

# Prospecto de QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold (QFT<sup>®</sup>) ELISA



2 x 96 (n.º de referencia 0594-0201)



20 x 96 (n.º de referencia 0594-0501)

Ensayo de IFN- $\gamma$  en sangre total que mide la reacción a los antígenos peptídicos ESAT-6, CFP-10 y TB7.7(p4)



Para uso de diagnóstico in vitro



0594-0201, 0594-0501



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148 Australia

Phone: (Australia) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden, ALEMANIA

1075115ES Rev. 01



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





# Contenido

<b>1. Uso previsto</b>	<b>4</b>
<b>2. Resumen y explicación de la prueba</b>	<b>4</b>
Principios del ensayo	5
Tiempo necesario para la realización del ensayo	6
<b>3. Componentes y almacenamiento</b>	<b>6</b>
Materiales requeridos pero no suministrados	7
Almacenamiento y manipulación	8
<b>4. Advertencias y precauciones</b>	<b>9</b>
Para uso de diagnóstico in vitro	9
Advertencias	9
Precauciones	10
<b>5. Obtención y manipulación de muestras</b>	<b>11</b>
<b>6. Instrucciones de uso</b>	<b>13</b>
Fase 1: incubación de la sangre y obtención de plasma	13
Fase 2: ELISA para el estándar IFN- $\gamma$ humano	14
<b>7. Cálculos e interpretación del ensayo</b>	<b>18</b>
Generación de curva estándar	18
Control de calidad del ensayo	18
<b>8. Limitaciones</b>	<b>21</b>
<b>9. Características de rendimiento</b>	<b>22</b>
Estudios clínicos	22
<b>10. Información técnica</b>	<b>25</b>
Resultados indeterminados	25
Muestras de plasma coaguladas	25
Guía de resolución de problemas	26
<b>11. Bibliografía</b>	<b>28</b>
<b>12. Servicio técnico</b>	<b>30</b>
<b>13. Resumen del procedimiento</b>	<b>31</b>
Fase 1: incubación de la sangre	31
Fase 2: ELISA para IFN- $\gamma$	31
Modificaciones importantes	33

# 1. Uso previsto

QuantiFERON-TB Gold (QFT®) es un ensayo de diagnóstico in vitro que utiliza un cóctel de péptidos que simula la actividad de las proteínas ESAT-6, CFP-10 y TB7.7(p4) para estimular células en sangre total heparinizada. La detección de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mediante el ensayo de inmunabsorción enzimática (ELISA) sirve para detectar reacciones in vitro a estos antígenos peptídicos vinculadas a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT es una prueba indirecta destinada a detectar la infección por *M. tuberculosis* (incluida la enfermedad) concebida como complemento a estudios de determinación de riesgos, radiografías y otros ensayos médicos y diagnósticos.

# 2. Resumen y explicación de la prueba

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

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

El ensayo QFT mide la reacción inmunitaria celular (RIC) ante antígenos peptídicos que simulan ser proteínas micobacterianas. Estas proteínas, ESAT-6, CFP-10 y TB7.7(p4), no aparecen en ninguna cepa la BCG ni en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas, a excepción de *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. marinum*.(1) Las personas infectadas por organismos del complejo *M. tuberculosis* suelen tener en la sangre linfocitos capaces de reconocer a este y otros antígenos micobacterianos. Este proceso de reconocimiento implica la generación y secreción de la citoquina, IFN- $\gamma$ . La detección y posterior cuantificación de IFN- $\gamma$  constituye la base de este ensayo.

Los antígenos que utiliza el ensayo QFT son una mezcla de peptídicos que simulan la acción de las proteínas ESAT-6, CFP-10 y TB7.7(p4). Numerosos estudios han demostrado que estos antígenos peptídicos estimulan la reacción al IFN- $\gamma$  en las células T de personas infectadas por *M. tuberculosis*, pero no en personas no infectadas o vacunadas con BCG sin la enfermedad o con riesgo de LTBI.(1–32) Sin embargo, los tratamientos médicos o las condiciones que inhiben la función del sistema inmunológico pueden llegar a reducir la reacción al IFN- $\gamma$ . Los pacientes con otro tipo de

infecciones micobacterianas también pueden presentar reacción ante las proteínas ESAT-6, CFP-10 y TB7.7(p4), puesto que los genes codificadores de dichas proteínas están presentes en *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. marinum*.(1, 23) El ensayo QFT se utiliza como prueba para la detección de LTBI y como ayuda para el diagnóstico de la infección por el complejo *M. tuberculosis* en pacientes enfermos. Un resultado positivo secunda el diagnóstico de tuberculosis, pero hay que tener en cuenta que las infecciones debidas a otras micobacterias (p. ej. *M. kansasii*) pueden producir también resultados positivos. Son necesarios otros ensayos médicos y pruebas diagnósticas para confirmar o excluir una tuberculosis.

## Principios del ensayo

El sistema QFT utiliza tubos de recogida de sangre específicos para sangre total. La sangre se extrae en los tubos y se incuba durante un periodo comprendido entre 16 y 24 horas. Posteriormente, se retira el plasma para determinar si se ha producido IFN- $\gamma$  como reacción a los antígenos peptídicos.

El ensayo QFT se lleva a cabo en dos fases. En primer lugar se recoge sangre total en cada uno de los tubos de recogida de sangre para QFT: un tubo de medición de nulos, un tubo de antígeno TB y un tubo de mitógeno.

El tubo de mitógeno se puede utilizar como control positivo en el ensayo QFT. Esto se justifica sobre todo en los casos en que existen dudas respecto al estado inmunológico del individuo. El tubo de mitógeno también puede servir como control para asegurar una correcta manipulación e incubación de la sangre.

Los tubos deben incubarse a 37 °C lo antes posible durante las 16 horas posteriores a la extracción de la sangre. Tras el periodo de incubación comprendido entre 16 y 24 horas, se centrifugan los tubos, se retira el plasma y se mide la cantidad producida de interferón IFN- $\gamma$  (UI/ml) mediante el método ELISA.

Se considera que el resultado del ensayo es positivo si la producción de IFN- $\gamma$  como reacción al tubo de antígeno TB es claramente superior al valor en UI/ml de IFN- $\gamma$  para nulos. Cuando se utiliza, la muestra de plasma del tubo de mitógeno sirve como control positivo de IFN- $\gamma$  para cada muestra analizada. Una reacción baja al mitógeno (<0,5 UI/ml) indica un resultado indeterminado cuando la muestra de sangre también presenta una reacción negativa ante los antígenos TB. Este resultado puede responder a un número insuficiente de linfocitos, a una menor actividad de los mismos provocada por una manipulación incorrecta de las muestras, a un llenado/mezclado incorrecto del tubo de mitógeno o a que los linfocitos del paciente sean incapaces de producir IFN- $\gamma$ . La muestra de valor para Nulo corrige el fondo, los efectos de anticuerpos heterófilos o el IFN- $\gamma$  no específico de las muestras de sangre. La cantidad de IFN- $\gamma$  en el tubo de medición de nulos se sustrae de la cantidad de IFN- $\gamma$  medida en el tubo de antígeno TB y en el de mitógeno (si lo hubiese).

## Tiempo necesario para la realización del ensayo

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

Tubos de sangre para la incubación a 37 °C: De 16 a 24 horas

ELISA: Aprox. 3 horas para una placa de ELISA

(Entre 28 y 44 individuos)

<1 hora de trabajo

Añadir entre 10 y 15 minutos por cada placa adicional

## 3. Componentes y almacenamiento

<b>Blood Collection Tubes (tubos de recogida de sangre)*</b>	<b>300 tubos</b>	<b>200 tubos</b>	<b>100 tubos</b>
<b>N.º de referencia</b>	<b>T0590-0301</b>	<b>0590-0201</b>	<b>T0593-0201</b>
<b>Número de preparados</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
QuantiFERON Nil Tube (tubo de medición de nulos para QuantiFERON con tapón gris y anillo blanco)	100 tubos	100 tubos	
QuantiFERON TB Antigen Tube (tubo de antígeno TB para QuantiFERON con tapón rojo y anillo blanco)	100 tubos	100 tubos	
QuantiFERON Mitogen Tube (tubo de mitógeno para QuantiFERON con tapón morado y anillo blanco)	100 tubos		100 tubos
Prospecto de los tubos de recogida de sangre para QFT	1	1	1
<b>High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (tubos de recogida de sangre de altitud elevada (HA)) (para uso entre 1.020 y 1.875 metros)*</b>	<b>300 tubos</b>	<b>100 tubos</b>	<b>100 tubos</b>
<b>N.º de referencia</b>	<b>T0590-0505</b>	<b>0590-0501</b>	<b>T0593-0501</b>
QuantiFERON HA Nil Tube (tubo de medición de nulos de HA para QuantiFERON con tapón gris y anillo amarillo)	100 tubos	100 tubos	
QuantiFERON HA TB Antigen Tube (tubo de antígeno TB de HA para QuantiFERON con tapón rojo y anillo amarillo)	100 tubos	100 tubos	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (tubo de mitógeno de HA para QuantiFERON con tapón morado y anillo amarillo)	100 tubos		100 tubos
Prospecto de los tubos de recogida de sangre para QFT	1	1	1

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

Componentes para ELISA	Kit ELISA para 2 placas	Envase de referencia (laboratorio)
N.º de referencia	0594-0201	0594-0501
Tiras de microplacas (12 x 8 pocillos) revestidas con anticuerpos monoclonales murinos anti-humano IFN- $\gamma$	2 conjuntos de tiras de microplacas para 12 x 8 pocillos	20 conjuntos de tiras de microplacas para 12 x 8 pocillos
Human IFN- $\gamma$ Standard, lyophilized (estándar de IFN- $\gamma$ humano, liofilizado) (contiene IFN- $\gamma$ humano recombinante, caseína bovina, 0,01% p/v de timerosal)	1 x vial (8 UI/ml después de su reconstitución)	10 x viales (8 UI/ml después de su reconstitución)
Green Diluent (GD, diluyente verde) (contiene caseína bovina, suero de ratón normal, 0,01% p/v de timerosal)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (conjugado 100X concentrado, liofilizado) (IFN- $\gamma$ HRP murino anti-humano, contiene 0,01% p/v de timerosal)	1 x 0,3 ml (después de su reconstitución)	10 x 0,3 ml (después de su reconstitución)
Wash Buffer 20X Concentrate (tampón de lavado 20X concentrado) (pH 7,2, contiene 0,05% v/v de ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (solución enzimática de sustrato) (contiene H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (solución enzimática de parada) (contiene 0,5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) <sup>†</sup>	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Prospecto de QFT ELISA	1	1

<sup>†</sup> Contiene ácido sulfúrico. Consulte la página 10 para conocer las precauciones necesarias.

## Materiales requeridos pero no suministrados

- Incubador a 37 °C. No se necesita CO<sub>2</sub>.
- Pipetas calibradas de volumen variable para manejar entre 10  $\mu$ l y 1.000  $\mu$ l con tiras desechables
- Pipeta multicanal calibrada capaz de dispensar 50  $\mu$ l y 100  $\mu$ l con puntas desechables
- Agitador de microplacas
- Agua desionizada o destilada, 2 litros
- Lavador de microplacas (lavador automático recomendado)
- Lector de microplacas equipado con un filtro de 450 nm y un filtro de referencia entre 620 nm y 650 nm

# Almacenamiento y manipulación

## Tubos de recogida de sangre

- Almacene los tubos de recogida de sangre a una temperatura comprendida entre 4 y 25 °C.

## Reactivos del kit

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

## Reactivos reconstituidos sin utilizar

Consulte el apartado 6 (página 14) para obtener las instrucciones sobre cómo reconstituir los reactivos.

- El estándar reconstituido del kit puede conservarse durante 3 meses como máximo si se almacena a una temperatura de entre 2 y 8 °C.  
Anote la fecha de reconstitución del estándar del kit.
- Una vez reconstituido, el conjugado 100X concentrado que no se haya utilizado debe volver a almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C y debe utilizarse durante los 3 meses siguientes.  
Anote la fecha de reconstitución del conjugado.
- El conjugado listo para el uso debe utilizarse en las 6 horas siguientes a su preparación.
- El tampón de lavado listo para el uso puede almacenarse a temperatura ambiente un máximo de 2 semanas.



## 4. Advertencias y precauciones

### Para uso de diagnóstico in vitro

#### Advertencias

- Un resultado negativo del QFT no descarta la posibilidad de una infección por *M. tuberculosis* o de que se padezca tuberculosis: los falsos negativos pueden deberse a la etapa de la infección en que se encuentre el paciente (p. ej. si la muestra se ha obtenido antes de que se desarrolle la respuesta celular inmune), enfermedades asociadas que afecten al mecanismo inmunológico, a una incorrecta manipulación de los tubos de recogida de sangre después de la venopunción, a una realización errónea del ensayo o a otras variables inmunológicas.
- Un resultado positivo del QFT tampoco debe considerarse como prueba única y definitiva de la existencia de una infección por *M. tuberculosis*. Una realización incorrecta del ensayo puede generar falsos positivos.
- Después de obtener un resultado positivo para el QFT, deben realizarse otros ensayos médicos y de diagnóstico para comprobar la existencia de una tuberculosis activa (p. ej., frotis y cultivo BAR, radiografía del pecho).
- Aunque las proteínas ESAT-6, CFP-10 y TB7.7(p4) no están presentes en ninguna de las cepas de BCG ni en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas, es posible que un resultado positivo del ensayo QFT se deba a una infección por *M. kansasii*, *M. szulgai* o *M. marinum*. Si se sospecha de la existencia de tales infecciones, deberán realizarse ensayos alternativos.

## Precauciones

Para uso de diagnóstico in vitro.

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



**PRECAUCIÓN: manipule la sangre humana como material potencialmente infeccioso.**

Siga las correspondientes directrices relativas a la manipulación de sangre.

Las siguientes indicaciones de riesgo y seguridad hacen referencia a los componentes del kit QuantiFERON-TB Gold ELISA.

### Solución enzimática de parada QuantiFERON



Xi

Contiene ácido sulfúrico: irritante. Frases de riesgo y seguridad:\* R36/38, S26-36/37/39

- El **diluyente verde** contiene suero de ratón normal y caseína, que pueden provocar alergias; evítese el contacto con la piel.

### Para emergencias químicas

#### Derrames, fugas, exposición o accidentes

Llame a CHEMTREC a cualquier hora del día o de la noche

Desde EE.UU. y Canadá: 1-800-424-9300

Fuera de EE.UU. y Canadá: +1-703-527-3887 (se aceptan llamadas a cobro revertido)

### Más información

Hojas de datos de seguridad: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

- Cualquier desviación respecto al procedimiento indicado en el *Prospecto de QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA* puede generar resultados erróneos. Lea las instrucciones atentamente antes de realizar el ensayo.
- No utilice el kit si algún frasco de reactivo muestra signos de estar dañado o perder líquido.
- No mezcle ni utilice tiras de microplacas, estándar IFN- $\gamma$  humano, diluyente verde o conjugado 100X concentrado de diferentes lotes del kit QFT. Otros reactivos (tampón de lavado 20X concentrado, solución enzimática de sustrato y solución enzimática de parada) pueden intercambiarse entre kits siempre y cuando los reactivos no hayan caducado y se anote la información de los lotes. Elimine los reactivos y las muestras biológicas de acuerdo con la normativa local, regional y nacional correspondiente.

\* R36/38: Irrita los ojos y la piel; S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico; S36/37/39: Úsese indumentaria protectora adecuada, guantes y protección para los ojos/la cara.

- No utilice los tubos de recogida de sangre o el kit ELISA después de la fecha de caducidad indicada.
- Compruebe que el equipo del laboratorio (por ejemplo, el lavador y el lector de placas) haya sido calibrado y convalidado para el uso.

## 5. Obtención y manipulación de muestras

El ensayo QFT utiliza los siguientes tubos de recogida:

1. Tubos de medición de nulos para QuantiFERON (tapón gris y anillo blanco) (empleo entre el nivel del mar y los 810 m)
2. Tubos de antígeno TB (tapón rojo y anillo blanco) (empleo entre el nivel del mar y los 810 m)
3. Tubos de mitógeno para QuantiFERON (tapón morado y anillo blanco) (empleo entre el nivel del mar y los 810 m)

Tubos de altitud elevada (HA):

4. Tubos de medición de nulos de HA para QuantiFERON (tapón gris con anillo amarillo) (empleo entre los 1.020 m y los 1.875 m)
5. Tubos de antígeno TB de HA (tapón rojo con anillo amarillo) (empleo entre los 1.020 m y los 1.875 m)
6. Tubos de mitógeno de HA para QuantiFERON (tapón morado con anillo amarillo) (empleo entre los 1.020 m y los 1.875 m)

Los antígenos se secan y adhieren a la pared interior del tubo de recogida de sangre, por lo que es imprescindible mezclar cuidadosamente el contenido de los tubos con la sangre. Los tubos deben colocarse en el incubador a 37 °C lo antes posible y siempre durante las 16 horas siguientes a la recogida de la sangre.

### **Siga los procedimientos que se describen a continuación para obtener resultados óptimos:**

1. **Para cada sujeto, obtenga 1 ml de sangre mediante venopunción directamente en uno de los tubos de recogida para QFT. Esta operación debería ser tarea exclusiva de un flebotomista cualificado.**
  - Se recomienda utilizar los tubos de recogida estándar del QFT hasta los 810 m de altitud. En altitudes comprendidas entre 1.020 y 1.875 metros, se recomienda el uso de tubos de recogida de sangre de altitud elevada (HA) para QFT.
  - Si se utilizan tubos de recogida de sangre para QFT fuera de estos márgenes de altitud, o si se obtienen volúmenes de muestras más pequeños, la sangre se puede recoger mediante una jeringa y transfiriendo después 1 ml de sangre a cada uno de los tres tubos. Por motivos de seguridad, la mejor forma de realizar este proceso es quitar la aguja de la jeringa tomando para las precauciones oportunas, quitar los tapones de los 3 tubos para QFT y añadir 1 ml de sangre a cada uno (hasta llegar a la marca negra del lateral de la etiqueta del tubo). Vuelva a colocar bien los tapones y mezcle como se describe a continuación.

- Como los tubos de 1 ml absorben la sangre relativamente despacio, mantenga el tubo adherido a la aguja durante 2 ó 3 segundos cuando parezca que está lleno del todo para asegurarse de haber extraído el volumen correcto.

La marca negra del lateral de los tubos indica un volumen de llenado de 1 ml. Los tubos de recogida de sangre para QFT están validados para admitir volúmenes comprendidos entre 0,8 y 1,2 ml. Si la sangre en uno de los tubos no llega a la marca de llenado, se recomienda extraer otra muestra.

- Si utiliza una aguja con aletas para extraer la sangre, utilice un tubo de purga para asegurarse de que el conducto está lleno de sangre antes de transferirla a los tubos para QFT.
- También existe la posibilidad de extraer la sangre en un tubo de recogida de sangre genérico con heparina de litio como anticoagulante y transferirla luego a los tubos para QFT. **Utilice solo heparina de litio** como anticoagulante sanguíneo, ya que los demás anticoagulantes interfieren en el ensayo. Llene un tubo de recogida de sangre (volumen mínimo 5 ml) y mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo varias veces para disolver la heparina. La sangre se debe mantener a temperatura ambiente (entre  $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ) antes de transferirla a los tubos para QFT para su incubación, que **debe** iniciarse durante las 16 horas siguientes a la extracción de la sangre.

## 2. Inmediatamente después de llenar los tubos, agítelos diez (10) veces aplicando únicamente la fuerza necesaria para que toda la superficie interna del tubo está cubierta de sangre a fin de solubilizar el antígeno en las paredes del mismo.

- Los tubos se deben encontrar a una temperatura comprendida entre 17 y 25 °C en el momento de llenarlos de sangre.
- Si agita el tubo con demasiada fuerza, puede "romper" el gel, lo que alteraría los resultados.
- Si la sangre se extrae en un tubo con heparina, mezcle las muestras uniformemente antes de transferirlas a los tubos para QFT. Asegúrese de mezclar bien la sangre invirtiendo con cuidado los tubos **inmediatamente antes de la dispensación**. Dispense alícuotas de 1,0 ml (una por cada tubo para QFT) en el tubo de medición de nulos, de antígeno de TB y de mitógeno adecuado. La mejor forma de realizar este procedimiento es de forma aséptica y **tomando las precauciones oportunas** para quitar los tapones de los tres tubos para QFT y añadir 1 ml de sangre a cada uno (hasta llegar a la marca negra del lateral de la etiqueta del tubo). Vuelva a colocar los tapones y mezcle tal como se ha descrito más arriba.

## 3. Coloque las etiquetas correspondientes en los tubos.

- Asegúrese de que cada tubo (medición de nulos, antígeno TB, mitógeno) se pueda identificar por su etiqueta o por otros medios cuando se retire el tapón.

## 4. Tras el llenado, la agitación y el etiquetado, coloque los tubos en el incubador a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ lo antes posible, y siempre durante las 16 horas siguientes a la obtención de la sangre. Antes de la incubación, mantenga los tubos a temperatura ambiente ( $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ). No refrigere ni congele las muestras de sangre.

## 6. Instrucciones de uso

### Fase 1: incubación de la sangre y obtención de plasma

#### Materiales suministrados

- Tubos de recogida de sangre para QFT (consulte el apartado 3).

#### Materiales necesarios (no suministrados)

- Consulte el apartado 3.

#### Procedimiento

1. Si la sangre no se coloca en el incubador inmediatamente después de su obtención, vuelva a mezclar los tubos invirtiéndolos 10 veces inmediatamente antes de la incubación.
2. Incube los tubos EN POSICIÓN VERTICAL a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por un periodo comprendido entre 16 y 24 horas. El incubador no requiere  $\text{CO}_2$  ni humidificación.
3. Una vez finalizada la incubación a  $37\text{ °C}$ , los tubos de recogida de sangre pueden conservarse entre  $4\text{ y }27\text{ °C}$  durante 3 días antes de centrifugarlos.
4. Después de la incubación de los tubos a  $37\text{ °C}$ , centrifúgelos durante 15 minutos a una velocidad comprendida entre 2.000 y 3.000 RCF (g) para obtener el plasma. El tapón de gelatina separa las células del plasma. Si esto no ocurre, vuelva a centrifugar los tubos a mayor velocidad.
  - Es posible obtener el plasma sin centrifugar, pero es necesario extremar la precaución al máximo para retirar el plasma sin alterar las células.
5. Las muestras de plasma solo se deben extraer con ayuda de una pipeta.
  - Después del centrifugado, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de extraer la muestra. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.
  - Las muestras de plasma pueden cargarse directamente desde los tubos de recogida de sangre centrifugados a la placa ELISA para QFT, incluso si se utilizan equipos ELISA automatizados.
  - Las muestras de plasma pueden almacenarse durante 28 días a una temperatura entre  $2\text{ y }8\text{ °C}$  o, después de la extracción del plasma, por debajo de  $-20\text{ °C}$  durante periodos más largos.
  - Se necesita un volumen mínimo de 150  $\mu\text{l}$  de plasma para garantizar la idoneidad de las muestras.

## Fase 2: ELISA para el estándar IFN- $\gamma$ humano

### Materiales suministrados

- Kit QFT ELISA (consulte el apartado 3).

### Materiales necesarios pero no suministrados

- Consulte el apartado 3.

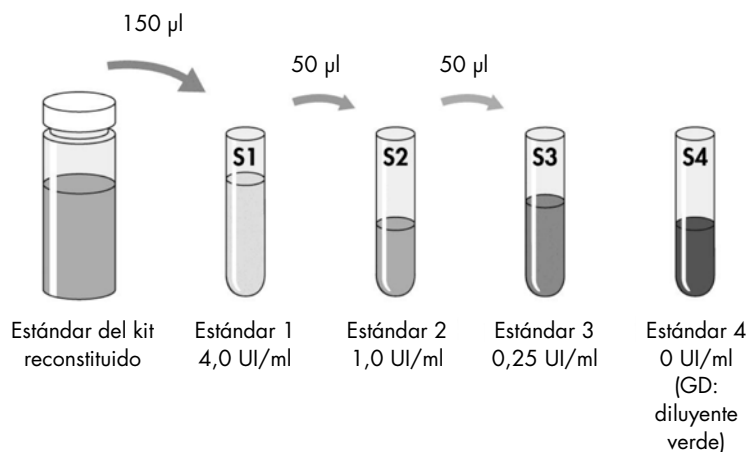
### Procedimiento

1. **Todas las muestras de plasma y los reactivos, excepto el conjugado 100X concentrado, deben estar a temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) antes de ser utilizados. Espere por lo menos 60 minutos para permitir el equilibrado.**
2. **Retire las tiras innecesarias del bastidor, vuelva a cerrar la bolsita de aluminio y colóquela de nuevo en la nevera donde quedará almacenada hasta que se necesite.**  
Deje por lo menos 1 tira para los estándares del QFT y tiras suficientes para el número de sujetos que se quieran diagnosticar (consulte las ilustraciones 2A y 2B para conocer los formatos de 3 y 2 tubos, respectivamente). Después, guarde el bastidor y la tapa para usarlos con el resto de las tiras.
3. **Reconstituya el estándar liofilizado del kit añadiendo el volumen de agua desionizada o destilada que se indica en la etiqueta del frasco del estándar. Mezcle con suavidad para evitar la formación de espuma y lograr así una solubilización completa. Después de reconstituir el estándar con el volumen indicado se obtiene una solución con una concentración de 8,0 UI/ml.**

**Nota:** el volumen para reconstitución del estándar del kit varía de un lote a otro.

Utilice el estándar reconstituido del kit para obtener una serie de dilución 1-4 de IFN- $\gamma$  en diluyente verde (GD) (consulte la ilustración 1). El S1 (estándar 1) contiene 4 UI/ml, el S2 (estándar 2) contiene 1 UI/ml, el S3 (estándar 3) contiene 0,25 UI/ml y el S4 (estándar 4) contiene 0 UI/ml (solamente GD). Los estándares deben analizarse al menos por duplicado.

Procedimiento recomendado para estándares duplicados	Procedimiento recomendado para estándares triplicados
a. Etiquete 4 tubos como "S1", "S2", "S3" y "S4".	a. Etiquete 4 tubos como "S1", "S2", "S3" y "S4".
b. Añada <b>150 <math>\mu</math>l</b> de GD a S1, S2, S3 y S4.	b. Añada <b>150 <math>\mu</math>l</b> de GD a S1.
c. Añada <b>150 <math>\mu</math>l</b> del estándar del kit a S1 y mézclelo bien.	c. Añada <b>210 <math>\mu</math>l</b> de GD a S2, S3 y S4.
d. Transfiera <b>50 <math>\mu</math>l</b> de S1 a S2 y mezcle bien.	d. Añada <b>150 <math>\mu</math>l</b> del estándar del kit a S1 y mezcle bien.
e. Transfiera <b>50 <math>\mu</math>l</b> de S2 a S3 y mezcle bien.	e. Transfiera <b>70 <math>\mu</math>l</b> de S1 a S2 y mezcle bien.
f. <b>GD por sí solo</b> sirve como estándar cero (S4).	f. Transfiera <b>70 <math>\mu</math>l</b> de S2 a S3 y mezcle bien.
	g. <b>GD por sí solo</b> sirve como estándar cero (S4).



**Ilustración 1. Preparación de la curva del estándar** Prepare diluciones nuevas del estándar del kit para cada ensayo ELISA.

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

El conjugado listo para utilizar se prepara diluyendo la cantidad necesaria de conjugado 100X concentrado en diluyente verde (GD), tal como se indica en la tabla 1: Preparación del conjugado.

**Tabla 1. Preparación del conjugado**

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

- Mezcle bien pero con suavidad para evitar la formación de espuma.
- Vuelva a guardar inmediatamente los conjugados 100X concentrados no utilizados a una temperatura de entre 2 y 8 °C.

- Utilice exclusivamente diluyente verde.
- Mezcle bien las muestras de plasma procedentes de los tubos de recogida de sangre que hayan sido congeladas o almacenadas durante más de 24 horas antes del ensayo antes de verterlas en el pocillo ELISA.**
    - Si las muestras de plasma se añaden directamente desde los tubos para QFT centrifugados, evite mezclar el plasma.
  - Añada 50 µl de conjugado recién preparado listo para usar a los pocillos de ELISA mediante una pipeta multicanal.**
  - Añada 50 µl de muestras de plasma de prueba a los pocillos correspondientes usando una pipeta multicanal (consulte el siguiente esquema de distribución recomendada para la placa en la página 16, ilustraciones 2A y 2B). Para terminar, añada 50 µl a cada uno de los estándares 1 a 4.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
<b>B</b>	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
<b>C</b>	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
<b>D</b>	4N	4A	4M	S4	S4	S4	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

**Ilustración 2A. Distribución recomendada de muestras para los tubos de medición de nulos, antígeno TB y mitógeno (28 ensayos por placa).**

- S1 (estándar 1), S2 (estándar 2), S3 (estándar 3), S4 (estándar 4).
- 1N (muestra 1. plasma de blanco), 1A (muestra 1. plasma de antígeno TB), 1M (muestra 1. plasma de mitógeno)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1N	5N	9N	13N	17N	S1	S1	25N	29N	33N	37N	41N
<b>B</b>	1A	5A	9A	13A	17A	S2	S2	25A	29A	33A	37A	41A
<b>C</b>	2N	6N	10N	14N	18N	S3	S3	26N	30N	34N	38N	42N
<b>D</b>	2A	6A	10A	14A	18A	S4	S4	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

**Ilustración 2B. Distribución recomendada de muestras para los tubos de medición de nulos y antígeno TB (44 ensayos por placa).**



- S1 (estándar 1), S2 (estándar 2), S3 (estándar 3), S4 (estándar 4).
  - 1N (muestra 1. plasma de blanco), 1A (muestra 1. plasma de antígeno TB)
- 8. Mezcle bien el conjugado y las muestras de plasma/estándares durante 1 minuto en un agitador de microplacas.**
- 9. Tape cada una de las placas e incúbelas a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C) durante 120 ± 5 minutos.**
- No exponga las placas a la luz directa del sol mientras estén en el incubador.
- 10. Durante la incubación, diluya una parte del tampón de lavado 20X concentrado con 19 partes de agua desionizada o destilada y mezcle bien. Se incluye suficiente tampón de lavado 20X concentrado para preparar 2 litros de tampón de lavado listo para utilizar.**
- Lave los pocillos con **400 µl** de tampón de lavado listo para usar durante al menos 6 ciclos. Se recomienda utilizar un lavador de placas automático.
- Es muy importante lavar bien las placas para que el análisis dé los resultados esperados. Asegúrese de que todos los pocillos están **completamente llenos** de tampón de lavado hasta el borde antes de iniciar cada ciclo de lavado. Se recomienda dejar escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
  - Añada desinfectante normal de laboratorio al depósito de evacuación y siga los procedimientos establecidos para descontaminar materiales potencialmente infecciosos.
- 11. Coloque las placas boca abajo sobre un paño absorbente y dé unos toquecitos para escurrir los restos de tampón de lavado que puedan quedar. Añada 100 µl de solución enzimática de sustrato a cada pocillo y mezcle bien con un agitador de microplacas.**
- 12. Tape cada una de las placas e incúbelas a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C) durante 30 minutos.**
- No exponga las placas a la luz directa del sol mientras estén en el incubador.
- 13. Transcurridos los 30 minutos de incubación, añada 50 µl de solución enzimática de parada a cada pocillo y mezcle.**
- La solución enzimática de parada debería añadirse a los pocillos en el mismo orden y aproximadamente a la misma velocidad que el sustrato en el paso 11.
- 14. Mida la densidad óptica (DO) de cada pocillo a los 5 minutos de detener la reacción mediante un lector de microplacas equipado con un filtro de 450 nm y con un filtro de referencia de 620 nm a 650 nm. Los valores de DO se utilizan para calcular los resultados.**

## 7. Cálculos e interpretación del ensayo

El programa de análisis del QFT se utiliza para analizar los datos obtenidos y calcular los resultados. Puede obtenerlo desde [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Asegúrese de utilizar la versión más actualizada del programa.

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

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

### Generación de curva estándar

#### (cuando no se utiliza el programa del QFT)

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

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

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

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

### Control de calidad del ensayo

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

Para que el ensayo ELISA se considere válido:

- El valor DO medio para el estándar 1 debe ser  $\geq 0,600$ .
- El %CV de los valores DO de las réplicas del estándar 1 y el estándar 2 debe ser  $\leq 15\%$ .
- Los valores DO de las réplicas del estándar 3 y el estándar 4 no deben presentar una desviación mayor que 0,040 unidades DO respecto a su media.
- El coeficiente de correlación (r) calculado a partir de los valores medios de absorbancia de los estándares debe ser  $\geq 0,98$ .

El programa de análisis del QFT calcula y muestra los valores de estos parámetros de calidad.

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

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

## Interpretación de los resultados

Los resultados del ensayo QFT se interpretarán según los siguientes criterios:

Nota: para diagnosticar o descartar una tuberculosis, o para evaluar la probabilidad de una infección latente por tuberculosis (LTBI), es necesario recabar una serie de datos epidemiológicos, históricos, médicos y diagnósticos que habrá que tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados del QFT (Tablas 2 y 3).

**Tabla 2. Utilización de tubos de medición de nulos, tubos de antígeno TB y tubos de mitógeno**

Nulo (UI/ml)	Antígeno TB menos Nulo (UI/ml)	Mitógeno menos Nulo (UI/ml)*	Resultado del QFT	Resultados/Interpretación
$\leq 8,0$	$< 0,35$	$\geq 0,5$	Negativo	Infección por <i>M. tuberculosis</i> IMprobable
	$\geq 0,35$ y $< 25\%$ del valor nulo	$\geq 0,5$	Negativo	Infección por <i>M. tuberculosis</i> IMprobable
	$\geq 0,35$ y $\geq 25\%$ del valor nulo	Cualquiera	Positivo <sup>†</sup>	Infección por <i>M. tuberculosis</i> probable
	$< 0,35$	$< 0,5$	Indeterminado <sup>‡</sup>	Resultados indeterminados para la respuesta al antígeno-TB
	$\geq 0,35$ y $< 25\%$ del valor nulo	$< 0,5$	Indeterminado <sup>‡</sup>	Resultados indeterminados para la respuesta al antígeno-TB
$> 8,0$ <sup>§</sup>	Cualquiera	Cualquiera	Indeterminado <sup>‡</sup>	Resultados indeterminados para la respuesta al antígeno-TB

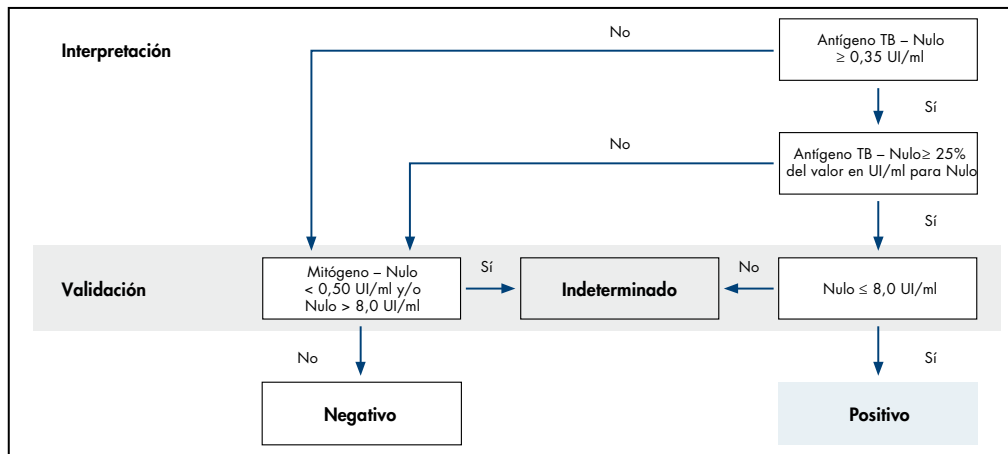
\* Las reacciones al control positivo del mitógeno (y en ocasiones al antígeno TB) suelen estar fuera del rango del lector de microplacas. Esto no afecta a los resultados.

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

<sup>‡</sup> Consulte el apartado "Resolución de problemas" para conocer las posibles causas.

<sup>§</sup> En estudios clínicos, menos del 0,25% de los sujetos presentaron niveles de IFN- $\gamma$  de  $> 8,0$  UI/ml para el valor de Nulo.

Es imposible establecer correlación alguna entre el volumen de IFN- $\gamma$  y el grado de infección, de respuesta inmune o la probabilidad de que la enfermedad entre en su fase activa.



**Ilustración 3. Interpretación del flujo de trabajo en el que se utilizan tubos de medición de nulos, tubos de antígeno TB y tubos de mitógeno**

**Tabla 3. Utilización de tubos de medición de nulos y antígeno TB de QuantiFERON**

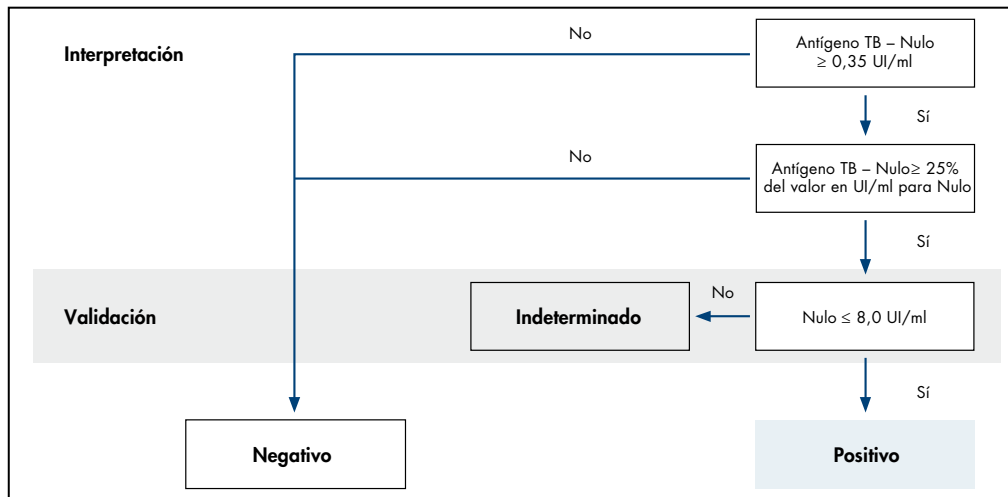
Nulo (UI/ml)	Antígeno TB menos Nulo (UI/ml)	Resultado del QFT	Resultados/Interpretación
≤ 8,0	< 0,35	Negativo	Infección por <i>M. tuberculosis</i> IMprobable
	≥ 0,35 y < 25% del valor de Nulo	Negativo	Infección por <i>M. tuberculosis</i> IMprobable
	≥ 0,35 y ≥ 25% del valor de Nulo	Positivo*	Infección por <i>M. tuberculosis</i> probable
> 8,0 <sup>†</sup>	Cualquiera	Indeterminado <sup>‡</sup>	Resultados indeterminados para la respuesta al antígeno TB

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

<sup>†</sup> En estudios clínicos, menos del 0,25% de los sujetos presentaron niveles de IFN- $\gamma$  de > 8,0 UI/ml para el valor de Nulo.

<sup>‡</sup> Consulte el apartado "Resolución de problemas" para conocer las posibles causas.

Es imposible establecer correlación alguna entre el volumen de IFN- $\gamma$  medido y la fase o el grado de infección, de respuesta inmune o la probabilidad de que la enfermedad entre en su fase activa.



**Ilustración 4. Interpretación del flujo de trabajo con la utilización de tubos de medición de nulos y antígeno TB**

## 8. Limitaciones

Los resultados del análisis QFT deben completarse con la historia epidemiológica del individuo, estado físico actual y otras pruebas médicas.

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

Pueden darse resultados poco fiables o indeterminados si:

- Se producen desviaciones respecto al procedimiento descrito en el *Prospecto de QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*.
- Existen volúmenes excesivos de IFN- $\gamma$  en circulación o hay anticuerpos heterófilos.
- Han pasado más de 16 horas desde la obtención de la muestra de sangre y su incubación a 37 °C.

## 9. Características de rendimiento

### Estudios clínicos

En la práctica no es posible realizar estimaciones de la sensibilidad y especificidad del QFT al no existir un estándar definitivo que determine la infección latente de tuberculosis (LTBI). La especificidad del ensayo QFT se ha determinado mediante aproximación a partir de las tasas de falsos positivos en personas de bajo riesgo (sin factores de riesgo conocidos) de infección de tuberculosis. La sensibilidad también se ha determinado mediante aproximación a partir de la evaluación de grupos de pacientes con tuberculosis activa confirmada mediante cultivo.

### Especificidad

En un estudio estadounidense con 866 voluntarios, se extrajo sangre para el ensayo QFT durante la realización de la prueba cutánea de la tuberculina (TST). Los datos demográficos y los factores de riesgo de tuberculosis se determinaron mediante un cuestionario estándar en el momento de la prueba. De los 432 voluntarios sin factores de riesgo conocidos para la infección por *M. tuberculosis*, se obtuvieron resultados de las pruebas QFT y TST para 391 individuos. Ninguno de ellos había sido vacunado con BCG. Se realizó un segundo estudio de especificidad del QFT con individuos de bajo riesgo en Japón, un grupo en el que aproximadamente un 90% de los individuos había sido vacunado con BCG. En la Tabla 4 se muestran los resultados de los 2 estudios de especificidad.

**Tabla 4. Especificidad del QFT: resultados de personas sin riesgo conocido de infección por *M. tuberculosis*.**

Estudio	Estado BCG (% vacunados)	Ensayos totales	N.º de indeterminados para QFT	N.º de positivos/ ensayos válidos del QFT	Especificidad del QFT (IC 95%)	N.º de positivos/ pruebas para TST	Especificidad de la TST* (IC 95%)
EE.UU. (no publicado)	0%	391	1	3/390	99,2% (98–100)	6/391	98,5% 97-99
Japón (15)	~90%	168	6	2/162	98,8% (95–100)	–	–
Total	–	559	7/559 (1,3%)	5/552	99,1% (98–100)	–	–

\* Valor de corte de 10 mm para TST en sujetos no vacunados con BCG. La estimación de la especificidad de la TST llega al 99,1% cuando se aplica un valor de corte de 15 mm.

## Sensibilidad para la tuberculosis activa

Se analizaron los sujetos procedentes de Estados Unidos, Australia y Japón sospechosos de padecer tuberculosis y cuya infección por *M. tuberculosis* se confirmó posteriormente mediante cultivo para evaluar la sensibilidad del QFT. Mientras no exista una prueba estándar para determinar la infección latente por tuberculosis (LTBI), se acepta el método del cultivo microbiológico de *M. tuberculosis* ya que los pacientes con la enfermedad están infectados por definición. La condición indispensable es que los pacientes reciban un tratamiento de menos de 8 días antes de la recogida de sangre para el ensayo QFT.

En la tabla 5 se resumen los resultados de los 3 grupos de pacientes cuyos cultivos dieron positivo para la infección por *M. tuberculosis*. La sensibilidad general del QFT para la tuberculosis activa fue del 89% (157/177).

**Tabla 5. QFT: individuos con infección por *M. tuberculosis* confirmada mediante cultivo microbiológico**

Estudio	N.º de positivos/ensayos válidos del QFT	Sensibilidad del QFT (IC 95%)
Pacientes con tuberculosis en Japón (15)	86/92	93% (86–97%)
Australianos	24/27	89% (70–97%)
EE.UU.	47/58	81% (68–90%)
Total	157/177	89% (83–93%)

## Diagnóstico de la infección latente por tuberculosis (LTBI)

Se han publicado varios estudios que demuestran la validez del QFT en distintas poblaciones con riesgo de LTBI. En la tabla 6 se resumen los principales resultados de algunos de estos estudios.

**Tabla 6. Selección de estudios publicados sobre QFT en distintas poblaciones con riesgo de LTBI.**

Estudio	Ensayos totales	Resultados y conclusiones
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Escenario de tasas muy elevadas de tuberculosis. 40% de positivos para QFT y 41% de positivos para TST con un valor de corte de 10 mm. Elevada concordancia con TST, sin que la vacuna BCG tenga repercusión alguna en ninguno de los resultados. Ambos ensayos tienen en cuenta factores de riesgo como la edad y el tiempo trabajado en el sector sanitario.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	Prevalencia general de LTBI mediante QFT estimada en un 4,6% (27/590) para las personas infectadas por VIH+. Los resultados positivos se relacionan con riesgo de tuberculosis. Dos individuos positivos para QFT evolucionaron hasta desarrollar una tuberculosis activa en el periodo de 1 año. Las respuestas indeterminadas (n=20, 3,4%) se asocian claramente a un recuento CD4 < 100/ $\mu$ l.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Se realizaron las pruebas de QFT y TST a niños con sospecha de padecer tuberculosis o con un historial de contacto con la enfermedad; se obtuvieron un 10,5% de positivos para QFT y un 9,5% de positivos para TST con un valor de corte de 10 mm. La concordancia general entre las pruebas fue del 95,2% y del 100% en sujetos no vacunados con BCG.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	Se realizaron las pruebas a contactos cercanos de 15 casos de índice diferentes: un 51% estaba vacunado con BCG, un 27% había nacido en el extranjero; un 70% de los vacunados con BCG y un 18% de los no vacunados dieron positivo para TST (5 mm), mientras que un 9% y un 11% dieron positivo para QFT respectivamente. QFT se asocia con el riesgo de tuberculosis. TST solamente se asocia con la vacuna con BCG.

Existen muchas más publicaciones que describen los resultados con QuantiFERON-TB Gold, la versión con antígeno líquido de sensibilidad inferior (el precursor de QFT) y con la prueba QFT. Estos estudios incluyen el uso de las pruebas en contactos con casos de tuberculosis activa (9, 11, 19, 25), niños (6-10, 25, 28), pacientes seropositivos (2, 5, 20), personal sanitario (13, 26, 32), pacientes inmunodeprimidos (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), además de casos sospechosos de tuberculosis (7, 8, 10, 18) y sujetos de bajo riesgo (15).

### Reproducibilidad e influencia de la prueba TST en ensayos QFT posteriores

El estudio de especificidad estadounidense establecía volver a realizar las pruebas a una parte de los voluntarios entre 4 y 5 semanas después de las pruebas QFT y TST originales. Se obtuvieron los resultados del QFT en los dos momentos indicados para 260 personas y se estimó una coincidencia del 99,6% (259/260). Una prueba TST previa no implica respuestas positivas para QFT.



## 10. Información técnica

### Resultados indeterminados

Los resultados indeterminados deberían obtenerse de forma excepcional y pueden estar relacionados con el estado inmunológico del individuo o con varios factores técnicos:

- Han transcurrido más de 16 horas entre la recogida de sangre y la incubación a 37 °C.
- La sangre se ha almacenado a una temperatura inferior o superior al rango recomendado (entre 17 °C y 27 °C).
- Los tubos de recogida de sangre no se han mezclado lo suficiente.
- La placa de ELISA no se ha lavado bien.

Si existen sospechas de que se hayan producido fallos o errores técnicos durante la recogida o manipulación de las muestras de sangre, repita el ensayo QFT por completo con otras muestras. Cuando el motivo puede deberse a que el material no se ha lavado bien o a que se han cometido errores de procedimiento, puede realizarse de nuevo el ensayo ELISA con plasmas estimulados. A no ser que se haya producido un error en el ensayo ELISA, no deberían obtenerse resultados indeterminados por un bajo volumen de mitógeno o un elevado volumen de valores nulos. Los resultados indeterminados deben referirse como tales. Corresponde a los médicos optar por extraer una segunda muestra o realizar otro tipo de pruebas.

### Muestras de plasma coaguladas

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

# Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede resultarle de utilidad para resolver cualquier problema que pueda surgir. Si desea obtener más información, también puede consultar la información técnica que encontrará en: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Consulte la contracubierta para obtener la dirección de contacto.

## Resolución de problemas para ELISA

---

### *Coloración indeterminada*

<b>Posible causa</b>	<b>Solución</b>
a) Placa mal lavada	Lave la placa al menos 6 veces con 400 µl/pocillo con tampón de lavado. Según el lavador utilizado, puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado. Deje escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
b) Contaminación cruzada entre los pocillos de ELISA	Extreme la precaución durante el pipeteado y la mezcla de la muestra para minimizar el riesgo.
c) Kit o componentes caducados	Asegúrese de que el kit no esté caducado. Compruebe que el estándar reconstituido y el conjugado 100X concentrado se utilizan durante los tres meses siguientes a la fecha de reconstitución.
d) Solución enzimática de sustrato contaminada	Deseche el sustrato si presenta una coloración azul. Utilice depósitos de reactivos limpios.
e) Plasma mezclado en tubos para QFT antes de su recogida	Después del centrifugado, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de extraer la muestra. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.

### *Valores bajos de densidad óptica para los estándares*

<b>Posible causa</b>	<b>Solución</b>
a) Error de dilución del estándar	Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar del kit, de acuerdo con las instrucciones del prospecto de QFT ELISA.
b) Error de pipeteado	Compruebe que las pipetas estén calibradas y utilícelas según las instrucciones del fabricante.
c) Temperatura de incubación demasiado baja	La incubación para ELISA debe realizarse a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C).
d) Tiempo de incubación demasiado corto	La incubación de la placa con el conjugado, los estándares y las muestras debe durar 120 ± 5 minutos. La solución enzimática de sustrato debe incubarse en la placa durante 30 minutos.
e) Filtro incorrecto para la lectura de placas	La placa debe leerse a 450 nm con un filtro de referencia de entre 620 y 650 nm.
f) Reactivos demasiado fríos	Todos los reactivos, a excepción del conjugado 100X concentrado, deben estar a temperatura ambiente antes de empezar el ensayo. Este paso puede tardar una hora aproximadamente.

## Resolución de problemas para ELISA

---

- g) Kit o componentes caducados      Asegúrese de que el kit no esté caducado. Compruebe que el estándar reconstituido y el conjugado 100X concentrado se utilizan durante los 3 meses siguientes a la fecha de reconstitución.

### *Fondo elevado*

#### **Posible causa**

#### **Solución**

- a) Placa mal lavada      Lave la placa al menos 6 veces con 400 µl/pocillo con tampón de lavado. Según el lavador utilizado, puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado. Deje escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
- b) Temperatura de incubación demasiado elevada      La incubación para ELISA debe realizarse a temperatura ambiente (22 °C ± 5 °C).
- c) Kit o componentes caducados      Asegúrese de que el kit no esté caducado. Compruebe que el estándar reconstituido y el conjugado 100X concentrado se utilizan durante los 3 meses siguientes a la fecha de reconstitución.
- d) Solución enzimática de sustrato contaminada      Deseche el sustrato si presenta una coloración azul. Utilice depósitos de reactivos limpios.

### *Curva estándar no lineal y variabilidad entre duplicados*

#### **Posible causa**

#### **Solución**

- a) Placa mal lavada      Lave la placa al menos 6 veces con 400 µl/pocillo con tampón de lavado. Según el lavador utilizado, puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado. Deje escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
- b) Error de dilución del estándar      Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar, de acuerdo con las instrucciones del prospecto de QFT ELISA.
- c) Mezclado mal hecho      Mezcle bien los reactivos mediante inversión o agitándolos con cuidado antes de dispensarlos en la placa.
- d) Técnica de pipeteado no fluida o interrupción durante la preparación del ensayo      Las muestras deben mezclarse con los estándares de forma fluida, sin interrupciones. Todos los reactivos deben estar preparados antes de comenzar el ensayo.

**Encontrará un vídeo sobre el procedimiento del ensayo y las soluciones a la mayoría de los problemas técnicos en Gnowee™. Solo tiene que registrarse en [www.gnowee.net](http://www.gnowee.net) para obtener acceso en línea. QIAGEN y sus distribuidores ponen a su disposición de forma gratuita toda la información del producto y las guías técnicas. También puede visitar [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).**

# 11. Bibliografía

En Gnowee, la biblioteca de referencias QuantiFERON disponible en [www.gnowee.net](http://www.gnowee.net), encontrará una lista completa de referencias sobre el ensayo QFT.

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. Servicio técnico

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con:

[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)

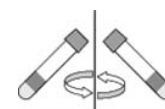
Mexico ■ [techservice-MX@qiagen.com](mailto:techservice-MX@qiagen.com)

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

## 13. Resumen del procedimiento

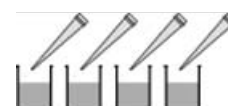
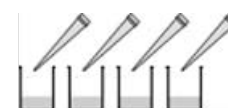
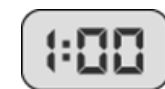
### Fase 1: incubación de la sangre

1. Recoja la sangre del paciente en los tubos de recogida de sangre y mezcle el contenido agitando los tubos diez (10) veces con la fuerza suficiente para que toda la superficie interna del tubo se cubra de sangre a fin de solubilizar los antígenos en sus paredes.
2. Incube los tubos EN POSICIÓN VERTICAL a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por un periodo comprendido entre 16 y 24 horas.
3. Después de la incubación, centrifugue los tubos durante 15 minutos a 2.000-3.000 g RCF (g) para separar el plasma de los glóbulos rojos.
4. Después del centrifugado, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de extraer la muestra. Tenga cuidado en todo momento de no interferir con el material de la superficie del gel.

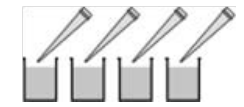
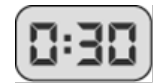
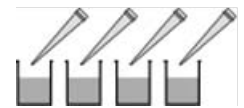


### Fase 2: ELISA para IFN- $\gamma$

1. Equilibre los componentes de ELISA, excepto el conjugado 100X concentrado, a temperatura ambiente ( $22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ) durante un mínimo de 60 minutos.
2. Reconstituya el estándar del kit hasta 8,0 UI/ml con agua destilada o desionizada. Prepare cuatro (4) diluciones de estándar.
3. Reconstituya el conjugado 100X concentrado liofilizado con agua desionizada o destilada.
4. Prepare conjugado listo para usar con diluyente verde y añada 50  $\mu\text{l}$  a cada uno de los pocillos.
5. Añada 50  $\mu\text{l}$  de las muestras de plasma del ensayo y 50  $\mu\text{l}$  de los estándares a los pocillos correspondientes. Mezcle con un agitador.
6. Deje incubar durante  $120 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente.
7. Lave los pocillos al menos 6 veces con 400  $\mu\text{l}$ /pocillo con tampón de lavado.



8. Añada a los pocillos 100  $\mu$ l de solución enzimática de sustrato.  
Mezcle con un agitador.
9. Deje incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Añada a los pocillos 50  $\mu$ l de solución enzimática de parada.  
Mezcle con un agitador.
11. Lea los resultados a 450 nm con un filtro de referencia de entre 620 y 650 nm.
12. Analice los resultados.





## Modificaciones importantes

En la siguiente tabla se resumen los cambios significativos que incluye esta edición (1075115ES Rev. 01) del prospecto de QFT ELISA:

<b>Apartado</b>	<b>Página</b>	<b>Modificaciones</b>
4. Advertencias y precauciones	9–11	Modificación sobre el uso de determinados componentes de ELISA entre lotes de kits
12. Servicio técnico	30	Nuevas direcciones de correo electrónico del Servicio técnico



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

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

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

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

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2013 Cellestis, a QIAGEN Company, Reservados todos los derechos.

---

Phone: (Australia) +613-9840-9800

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

