

# Bula do QuantiFERON®-TB Gold (QFT®)

## ELISA



2 x 96 (ref.º 0594-0201)



20 x 96 (ref.º 0594-0501)

As respostas de medição de teste de sangue total IFN- $\gamma$  para os antígenos péptidos ESAT-6, CFP-10, e TB7.7(p4)



Para utilização em diagnóstico *in vitro*



0594-0201, 0594-0501

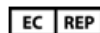


Cellestis, QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148 Austrália

Telefone: (Austrália) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden, ALEMANHA

1075115PT Rev. 01



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





# Índice

<b>1. Utilização prevista</b>	<b>4</b>
<b>2. Resumo e explicação do teste</b>	<b>4</b>
Princípios do ensaio	5
Tempo necessário para execução do ensaio	5
<b>3. Componentes e armazenamento</b>	<b>6</b>
Materiais necessários mas não fornecidos	7
Armazenamento e manuseamento	8
<b>4. Advertências e precauções</b>	<b>9</b>
Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>	9
Advertências	9
Precauções	10
<b>5. Colheita e manuseamento de amostras</b>	<b>11</b>
<b>6. Indicações de utilização</b>	<b>13</b>
Etapa 1 — Incubação do sangue e colheita do plasma	13
Etapa 2 — ELISA IFN- $\gamma$ humano	14
<b>7. Cálculos e interpretação de testes</b>	<b>18</b>
Geração de curva padrão	18
Controlo de qualidade do teste	18
<b>8. Limitações</b>	<b>21</b>
<b>9. Características de desempenho</b>	<b>21</b>
Estudos clínicos	21
<b>10. Informações técnicas</b>	<b>24</b>
Resultados indeterminados	24
Amostras de plasma coaguladas	24
Guia de resolução de problemas	25
<b>11. Bibliografia</b>	<b>27</b>
<b>12. Assistência técnica</b>	<b>29</b>
<b>13. Procedimento abreviado do teste</b>	<b>30</b>
Etapa 1 — incubação do sangue	30
Etapa 2 — ELISA IFN- $\gamma$	30
Alterações significativas	32

# 1. Utilização prevista

O QuantiFERON-TB Gold (QFT®) é um teste de diagnóstico *in vitro* que usa um cocktail de péptidos que simula as proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4) para estimular células em sangue total heparinizado. A detecção do interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizada para identificar respostas *in vitro* aos antígenos péptidos associados com a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

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

# 2. Resumo e explicação do teste

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por infecção por organismos do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), que tipicamente se espalha para novos hospedeiros através de núcleo de gotículas transportado por via aérea a partir de pacientes com tuberculose respiratória. Um indivíduo recém-infectado pode ficar doente com tuberculose em poucas semanas ou meses, mas a maioria dos indivíduos infectados permanece bem. A infecção tuberculosa latente (LTBI), uma doença não infecciosa assintomática, persiste em alguns, que poderão desenvolver tuberculose meses ou anos mais tarde. O principal objectivo de diagnosticar LTBI é o de considerar tratamento médico para prevenir a tuberculose. Até há pouco tempo, o teste cutâneo de tuberculina (TST) era o único método disponível para diagnosticar a LTBI. A sensibilidade cutânea à tuberculina desenvolve-se entre 2 a 10 semanas após a infecção. Contudo, alguns indivíduos infectados, incluindo aqueles com uma série de patologias que prejudiquem as funções imunitárias, mas também outros que não as tenham, não respondem à tuberculina. Por outro lado, alguns indivíduos com baixa probabilidade de estarem infectados com *M. tuberculosis* apresentam sensibilidade à tuberculina e denotam TST positivo após a vacinação com o bacilo Calmette-Guérin (BCG), infecção com outra micobactéria que não do complexo *M. tuberculosis*, ou por outros factores indeterminados.

Deve distinguir-se a LTBI da tuberculose, uma doença de notificação obrigatória que normalmente envolve os pulmões e o tracto respiratório inferior, embora outros órgãos também possam ser afectados. A tuberculose é diagnosticada através de achados de historial clínico, físicos, radiológicos, histológicos e micobacterianos.

O QFT é um teste de respostas imunitárias mediadas por células (CMI) a antígenos péptidos que simulam proteínas micobacterianas. Estas proteínas, ESAT-6, CFP-10, e TB7.7(p4), estão ausentes em todas as estirpes de BCG e na maioria das micobactérias não tuberculosas, com a excepção de *M. kansasii*, *M. szulgai*, e *M. marinum*.<sup>(1)</sup> Normalmente, os indivíduos infectados com organismos do complexo *M. tuberculosis* possuem linfócitos no sangue que reconhecem estes e outros antígenos micobacterianos. Este processo de reconhecimento envolve a produção e secreção da citocina IFN- $\gamma$ . A detecção e subsequente quantificação de IFN- $\gamma$  forma a base deste teste.

Os antígenos utilizados no QFT são um cocktail de péptidos que simula as proteínas ESAT-6, CFP-10, e TB7.7(p4). Vários estudos demonstram que estes antígenos péptidos estimulam a resposta de IFN- $\gamma$  nas células-T de indivíduos infectados com *M. tuberculosis*, mas, normalmente não em pessoas não infectadas ou vacinadas com BCG, sem a doença ou risco de LTBI.<sup>(1–32)</sup> Porém, os tratamentos médicos ou as doenças que prejudicam as funções imunitárias podem potencialmente reduzir as respostas de IFN- $\gamma$ . Os pacientes com certas infecções micobacterianas poderão também responder a ESAT-6, CFP-10, e TB7.7(p4), uma vez que os genes que codificam essas proteínas

estão presentes em *M. kansasii*, *M. szulgai*, e *M. marinum*.(1, 23) O teste QFT é um teste de LTBI e uma ajuda útil para diagnosticar uma infecção do complexo *M. tuberculosis* em pacientes doentes. Um resultado positivo suporta o diagnóstico de tuberculose, mas infecções por outra micobactéria (por ex., *M. kansasii*) podem também levar a resultados positivos. São necessárias outras avaliações clínicas ou de diagnóstico para confirmar ou excluir a tuberculose.

## Princípios do ensaio

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

O teste QFT é desempenhado em duas etapas. Em primeiro lugar, o sangue é colhido para cada um dos tubos de colheita sanguínea QFT, que incluem um tubo de Nil, um tubo de antígeno de TB e um tubo de mitógeno.

O tubo de mitógeno pode ser utilizado com o teste QFT como um controlo positivo. Isso poderá ser especialmente necessário caso existam dúvidas quanto ao estado imunitário do indivíduo. O tubo de mitógeno poderá também servir de controlo para um manuseamento e incubação correctos do sangue.

Os tubos devem, logo que possível, ser incubados a 37 °C após, no máximo, 16 horas depois da colheita. Após um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é removido e a quantidade de IFN- $\gamma$  (IU/ml) é medida pelo ELISA.

O teste é considerado positivo com uma resposta de IFN- $\gamma$  ao tubo de antígeno de TB que esteja significativamente acima do valor de Nil IFN- $\gamma$  IU/ml. Se utilizada, a amostra de plasma do tubo de mitógeno serve como um controlo positivo de IFN- $\gamma$  para cada amostra testada. Uma resposta baixa ao mitógeno (<0,5 IU/ml) indica um resultado indeterminado quando uma amostra sanguínea também tiver uma resposta negativa aos antígenos de TB. Este padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, actividade reduzida dos linfócitos devido a manuseamento inadequado da amostra, enchimento/mistura incorrecta do tubo de mitógeno ou incapacidade de os linfócitos do paciente gerarem IFN- $\gamma$ . A amostra de Nil ajusta-se aos efeitos de fundo dos anticorpos heterófilos ou do IFN- $\gamma$  não específico em amostras sanguíneas. O nível de IFN- $\gamma$  do tubo de Nil é subtraído ao nível de IFN- $\gamma$  do tubo de antígeno de TB e do de mitógeno (se utilizados).

## Tempo necessário para execução do ensaio

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

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

ELISA: Aprox. 3 horas para uma placa ELISA

(28 a 44 indivíduos)

<1 hora de trabalho

Adicione 10 a 15 minutos para cada placa extra

### 3. Componentes e armazenamento

<b>Blood Collection Tubes* (Tubos de colheita sanguínea)</b>	<b>300 tubos</b>	<b>200 tubos</b>	<b>100 tubos</b>
<b>Ref.<sup>a</sup></b>	<b>T0590-0301</b>	<b>0590-0201</b>	<b>T0593-0201</b>
<b>Número de preparações</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
QuantiFERON Nil Tube (tubo de Nil) (tampa cinzenta, anel branco)	100 tubos	100 tubos	
QuantiFERON TB Antigen Tube (tubo de antígeno de TB) (tampa vermelha, anel branco)	100 tubos	100 tubos	
QuantiFERON Mitogen Tube (tubo de mitógeno) (tampa púrpura, anel branco)	100 tubos		100 tubos
Bula dos tubos de colheita sanguínea QFT	1	1	1
<b>High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (tubos de colheita sanguínea de altitude elevada) (para utilização entre 1020 e 1875 metros)*</b>	<b>300 tubos</b>	<b>100 tubos</b>	<b>100 tubos</b>
<b>Ref.<sup>a</sup></b>	<b>T0590-0505</b>	<b>0590-0501</b>	<b>T0593-0501</b>
QuantiFERON HA Nil Tube (tubo de Nil) (tampa cinzenta, anel amarelo)	100 tubos	100 tubos	
QuantiFERON HA TB Antigen Tube (tubo de antígeno de TB) (tampa vermelha, anel amarelo)	100 tubos	100 tubos	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (tubo de mitógeno) (tampa púrpura, anel amarelo)	100 tubos		100 tubos
Bula dos tubos de colheita sanguínea QFT	1	1	1

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

<b>Componentes do ELISA</b>	<b>Kit ELISA de 2 placas</b>	<b>Pacote de referência de laboratório</b>
<b>Ref.<sup>a</sup></b>	<b>0594-0201</b>	<b>0594-0501</b>
Tiras de microplaca (12 x 8 poços) revestidos com anticorpo monoclonal de murino anti-humano IFN- $\gamma$	2 conjuntos de tiras de microplaca de 12 x 8 poços	20 conjuntos de tiras de microplaca de 12 x 8 poços
Human IFN- $\gamma$ Standard, lyophilized (Padrão IFN- $\gamma$ humano liofilizado) (contém IFN- $\gamma$ humano recombinante, caseína bovina, Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (8 IU/ml quando reconstituído)	10 x frasco (8 IU/ml quando reconstituído)
Green Diluent (Diluyente Verde) (contém caseína bovina, soro normal de rato, Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (Concentrado 100X de Conjugado liofilizado) (HRP de IFN- $\gamma$ murino anti-humano, contém Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x 0,3 ml (quando reconstituído)	10 x 0,3 ml (quando reconstituído)
Wash Buffer 20X Concentrate (Concentrado 20X de tampão de lavagem) (pH 7,2, contém fracção volúmica de 0,05% de ProClin <sup>®</sup> 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato de enzimas) (contém H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Tetrametilbenzidina 3,3', 5,5')	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de paragem de enzimas) (contém 0,5 M de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) <sup>†</sup>	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Bula do QFT ELISA	1	1

<sup>†</sup> Contém ácido sulfúrico. Consulte a página 10 para precauções.

## **Materiais necessários mas não fornecidos**

- Incubadora de 37 °C. CO<sub>2</sub> não necessário
- Pipetas de volume calibrado variável para fornecimento de 10  $\mu$ l a 1000  $\mu$ l com pontas descartáveis
- Pipetas calibradas multicanal com capacidade para fornecer entre 50  $\mu$ l e 100  $\mu$ l com pontas descartáveis
- Agitador de microplacas
- Água desionizada ou destilada, 2 litros
- Lavadora de microplacas (recomendada lavadora automática)
- Leitor de microplacas equipado com filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 a 650 nm

## Armazenamento e manuseamento

### Tubos de colheita sanguínea

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

### Reagentes do kit

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

### Reagentes reconstituídos e não utilizados

Para instruções sobre como reconstituir os reagentes, consulte a Secção 6 (página 14)

- O padrão reconstituído do kit pode ser guardado durante 3 meses, se a temperatura for de 2 a 8 °C.  
Anote a data na qual o padrão do kit foi reconstituído.
- Uma vez reconstituído, o Concentrado 100X de Conjugado não utilizado tem de ser novamente armazenado entre 2 e 8 °C e tem de ser utilizado no prazo de 3 meses.  
Anote a data na qual o conjugado foi reconstituído.
- O conjugado funcional tem de ser utilizado num prazo de 6 horas após a preparação.
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado a temperatura ambiente durante 2 semanas.



## 4. Advertências e precauções

### Para utilização em diagnóstico *in vitro*

#### Advertências

- Um resultado QFT negativo não exclui a possibilidade de infecção por *M. tuberculosis* ou de tuberculose: os falsos negativos podem ocorrer devido ao estágio da infecção (por ex., amostra obtida antes do desenvolvimento da resposta imunitária celular), comorbidade com doenças que afectam as funções imunitárias, manuseamento incorrecto dos tubos de colheita sanguínea após a punção venosa, execução incorrecta do ensaio, ou outras variáveis imunológicas.
- Um resultado QFT negativo não deve ser a base única ou definitiva para determinar a infecção por *M. tuberculosis*. A execução incorrecta do ensaio pode causar falsos positivos.
- Um resultado QFT positivo deve ser seguido por uma avaliação médica e diagnóstica mais aprofundada de tuberculose activa (por ex., esfregaço e cultura de Ácido-álcool resistência (AFB), radiografia ao peito).
- Embora as proteínas ESAT-6, CFP-10, e TB7.7(p4) estejam ausentes de todas as estirpes de BCG e da maioria das micobactérias não tuberculosas conhecidas, é possível que ocorra um resultado positivo devido à infecção por *M. kansasii*, *M. szulgai*, ou *M. marinum*. Se se suspeitar das referidas infecções, dever-se-ão investigar métodos alternativos.

## Precauções

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.

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



### **ATENÇÃO: Manuseie o sangue humano como sendo potencialmente infeccioso.**

Respeite as directrizes relevantes relativas ao manuseamento de sangue.

As seguintes frases de riscos e de segurança aplicam-se a componentes do QuantiFERON-TB Gold ELISA.

### **Solução de paragem de enzimas QuantiFERON**



Xi

Contém ácido sulfúrico: Irritante. Frases de risco e de segurança:\* R36/38, S26-36/37/39

- O **Diluyente Verde** contém soro normal e caseína de rato, que podem desencadear reacções alérgicas; evitar o contacto com a pele.

### **Para emergências médicas**

#### **Derrame, fuga, exposição ou acidente**

Contacte a CHEMTREC a qualquer hora

Nos EUA e no Canadá: 1-800-424-9300

Fora dos EUA e do Canadá: +1-703-527-3887 (aceites chamadas a cobrar no destino)

### **Informações adicionais**

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

- Divergências em relação à *bula do QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA* podem produzir resultados errados. Leia as instruções cuidadosamente antes da utilização.
- Não utilize o kit se qualquer um dos frascos de reagente apresentar sinais de dano ou fuga antes da utilização.
- Não misture nem utilize as tiras de microplaca, o IFN- $\gamma$  humano padrão, o Diluyente Verde, ou o Concentrado 100X de Conjugado de diferentes lotes de kits QFT. Os outros reagentes (Concentrado 20X de tampão de lavagem, solução de substrato de enzimas e solução de paragem de enzimas) podem ser trocados entre kits contanto que os reagentes estejam dentro do seu período de validade e que os detalhes do lote sejam registados. Elimine os reagentes e amostras biológicas não utilizados em conformidade com a legislação em vigor.

\* R36/38: Irritante para os olhos e pele; S26: Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista; S36/37/39: Usar vestuário de protecção e equipamento protector para os olhos/face adequados.

- Não utilize os tubos de colheita sanguínea nem o kit ELISA após a data de validade.
- Certifique-se de que o equipamento laboratorial, tal como as lavadoras e os leitores de placas, se encontra calibrado/homologado para utilização.

## 5. Colheita e manuseamento de amostras

○ QFT utiliza os seguintes tubos de colheita:

1. Tubos de Nil QuantiFERON (tampa cinzenta com anel branco; utilizar entre o nível do mar e os 810 m de altitude)
2. Tubos antigénio de TB QuantiFERON (tampa vermelha com anel branco; utilizar entre o nível do mar e os 810 m de altitude)
3. Tubos de mitógeno QuantiFERON (tampa púrpura com anel branco; utilizar entre o nível do mar e os 810 m de altitude)

Tubos de altitude elevada (HA):

4. Tubos de Nil QuantiFERON HA (tampa cinzenta com anel amarelo; utilizar entre os 1020 e os 1875 m de altitude)
5. Tubos de antigénio de TB QuantiFERON HA (tampa vermelha com anel amarelo; utilizar entre os 1020 e os 1875 m de altitude)
6. Tubos de mitógeno QuantiFERON HA (tampa púrpura com anel amarelo; utilizar entre os 1020 e os 1875 m de altitude)

Os antigénios foram desidratados e afixados à parede interna dos tubos de colheita sanguínea, de modo que é essencial que o conteúdo dos tubos seja bem misturado com o sangue. Os tubos devem, logo que possível, ser transferidos para uma incubadora a 37 °C após, no máximo, 16 horas depois da colheita

**Para obter resultados ideais, devem ser respeitados os seguintes procedimentos:**

1. **Colha 1 ml de sangue por indivíduo através de punção venosa directamente para dentro de cada um dos tubos de colheita sanguínea QFT. Este procedimento deve ser desempenhado por um flebotomista qualificado.**
  - Os tubos de colheita sanguínea QFT padrão devem ser utilizados até uma altitude de 810 m. Os tubos de colheita sanguínea QFT de altitude elevada (HA) devem ser utilizados em altitudes entre os 1020 e os 1875 m.
  - Se utilizar os tubos de colheita sanguínea QFT fora destes intervalos de altitude, ou se ocorrer um baixo volume de colheita sanguínea, é possível colher sangue utilizando uma seringa, transferindo imediatamente 1 ml para cada um dos três tubos. Por razões de segurança, recomenda-se executar este procedimento removendo a agulha da seringa, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo as tampas dos 3 tubos QFT e adicionando 1 ml de sangue a cada um (até à marca preta na parte lateral do rótulo do tubo). Volte a colocar as tampas em segurança e misture conforme descrito em baixo.

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

A marca negra na parte lateral do tubo indica o volume de 1 ml. Os tubos de colheita sanguínea QFT estão homologados para volumes entre 0,8 e 1,2 ml. Se o nível de sangue em qualquer tubo estiver próximo da linha indicativa, recomendamos que colha uma nova amostra de sangue.

- Se for utilizada uma agulha escalpe para colher sangue, deve ser utilizado um tubo de “purga” para garantir que a tubagem é enchida com sangue antes da utilização dos tubos QFT.
- Em alternativa, o sangue pode ser colhido num único tubo genérico para colheita de sangue contendo heparina de lítio como anticoagulante e, em seguida, transferido para os tubos QFT. **Utilize apenas a heparina de lítio** como anticoagulante sanguíneo, uma vez que os outros anticoagulantes interferem com o ensaio. Encha um tubo de colheita sanguínea (volume mínimo de 5 ml) e misture suavemente invertendo o tubo várias vezes para dissolver a heparina. O sangue deve ser conservado à temperatura ambiente ( $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ) antes de ser transferido para os tubos QFT para incubação, que **tem de ser** iniciada no máximo 16 horas após a colheita do sangue.

## 2. **Agite os tubos dez (10) vezes imediatamente após os encher de forma a garantir que toda a superfície interna do tubo fica revestida de sangue, para dissolver os antigénios da parede do tubo.**

- Os tubos devem encontrar-se a uma temperatura entre 17 e 25 °C aquando do enchimento.
- Uma agitação demasiado energética poderá causar ruptura do gel e levar a resultados anómalos.
- Se o sangue tiver sido colhido num tubo de heparina, as amostras devem ser bem misturadas antes de transferir para os tubos QFT. Certifique-se de que o tubo é bem misturado invertendo-o suavemente **imediatamente antes da transferência**. Transfira alíquotas de 1,0 ml (uma por tubo QFT) para o tubo de Nil, de antigénio de TB e de mitógeno adequado. Recomenda-se a execução em condições assépticas, **assegurando os procedimentos de segurança adequados**, removendo as tampas dos três tubos QFT e adicionando 1 ml de sangue a cada um (até à marca preta na parte lateral do rótulo do tubo). Volte a colocar as tampas dos tubos em segurança e misture conforme descrito em cima.

## 3. **Rotule os tubos adequadamente.**

- Certifique-se de que cada um dos tubos (Nil, Antigénio de TB, Mitógeno) é identificável pelo rótulo ou por outro meio após remoção da tampa.

## 4. **Após o enchimento, a agitação e a rotulagem, os tubos devem, logo que possível, ser transferidos para uma incubadora a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ após, no máximo, 16 horas depois da colheita. Antes da incubação, conserve os tubos à temperatura ambiente ( $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ). Não refrigerar ou congelar as amostras sanguíneas.**

## 6. Indicações de utilização

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

#### Materiais fornecidos

- Tubos de colheita sanguínea QFT (consulte a Secção 3).

#### Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Consulte a Secção 3.

#### Procedimento

1. **Se o sangue não for incubado imediatamente após a colheita, é necessário efectuar uma nova mistura dos tubos, invertendo-os 10 vezes, antes da incubação.**
2. **Incubar os tubos na VERTICAL a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de  $\text{CO}_2$ , nem de humedificação.**
3. **Após a incubação a  $37\text{ °C}$ , os tubos de colheita sanguínea poderão ser mantidos entre  $4\text{ °C}$  e  $27\text{ °C}$  durante até 3 dias antes da centrifugação.**
4. **Após a incubação dos tubos a  $37\text{ °C}$ , a colheita é facilitada centrifugando os tubos durante 15 minutos entre 2000 a 3000 RCF (g). O tampão de gel separará as células do plasma. Caso isso não ocorra, dever-se-á centrifugar novamente os tubos a uma velocidade superior.**
  - É possível colher o plasma sem centrifugação, mas são necessários cuidados adicionais para remover o plasma sem perturbar as células.
5. **As amostras de plasma apenas devem ser colhidas utilizando uma pipeta.**
  - **Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.**
  - As amostras de sangue podem ser carregadas directamente dos tubos de colheita sanguínea centrifugados para dentro da placa QFT ELISA, inclusive quando forem utilizadas as estações de trabalho automatizadas ELISA.
  - As amostras de plasma podem ser armazenadas durante 28 dias a uma temperatura entre  $2\text{ e }8\text{ °C}$  ou, se colhidas, inferior a  $-20\text{ °C}$  para períodos mais prolongados.
  - Para obter amostras de teste adequadas, colha, no mínimo  $150\text{ }\mu\text{l}$  de plasma.

## Etapa 2 — ELISA IFN- $\gamma$ humano

### Materiais fornecidos

- Kit QFT ELISA (consulte a Secção 3).

### Materiais necessários mas não fornecidos

- Consulte a Secção 3.

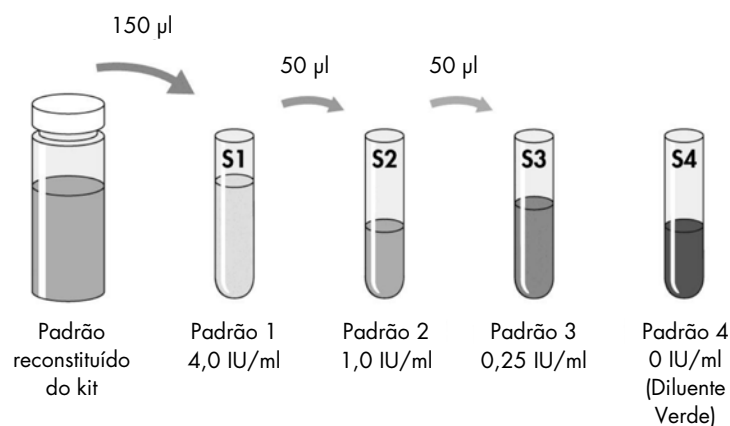
### Procedimento

1. **Todas as amostras de plasma e reagentes, excepto o Concentrado 100X de Conjugado, têm de ser colocados à temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) antes de utilizados. Aguarde, no mínimo, 60 minutos para alcançar o equilíbrio térmico.**
2. **Remova da estrutura as tiras que não sejam necessárias, sele a bolsa de folha de alumínio e volte a colocar no frigorífico para armazenar até ser necessária.**  
Deixe pelo menos 1 tira para os padrões QFT e tiras suficientes para o número de indivíduos a ser testados (consulte as Figuras 2A e 2B para os formatos de 3 e de 2 tubos, respectivamente). Após a utilização, conserve a estrutura e a tampa para utilizar com as tiras restantes.
3. **Reconstitua o padrão liofilizado do kit com o volume de água desionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco de padrão. Misture suavemente para minimizar a espuma e para garantir a solubilização completa. A reconstituição do padrão com o volume declarado produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 IU/ml.**

**Nota:** O volume de reconstituição do padrão do kit será diferente de lote para lote.

Utilize o padrão reconstituído do kit para produzir uma série de diluição 1 em 4 de IFN- $\gamma$  em Diluente Verde (GD) (consulte a Figura 1). P1 (Padrão 1) contém 4 IU/ml, P2 (Padrão 2) contém 1 IU/ml, P3 (Padrão 3) contém 0,25 IU/ml, e P4 (Padrão 4) contém 0 IU/ml (apenas GD). Os padrões devem ser testados, pelo menos, em duplicado.

Procedimento recomendado para padrões em duplicado	Procedimento recomendado para padrões em triplicado
a. Rotule os 4 tubos "P1", "P2", "P3", "P4".	a. Rotule os 4 tubos "P1", "P2", "P3", "P4".
b. Adicionar <b>150 <math>\mu</math>l</b> de GD a P1, P2, P3, P4.	b. Adicionar <b>150 <math>\mu</math>l</b> de GD a P1.
c. Adicionar <b>150 <math>\mu</math>l</b> do padrão do kit a P1 e misturar bem.	c. Adicionar <b>210 <math>\mu</math>l</b> de GD a P2, P3, P4.
d. Transferir <b>50 <math>\mu</math>l</b> de P1 para P2 e misturar bem.	d. Adicionar <b>150 <math>\mu</math>l</b> do padrão do kit a P1 e misturar bem.
e. Transferir <b>50 <math>\mu</math>l</b> de P2 para P3 e misturar bem.	e. Transferir <b>70 <math>\mu</math>l</b> de P1 para P2 e misturar bem.
f. <b>Apenas GD</b> serve como padrão zero (P4).	f. Transferir <b>70 <math>\mu</math>l</b> de P2 para P3 e misturar bem.
	g. <b>Apenas GD</b> serve como padrão zero (P4).



**Figura 1. Preparação de curva padrão.** Prepare novas diluições do padrão do kit para cada sessão do ELISA.

**4. Reconstitua o Concentrado 100X de Conjugado liofilizado com 0,3 ml de água desionizada ou destilada. Misture suavemente para minimizar a espuma e para garantir a solubilização completa do conjugado.**

O conjugado funcional é preparado diluindo a quantidade necessária de Concentrado 100X de Conjugado reconstituído em Diluyente Verde, conforme estabelecido na Tabela 1 – Preparação de conjugado.

**Tabela 1. Preparação de conjugado**

Número de tiras	Volume de Concentrado de conjugado 100X	Volume de Diluyente Verde
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

- Misture bem mas suavemente para evitar fazer espuma.
- Volte a colocar qualquer Concentrado 100X de Conjugado não utilizado entre 2 e 8 °C imediatamente após a utilização.
- Utilize apenas Diluyente Verde.

5. **Relativamente às amostras de plasma colhidas dos tubos de colheita sanguínea e subsequentemente congeladas ou armazenadas durante mais de 24 horas antes do ensaio, misture-as bem antes de adicionar ao poço ELISA.**
  - Se pretender adicionar as amostras de plasma directamente a partir dos tubos QFT centrifugados, deve evitar misturar, de modo algum, o plasma.
6. **Adicione 50 µl de conjugado funcional recém-preparado aos poços ELISA necessários utilizando uma pipeta multicanal.**
7. **Adicione 50 µl de amostra de plasma para teste aos poços adequados utilizando uma pipeta multicanal (consulte o esquema recomendado da placa na página 16, Figuras 2A e 2B). Por fim, adicione 50 µl a cada um dos Padrões 1 a 4.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1N	1A	1M	P1	P1	P1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
<b>B</b>	2N	2A	2M	P2	P2	P2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
<b>C</b>	3N	3A	3M	P3	P3	P3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
<b>D</b>	4N	4A	4M	P4	P4	P4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
<b>E</b>	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
<b>F</b>	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
<b>G</b>	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
<b>H</b>	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

**Figura 2A. Esquema recomendado das amostras dos tubos de Nil, antígeno de TB, e mitógeno (28 testes por placa).**

- P1 (Padrão 1), P2 (Padrão 2), P3 (Padrão 3), P4 (Padrão 4)
- 1N (Amostra 1. plasma de Nil), 1A (Amostra 1. plasma de antígeno de TB), 1M (Amostra 1. plasma de mitógeno)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1N	5N	9N	13N	17N	P1	P1	25N	29N	33N	37N	41N
<b>B</b>	1A	5A	9A	13A	17A	P2	P2	25A	29A	33A	37A	41A
<b>C</b>	2N	6N	10N	14N	18N	P3	P3	26N	30N	34N	38N	42N
<b>D</b>	2A	6A	10A	14A	18A	P4	P4	26A	30A	34A	38A	42A
<b>E</b>	3N	7N	11N	15N	19N	21N	23N	27N	31N	35N	39N	43N
<b>F</b>	3A	7A	11A	15A	19A	21A	23A	27A	31A	35A	39A	43A
<b>G</b>	4N	8N	12N	16N	20N	22N	24N	28N	32N	36N	40N	44N
<b>H</b>	4A	8A	12A	16A	20A	22A	24A	28A	32A	36A	40A	44A

**Figura 2B. Esquema recomendado das amostras dos tubos de Nil e de antígeno de TB (44 testes por placa).**

- P1 (Padrão 1), P2 (Padrão 2), P3 (Padrão 3), P4 (Padrão 4)
- 1N (Amostra 1. plasma de Nil), 1A (Amostra 1. plasma de antígeno de TB)



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

Poços de lavagem com **400  $\mu\text{l}$**  de tampão de lavagem funcional para pelo menos 6 ciclos. Recomenda-se uma lavadora de placas automática.

  - Uma lavagem exaustiva é muito importante para o desempenho do ensaio. Certifique-se de que cada um dos poços está **completamente cheio** com tampão de lavagem até ao topo do poço em cada um dos ciclos de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo.
  - Deve ser adicionado desinfectante normal de laboratório ao reservatório efluente, e devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.
11. **Bata nas placas, viradas para baixo sobre uma toalha absorvente e sem fiapos, para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100  $\mu\text{l}$  de solução de substrato de enzimas e misture bem, utilizando um agitador de microplacas.**
12. **Cubra cada placa com uma tampa e incube à temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos.**
  - Durante a incubação, as placas não devem estar expostas a luz solar directa.
13. **Após os 30 minutos de incubação, adicione 50  $\mu\text{l}$  de solução de paragem de enzimas a cada um dos poços e misture.**
  - A solução de paragem de enzimas deve ser adicionada aos poços na mesma ordem e, aproximadamente, à mesma velocidade que o substrato no passo 11.
14. **Meça a absorvância (OD) de cada poço até no máximo 5 minutos após a paragem da reacção utilizando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e um filtro de referência de 620 a 650 nm. Os valores de OD são utilizados para calcular os resultados.**

## 7. Cálculos e interpretação de testes

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

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

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

### Geração de curva padrão

#### (se o software de análise QFT não for utilizado)

Determine os valores médios de OD das réplicas de padrão de kit de cada placa.

Construa uma curva padrão de  $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$  traçando o  $\log_{(e)}$  da OD média (eixo-y) de encontro ao  $\log_{(e)}$  da concentração de IFN- $\gamma$  dos padrões em IU/ml (eixo-x), omitindo destes cálculos o padrão zero. Calcule a linha de melhor adequação da curva padrão através de análise de regressão.

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

Estes cálculos podem ser efectuados utilizando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas, e com software padrão de folha de cálculo ou estatístico (tal como o Microsoft® Excel®). Recomendamos que se utilize estes pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (%CV) dos padrões e o coeficiente de correlação (r) da curva padrão.

### Controlo de qualidade do teste

A exactidão dos resultados de teste está dependente da geração de uma curva padrão precisa. Por conseguinte, os resultados derivados dos padrões têm de ser examinados antes que os resultados da amostra de teste possam ser interpretados.

Para que o ELISA seja válido:

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

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

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

O valor de OD médio do Padrão Zero (Diluyente Verde) deve ser  $\leq 0,150$ . Se o valor de OD médio for  $> 0,150$ , o procedimento de lavagem da placa deverá ser investigado.

## Interpretação de resultados

Os resultados de QFT são interpretados utilizando os seguintes critérios:

Nota: Diagnosticar ou excluir a tuberculose, e avaliar a probabilidade de LTBI, requer uma combinação de achados epidemiológicos, de historial clínico, médicos e de diagnóstico que devem ser tidos em conta ao interpretar os resultados de QFT (tabelas 2 e 3).

**Tabela 2. Quando são utilizados tubos de Nil, de antígeno de TB e de mitógeno**

Nil (IU/ml)	Antígeno de TB menos Nil (IU/ml)	Mitógeno menos Nil (IU/ml)	Resultado de QFT	Relatório/Interpretação
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> IMPROVÁVEL
	≥ 0,35 e < 25% de valor de Nil	≥ 0,5	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> IMPROVÁVEL
	≥ 0,35 e ≥ 25% de valor de Nil	Qualquer	Positivo <sup>†</sup>	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> provável
	< 0,35	< 0,5	Indeterminado <sup>‡</sup>	Os resultados da capacidade de resposta do antígeno-TB são indeterminados
	≥ 0,35 e < 25% de valor de Nil	< 0,5	Indeterminado <sup>‡</sup>	Os resultados da capacidade de resposta do antígeno-TB são indeterminados
> 8,0 <sup>§</sup>	Qualquer	Qualquer	Indeterminado <sup>‡</sup>	Os resultados da capacidade de resposta do antígeno-TB são indeterminados

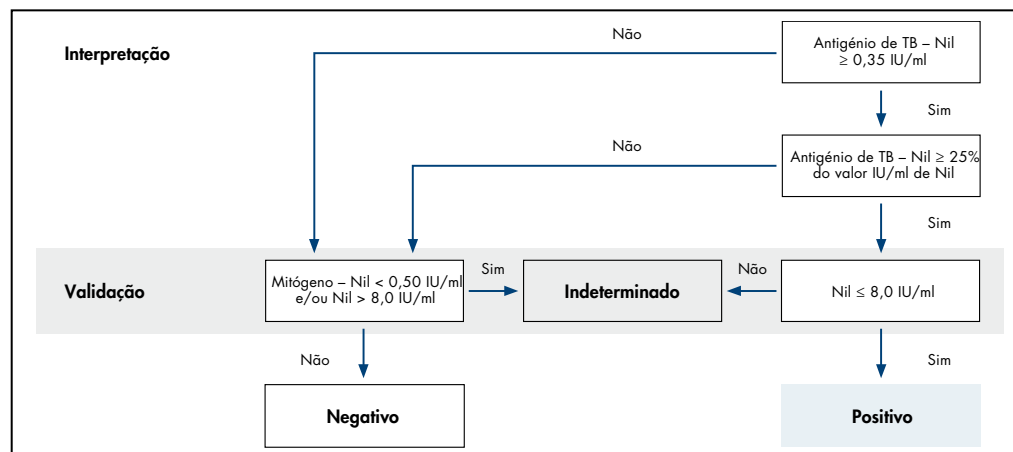
\* A respostas ao controlo positivo de mitógeno (e, ocasionalmente, de antígeno de TB) podem ficar fora do alcance do leitor de microplacas. Isso não tem qualquer impacto nos resultados do teste.

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

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

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

A magnitude do nível medido de IFN- $\gamma$  não pode ser correlacionada com o estágio ou grau de infecção, nível de capacidade de resposta imunitária ou com a probabilidade de progressão da doença activa.



**Figura 3.** Fluxograma interpretativo de quando são utilizados tubos de Nil, de antígeno de TB e de mitógeno.

**Tabela 3.** Quando apenas são utilizados os tubos de Nil e de antígeno de TB QuantiFERON

Nil (IU/ml)	Antígeno de TB menos Nil (IU/ml)	Resultado de QFT	Relatório/Interpretação
≤ 8,0	< 0,35	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> IMPROVÁVEL
	≥ 0,35 e < 25% de valor de Nil	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> IMPROVÁVEL
	≥ 0,35 e ≥ 25% de valor de Nil	Positivo*	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> provável
> 8,0 <sup>†</sup>	Qualquer	Indeterminado <sup>‡</sup>	Os resultados da capacidade de resposta do antígeno-TB são indeterminados

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

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

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

A magnitude do nível medido de IFN- $\gamma$  não pode ser correlacionada com o estágio ou grau de infecção, nível de capacidade de resposta imunitária ou com a probabilidade de progressão da doença activa.

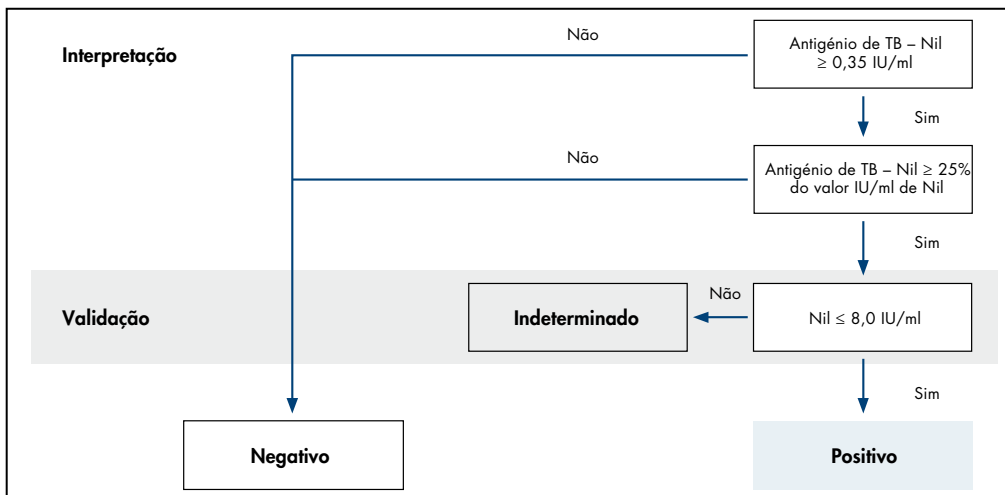


Figura 4. Fluxograma interpretativo de quando apenas são utilizados os tubos de Nil e de antígeno de TB.

## 8. Limitações

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

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

Podem ocorrer resultados duvidosos ou indeterminados devido a:

- Divergências em relação ao procedimento descrito na *bula do QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*
- Níveis excessivos de IFN- $\gamma$  em circulação ou presença de anticorpos heterófilos
- Mais de 16 horas entre a colheita da amostra sanguínea e a incubação a 37 °C

## 9. Características de desempenho

### Estudos clínicos

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

## Especificidade

No estudo dos EUA, que envolveu 866 voluntários, foi colhido sangue para QFT quando se efectuou um TST. As informações demográficas e os factores de risco de TB foram determinados utilizando um inquérito padrão aquando do teste. De 432 voluntários sem factores de risco de infecção por *M. tuberculosis* conhecidos, foram disponibilizados os resultados de QFT e de TST de 391. Nenhum deles estava vacinado com BCG. Foi levado a cabo um segundo estudo de especificidade com QFT em indivíduos de baixo risco no Japão, dos quais cerca de 90% estavam vacinados com BCG. Os resultados dos 2 estudos de especificidade são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4. Especificidade de QFT: Resultados de pessoas sem risco de infecção por *M. tuberculosis* relatado**

Estudo	Estado de BCG (% de vacinados)	Total testado	N.º QFT indeterminado	N.º QFT positivo / n.º de testes válidos	Especificidade de QFT (IC de 95%)	N.º TST positivo / n.º de testes	Especificidade de TST* (IC de 95%)
EUA (não publicado)	0%	391	1	3/390	99,2% (98–100)	6/391	98,5% (97-99)
Japão (15)	~90%	168	6	2/162	98,8% (95–100)	–	–
Total	–	559	7/559 (1,3%)	5/552	99,1% (98–100)	–	–

\* Utilizando limite de TST de 10 mm em pessoas não vacinadas com BCG. A estimativa de especificidade do TST é de 99,1% se for utilizado um limite de 15 mm.

## Sensibilidade de TB activa

Os suspeitos de tuberculose dos EUA, Austrália e Japão, que mais tarde se confirmou por cultura estarem infectados com *M. tuberculosis*, foram testados para avaliar a sensibilidade do QFT. Enquanto não existe um teste padrão definitivo para a infecção tuberculosa latente (LTBI), uma substituto adequado é a cultura microbiológica de *M. tuberculosis*, uma vez que os pacientes com a doença estão, por definição, infectados. Os pacientes haviam recebido menos de 8 dias de tratamento antes da colheita sanguínea para o teste QFT.

A Tabela 5 resume as descobertas em 3 grupos de paciente com cultura positiva de *M. tuberculosis*. A sensibilidade global de QFT para tuberculose activa foi de 89% (157/177).

**Tabela 5. QFT: Indivíduos com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura**

Estudo	N.º QFT positivo / n.º de testes válidos	Sensibilidade de QFT (IC de 95%)
Pacientes de TB japoneses (15)	86/92	93% (86–97%)
Australianos	24/27	89% (70–97%)
Norte-americanos	47/58	81% (68-90%)
Total	157/177	89% (83-93%)

## Diagnóstico de LTBI

Foi publicado um número de estudos que demonstram o desempenho de QFT em várias populações em risco de LTBI. Os principais achados de alguns dos estudos seleccionados são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6. Estudos publicados seleccionados sobre QFT em populações em risco de LTBI**

Estudo	Total testado	Resultados e achados
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Cenário com taxas de TB muito elevadas. 40% de QFT positivo e 41% de TST positivo a 10 mm. Elevada concordância com TST, nenhum efeito da vacina BCG em ambos os lados. Ambos os testes relacionados com factores de risco de idade e de tempo de serviço no sector da saúde.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	A prevalência global de LTBI por QFT foi de 4,6% (27/590) em pessoas com HIV+. Os resultados positivos estavam associados com os riscos de tuberculose. Dois indivíduos com QFT positivo progrediram para TB activa em menos de 1 ano. As respostas indeterminadas (n=20, 3,4%) estavam significativamente associadas com uma contagem de CD4 < 100/ $\mu$ l.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Foram testadas crianças de que havia suspeitas de TB ou que tinham um historial de contacto com TB, com QFT e TST; 10,5% de QFT positivo e 9,5% de TST positivo a 10 mm. A concordância entre os testes foi de 95,2% na totalidade e de 100% em não vacinados com BCG.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	Foram testados os contactos próximos de 15 casos referenciados diferentes: 51% estavam vacinados com BCG, 27% eram de origem estrangeira; 70% dos vacinados com BCG e 18% dos não vacinados tiveram TST positivo (5 mm), ao passo que 9% e 11% tiveram QFT positivo, respectivamente. QFT estava associado com risco de TB. TST estava apenas associado à vacinação com BCG.

Muitas mais publicações descrevem o desempenho da versão menos sensível de antígeno líquida de QuantiFERON-TB Gold (o precursor do QFT) e do teste QFT. Esses estudos incluem a utilização de teste(s) em contactos de casos de TB activa (9, 11, 19, 25), crianças (6–10, 25, 28), pacientes HIV-positivos (2, 5, 20), trabalhadores do sector da saúde (13, 26, 32), pacientes imunossuprimidos (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), assim como de suspeitos de TB (7, 8, 10, 18), e indivíduos de baixo risco (15).

### Repetibilidade e efeito de TST em testes QFT subsequentes

Como parte integrante do estudo de especificidade dos EUA, um subconjunto de voluntários foi novamente testado entre 4 a 5 semanas após os testes QFT e TST originais. Os resultados de QFT de 260 recrutados estavam disponíveis em ambos os momentos e o nível de concordância foi de 99,6% (259/260). Um TST anterior não induziu respostas de QFT positivas.

## 10. Informações técnicas

### Resultados indeterminados

Os resultados indeterminados deverão ser pouco comuns e podem estar relacionados com o estado imunitário do indivíduo testado, mas também com um número de factores técnicos:

- Mais de 16 horas entre a colheita sanguínea e a incubação a 37 °C
- Armazenamento do sangue fora do intervalo de temperaturas recomendado (17 °C a 27 °C)
- Mistura insuficiente dos tubos de colheita sanguínea
- Lavagem incompleta da placa ELISA

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

### Amostras de plasma coaguladas

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



## Guia de resolução de problemas

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

### Resolução de problemas ELISA

---

*Desenvolvimento cromático não específico*

#### Causa possível

- a) Lavagem incompleta da placa
- b) Contaminação cruzada dos poços ELISA
- c) O prazo de validade do kit/ componentes expirou
- d) A solução de substrato de enzimas está contaminada
- e) Mistura do plasma nos tubos QFT antes da colheita

#### Solução

- Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, em função da lavadora utilizada. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo.
- Tome cuidado ao pipetar e a misturar as amostras para minimizar os riscos.
- Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Concentrado 100X de Conjugado são utilizados antes de três meses após a data de reconstituição.
- Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos.
- Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.

*Leituras baixas da absorvância dos padrões*

#### Causa possível

- a) Erro de diluição do padrão
- b) Erro de pipetagem
- c) Temperatura de incubação demasiado baixa
- d) Tempo de incubação demasiado curto
- e) Utilizado um filtro de leitor de placas incorrecto
- f) Os reagentes estão demasiados frios

#### Solução

- Certifique-se de que as diluições do padrão do kit são preparadas correctamente conforme a bula do QFT ELISA.
- Certifique-se de que as pipetas estão calibradas e de que são utilizadas de acordo com as instruções do fabricante.
- A incubação do ELISA deve ser efectuada a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C)
- A incubação da placa com o conjugado, com os padrões e com as amostras deve durar 120 ± 5 minutos. A solução de substrato de enzimas é incubada na placa durante 30 minutos.
- A placa deve ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm.
- Todos os reagentes, exceptuando o Concentrado 100X de Conjugado, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isso leva, aproximadamente, uma hora.

## Resolução de problemas ELISA

---

- g) O prazo de validade do kit/componentes expirou
- Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Concentrado 100X de Conjugado são utilizados antes de 3 meses após a data de reconstituição.

### *Plano de fundo alto*

#### **Causa possível**

- a) Lavagem incompleta da placa
- Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, em função da lavadora utilizada. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo.
- b) Temperatura de incubação demasiado elevada
- A incubação do ELISA deve ser efectuada a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C).
- c) O prazo de validade do kit/componentes expirou
- Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Concentrado 100X de Conjugado são utilizados antes de 3 meses após a data de reconstituição.
- d) A solução de substrato de enzimas está contaminada
- Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos.

### *Curva padrão não linear e variabilidade de duplicados*

#### **Causa possível**

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

**Pode encontrar um vídeo do procedimento de ensaio e soluções para a maioria dos problemas técnicos na Gnowee™, registando-se directamente em [www.gnowee.net](http://www.gnowee.net) para acesso online. As informações dos produtos e os guias técnicos são disponibilizados gratuitamente pela QIAGEN, através do seu fornecedor, ou visitando [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).**

# 11. Bibliografia

Encontra uma lista exaustiva de referências de QFT na Gnowee — a biblioteca de referências QuantiFERON, disponível em [www.gnowee.net](http://www.gnowee.net).

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* **356**, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* **12**, 645.
3. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur. Respir. J.* **33**, 586.
4. Bocchino, M. et al. (2008) Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 907.
5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir. Res.* **7**, 56.
6. Chun, J.K. et al. (2008) The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**, 389.
7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* **3**, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.
8. Detjen, A.K. et al. (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 322.
9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* **135**, 1010.
10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN- $\gamma$  assay for the development of active TB disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 1164.
11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir. Res.* **7**, 77.
12. Dogra, S. et al. (2007) Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J. Infect.* **54**, 267.
13. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* **4**, e55.
14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology* **13**, 270.
15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J. Infect.* **56**, 348.
16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 33.
17. Kang, Y.A. et al. (2005) Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* **293**, 2756.
18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 1146.

19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss. Med. Wkly.* **138**, 267.
20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 737.
21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* **146**, 761.
22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am. J. Transplant.* **7**, 2797.
23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 84.
24. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 513.
25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. *Emerging Infect. Dis.* **12**, 1383.
26. Pai, M. et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA* **293**, 2746.
27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol.* **35**, 776.
28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur. Respir. J.* **32**, 524.
29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **3**, 981.
30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2799.
31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin. Biochem.* **40**, 913.
32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 681.

## 12. Assistência técnica

Para assistência técnica, contacte:

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

Asia-Pacific ■ [techservice-ap@qiagen.com](mailto:techservice-ap@qiagen.com)

Europe ■ [techserviceQFT-eu@qiagen.com](mailto:techserviceQFT-eu@qiagen.com)

Middle East/Africa ■ [techserviceQFT-eu@qiagen.com](mailto:techserviceQFT-eu@qiagen.com)

USA/Canada ■ [techservice-na@qiagen.com](mailto:techservice-na@qiagen.com)

Latin America (not including Brazil or Mexico) ■ [techservice-latam@qiagen.com](mailto:techservice-latam@qiagen.com)

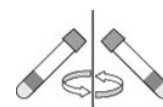
Mexico ■ [techservice-MX@qiagen.com](mailto:techservice-MX@qiagen.com)

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

## 13. Procedimento abreviado do teste

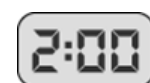
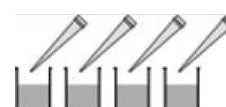
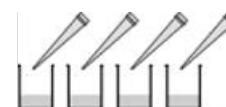
### Etapa 1 — incubação do sangue

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

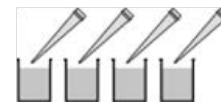
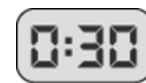
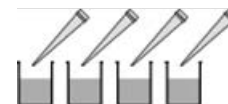
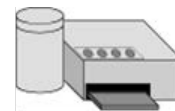


### Etapa 2 — ELISA IFN- $\gamma$

1. Coloque os componentes do ELISA, à exceção d Concentrado 100X de Conjugado, à temperatura ambiente ( $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ) durante, no mínimo, 60 minutos.
2. Reconstitua o padrão do kit a 8,0 IU/ml com água destilada ou desionizada. Prepare quatro (4) diluições padrão.
3. Reconstitua o Concentrado 100X de Conjugado liofilizado com água destilada ou desionizada.
4. Prepare conjugado funcional em Diluente Verde e adicione 50  $\mu$ l a todos os poços.
5. Adicione 50  $\mu$ l de amostras de plasma de teste e 50  $\mu$ l de padrão aos poços adequados. Misture utilizando um agitador.
6. Incube durante  $120 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente.



7. Lave os poços, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem.
8. Adicione 100 µl de solução de substrato de enzimas aos poços. Misture utilizando um agitador.
9. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.
10. Adicione 50 µl de solução de paragem de enzimas a todos os poços. Misture utilizando um agitador.
11. Leia os resultados a 450 nm com um filtro de referência de 620 a 650 nm.
12. Analise os resultados.



## Alterações significativas

As alterações significativas da presente Edição (1075115PT Rev. 01) da bula do QFT ELISA estão resumidas na tabela em baixo:

<b>Secção</b>	<b>Página</b>	<b>Alterações</b>
4. Advertências e precauções	9-11	Emenda à utilização de determinados componentes do ELISA entre lotes de kits.
12. Assistência técnica	29	Novos endereços de e-mail para Assistência técnica.







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

Acordo de licenciamento limitado para o QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

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

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e na presente bula e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo descrito nos protocolos fornecidos com o produto e na presente bula.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados ou ser objecto de revenda, salvo indicação contrária por parte da QIAGEN.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou facilitar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

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

© 2013 Cellestis, QIAGEN Company, todos os direitos reservados.

---

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: [quantiferon@qiagen.com](mailto:quantiferon@qiagen.com)

