169.
 55. Wolf, T. et al. (2013) Tuberculosis skin test, but not interferon- γ releasing assays is affected by BCG vaccination in HIV patients. *J. Infect.* 66, 376.
 56. Hsia, E.C. et al. (2012) Interferon- γ release assay versus tuberculin skin test prior to treatment with golimumab, a human anti-tumor necrosis factor antibody, in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, or ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 64, 2068.
 57. Garcovich, S. et al. (2012) Clinical applicability of QuantiFERON-TB-Gold testing in psoriasis patients during long-term anti-TNF-alpha treatment: a prospective, observational study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Ven.* 26, 1572.
 58. Kwakernaak, A.J. et al. (2011) A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor α inhibitor. *Clin. Rheumatol.* 30, 505.
 59. Vinton, P. et al. (2009) Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and tuberculin skin test for identification of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthcare staff and association between positive test results and known risk factors for infection. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30, 215.
 60. de Perio, M.A., Tsevat, J., Roselle, G.A., Kralovic, S.M., and Eckman, M.H. (2009) Cost-effectiveness of interferon gamma release assays vs tuberculin skin tests in health care workers. *Arch. Intern. Med.* 169, 179.

61. Nienhaus, A. et al. (2008) Evaluation of the interferon- γ release assay in healthcare workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 81, 295.
62. Nienhaus, A. et al. (2011) Systematic review of cost and cost-effectiveness of different TB-screening strategies. *BMC Health Serv. Res.* 11, 247.
63. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Updated guidelines for using interferon-gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection – United States, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* 59 (RR-5), 1.
64. Dorman, S.E. et al. (2014) Interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 77.
65. Fong, K.S. et al. (2012) Challenges of interferon-gamma release assay conversions in serial testing of health care workers in a tuberculosis control program. *Chest* 142, 55.
66. Thanassi, W. et al. (2012) Delineating a retesting zone using receiver operating characteristic analysis on serial QuantiFERON tuberculosis test results in US healthcare workers. *Pulm. Med.* doi: 10.1155/2012/291294. Epub.
67. Behrman, A. et al. (2013) Protecting Health Care Workers from Tuberculosis, 2013: ACOEM Medical Center Occupational Health Section Task Force on Tuberculosis and Health Care Workers. *J. Occup. Environ. Med.* 55, 985.
68. Nienhaus, A., Ringshausen, F.C., Costa, J.T, Schablon, A., and Tripodi, D. (2013) IFN- γ release assay versus tuberculin skin test for monitoring TB infection in healthcare workers. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 11, 37.
69. Arend, S.M. et al. (2007) Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing TB contact. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 618.

-
70. Mandalakas, A.M., Detjen, A.K., Hesselning, A.C., Benedetti, A., and Menzies, D. (2011) Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15, 1018.
71. Grinsdale, J.A., Ho, C.S., Banouvong, H., Kwamura, L.M. (2011) Programmatic impact of using QuantiFERON-TB Gold in routine contact investigation activities. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15, 1614.
72. Walsh, M.C. et al. (2011) Sensitivity of interferon- γ release assays is not compromised in tuberculosis patients with diabetes. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15, 179.
73. Faurholt-Jespersen, D. et al. (2014) Diabetes is associated with lower tuberculosis antigen-specific interferon gamma release in Tanzanian tuberculosis patients and non-tuberculosis controls. *Scand. J. Infect. Dis.* 46, 384.
74. Painter, J.A. et al. (2013) Tuberculosis screening by tuberculosis skin test or QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay among an immigrant population with a high prevalence of tuberculosis and BCG vaccination. *PLoS ONE* 8, e82727.
75. Rogerson, T.E. et al. (2012) Tests for latent tuberculosis in people with ESRD: a systematic review. *Amer. J. Kidney Dis.* 61, 33.
76. Pareek, M. et al. (2013) Community-based evaluation of immigrant tuberculosis screening using interferon γ release assays and tuberculin skin testing: observational study and economic analysis. *Thorax.* 68, 230.
77. CDC, Tuberculosis — United States, 2018.
https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/mm6811a2.htm?s_cid=mm6811a2_w
Accessed 22 March 2019.

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l'emballage et les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
 2 x 96	En quantité suffisante pour 2 x 96 préparation d'échantillons
	Fabricant légal
	Symbole de la certification CE-IVD
	Pour utilisation diagnostique in vitro
	Code de lot
	Numéro de référence
	Code article international (Global Trade Item Number, GTIN)
	À utiliser avant le
	Limite de température
	Consulter le mode d'emploi
	Ne pas réutiliser
	Conserver à l'abri de la lumière directe du soleil
	Référence produit
Rn	R désigne une révision du mode d'emploi et n représente le numéro de révision

Coordonnées

Pour bénéficier d'une assistance technique et obtenir plus d'informations, appeler le numéro gratuit 00-800-22-44-6000, consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/contact ou contacter l'un des Services techniques de QIAGEN (voir quatrième de couverture ou visiter le site www.qiagen.com).

Résumé de la procédure du test

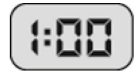
Étape 1 : incubation du sang

1. Prélever le sang du patient dans les tubes de prélèvement sanguin et les mélanger en les agitant dix (10) fois suffisamment fort pour s'assurer que toute la paroi interne du tube est enduite de sang. Cela permet de dissoudre les antigènes sur les parois du tube.
2. Incuber les tubes en position verticale à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 16 à 24 heures.
3. Après incubation, centrifuger les tubes pendant 15 minutes avec une FCR de 2 000 à 3 000 g pour séparer le plasma et les globules rouges.
4. Après la centrifugation, éviter de mélanger le plasma par aspiration-refoulement avec la pipette ou par tout autre moyen avant de le collecter. Pendant l'ensemble de la procédure, prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel.



Étape 2 : IFN- γ ELISA

1. Amener les composants ELISA, à l'exception du conjugué concentré 100x, à température ambiante ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) pendant au moins 60 minutes.
2. Reconstituer l'étalon du kit à 8,0 UI/ml avec de l'eau distillée ou déionisée. Préparer quatre (4) dilutions de l'étalon.
3. Reconstituer le conjugué concentré 100x lyophilisé avec de l'eau distillée ou déionisée.



4. Préparer la concentration de travail du conjugué dans le diluant vert et ajouter 50 µl de cette solution dans tous les puits.



5. Ajouter 50 µl des échantillons de plasma de test et 50 µl des étalons dans les puits appropriés. Mélanger avec l'agitateur.

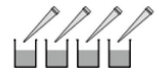
6. Incuber pendant 120 ± 5 minutes à température ambiante.



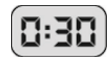
7. Laver les puits au moins 6 fois avec 400 µl de tampon de lavage par puits.



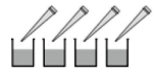
8. Ajouter 100 µl de solution de substrat enzymatique aux puits. Mélanger avec l'agitateur.



9. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.



10. Ajouter 50 µl de solution d'arrêt de la réaction enzymatique dans tous les puits. Mélanger avec l'agitateur.



11. Lire les résultats à 450 nm avec un filtre de référence de 620 à 650 nm.



12. Analyser les résultats.



Changements significatifs

Section	Page	Changements
Diverses	Diverses	Ajout des instructions relatives à l'utilisation d'un tube d'héparine de lithium ou d'héparine de sodium
Diverses	Diverses	Ajout des instructions relatives à la procédure de prélèvement sanguin à 2–8 °C
Diverses	Diverses	Le couvercle de microplaque fait désormais partie des matériels requis, mais non fournis

Historique des versions de la notice

Document	Changements
R6 04/2019	Modifications relatives à l'héparine de lithium/sodium Nouvelles instructions pour la procédure de prélèvement sanguin à 2–8 °C Couvercles de microplaque retirés des microplaques QF

Marques commerciales : QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (Groupe QIAGEN) ; Microsoft®, Excel® (Microsoft) ; ProClin® (Roehm and Haas Co.).

Contrat de licence limitée pour QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à cette notice et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit et cette notice.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus, sauf mention contraire de QIAGEN.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de ce contrat de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais d'investigation et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de ce contrat de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir le site www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, tous droits réservés.

www.QuantiFERON.com

Asie-Pacifique | techservice-ap@qiagen.com

Europe | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Moyen-Orient/Afrique | techserviceQFT-eu@qiagen.com

Amérique latine (hors Brésil et Mexique) | techservice-latam@qiagen.com

Remarques

Remarques

