

QuantIFERON[®]-TB **Gold**

**Ensayo del interferón gamma en sangre entera.
Mide la reacción a los antígenos peptídicos
ESAT-6, CFP-10 & TB7.7**

FOLLETO

Para diagnóstico *in vitro*



ÍNDICE

1. USO PROPUESTO	2
2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO	2
Principios del ensayo	3
Tiempo necesario para llevar a cabo el ensayo	3
3. REACTIVOS Y ALMACENAMIENTO	4
Material necesario (no incluido)	4
Instrucciones de almacenamiento	4
Tubos para recogida de sangre	5
Kit de reactivos	5
Reactivos disueltos sin utilizar	5
4. ADVERTENCIAS Y MEDIDAS DE PRECAUCIÓN	6
Advertencias	6
Medidas de precaución	6
5. RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS	7
6. INSTRUCCIONES DE USO	8
ESTADIO UNO: Incubación de la sangre y recogida de plasma	8
ESTADIO DOS: ELISA de IFN- γ humano	9
7. CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	12
Generación de curva estándar	12
Control de calidad del ensayo	13
Interpretación de resultados	13
8. LIMITACIONES	17
9. RENDIMIENTO	
10. INFORMACIÓN TÉCNICA	17
Resultados indeterminados	19
Muestras de plasma coaguladas	19
Resolución de problemas relativos a ELISA	19
Coloración indeterminada	20
Valores de densidad óptica de estándares bajos	20
Coloración intensa del fondo	21
Curva estándar no lineal y diferencias entre duplicados	21
11. BIBLIOGRAFÍA	22
12. SERVICIO TÉCNICO	23
13. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO	24
14. CAMBIOS SIGNIFICATIVOS	28

1. USO PROPUESTO

QuantiferON®-TB Gold In-Tube (QFT®) es un ensayo diagnóstico *in vitro* que se sirve de un combinado de peptídicos que se hacen pasar por las proteínas ESAT-6, CFP-10 y TB7.7(p4) para estimular células presentes en sangre entera heparinizada. La detección de interferón- γ (IFN- γ) mediante el ensayo de inmunoadsorción 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). Está pensada como complemento a estudios de determinación de riesgos, radiografías y otros ensayos médicos.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

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 de ellos permanecen sanos. La infección latente por tuberculosis (LTBI, en sus siglas inglesas), una dolencia asintomática intransmisible permanece en algunos individuos, que pueden llegar a sufrir tuberculosis meses o años más tarde. El principal objetivo de diagnosticar 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 el *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 and TB7.7(p4) - no aparecen en ninguna de las cepas de BCG ni en la mayoría de las micobacterias de la tuberculosis, con excepción de *M. kansasii*, *M. szulgai* and *M. marinum*.¹ Los individuos infectados con bacterias del complejo *M. tuberculosis* normalmente tienen linfocitos en la sangre que reconocen a éstos y a otros antígenos micobacterianos. Este proceso de reconocimiento consiste en generar y secretar citoquina, es decir, interferón gamma (IFN- γ). Este ensayo se basa en la detección y posterior cuantificación de dicho interferón- γ .

Los antígenos que utiliza 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 producción de IFN- γ en los linfocitos T de individuos infectados con el *M. tuberculosis*, y no en general de personas no infectadas o vacunadas con BCG que no padezcan la enfermedad ni corran riesgo de presentar LTBI.¹⁻³² Sin embargo, los tratamientos médicos o las dolencias que entorpecen el mecanismo inmune pueden reducir la producción de IFN- γ . Los pacientes que sufren determinadas infecciones micobacterianas pueden asimismo reaccionar antes las proteínas ESAT-6, CFP-10 and TB7.7(p4), dado que los genes que codifican estas proteínas están presentes en el *M. kansasii*, *M. szulgai* and *M. marinum*.^{1,23} Por consiguiente, el ensayo QFT es a la vez una prueba de LTBI y una útil herramienta para diagnosticar la infección por el complejo *M. tuberculosis* en pacientes enfermos. Un resultado positivo secunda el diagnóstico de tuberculosis; 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 entera. La sangre se extrae en los tubos y se incuba entre 16 y 24 horas. Posteriormente se retira el plasma para determinar si se ha producido IFN- γ como reacción a los antígenos peptídicos.

El ensayo QFT se divide en dos etapas. Primero, se recoge sangre entera en cada uno de los tubos del QFT: un tubo de medición de nulos, un tubo para antígenos de TB y uno opcional para mitógeno.

El tubo de mitógeno puede servir en el ensayo del QFT como control positivo. Esto se justifica sobre todo en los casos en que existen dudas respecto al estado inmunológico del individuo. El tubo de mitógeno sirve asimismo como control para comprobar que la sangre se está manipulando y colocando en el incubador correctamente.

Los tubos se colocarán en el incubador a 37°C lo antes posible, y siempre en las 16 horas siguientes a la recogida de la sangre. Después de las 16 a 24 horas de incubación, los tubos se centrifugan, el plasma se retira y se mide la cantidad de interferón/IFN- γ (UI/ml) mediante el método ELISA.

Se considera que el resultado del ensayo es positivo si la producción de IFN- γ como reacción al tubo de antígeno TB es claramente superior al valor nulo del IFN- γ en UI/ml. Si se utiliza plasma estimulado con mitógeno, éste servirá para medir los positivos de IFN- γ de cada muestra. Una reacción baja al mitógeno (<0,5 UI/ml) indica un resultado indeterminado cuando la muestra de sangre presenta una reacción negativa también ante los antígenos de la tuberculosis. Este resultado puede darse debido a insuficientes linfocitos, menor actividad de los mismos debido a una manipulación incorrecta de las muestras, llenado/mezclado incorrecto del tubo de mitógeno o porque los linfocitos del paciente sean incapaces de generar IFN- γ . La muestra blanca/nula corrige la coloración del fondo no específico, de los efectos de anticuerpos heterófilos⁷ o interferón gamma no específico en la muestra. La cantidad de IFN- γ en el tubo nulo se sustrae de la cantidad de IFN- γ medida en el tubo de antígenos de tuberculosis y en el de mitógeno (si lo hubiese).

Tiempo necesario para realizar el ensayo

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

Tubos de sangre a 37°C en estufa de incubación: 16-24 horas

ELISA: Aprox. 3 horas para una placa de ELISA

- <1 hora de trabajo
- Añadir 10-15 minutos por cada placa adicional

3. REACTIVOS Y ALMACENAMIENTO

Tubos de recogida de sangre para tuberculosis y antígenos de control

Número de catálogo T0590 0301

- | | |
|--|-----------|
| 1. Tubo de medición de nulos (tapa gris) | 100 tubos |
| 2. Tubo de antígenos TB (tapa roja) | 100 tubos |
| 3. Tubo de control de mitógeno (tapa morada) | 100 tubos |

NOTA: Pueden solicitarse otras combinaciones de tubos:

100 tubos de nulos, 100 tubos de antígenos TB (Nº de catálogo: T0590-0201)
100 tubos de control de mitógeno (Nº de catálogo: T0593-0201)

Tubos para altitudes (véase el Apartado 5)

Nº de catálogo: T590-0501: (altitud) 100 tubos de nulos, 100 tubos de antígeno TB.

Nº de catálogo: T059- 0505: (altitud) 100 tubos de nulos, 100 antígeno Tb y 100 tubos de mitógeno.

Nº de catálogo: T0593-0501 (altitud) 100 tubos de control de mitógeno.

Componentes para ELISA

Componentes para ELISA	Nº de catálogo: 0594-0201	Nº de catálogo: 0594-0501
	Kit bi-placa	Envase de referencia (laboratorio)
Tiras de microplacas revestidas de anticuerpos monoclonales murinos anti IFN- γ humano	placas de pocillos 2 x 96	placas de pocillos 20 x 96
IFN- γ humano normal, liofilizado (contiene IFN- γ recombinante humano, caseína bovina, 0,01 % p/v de timerosal)	1 vial (8 UI/ml, después de la reconstitución)	10 viales (8 UI/mL, después de la reconstitución)
Diluyente Verde (contiene caseína bovina, suero de ratón normal, 0,01% p/v de timerosal)	1 de 30 ml	10 de 30 ml
Concentrado conjugado x 100, liofilizado (IFN- γ HRP murino anti-humano, contiene 0,01% p/v de timerosal)	1 de 0,3ml (después de la reconstitución)	10 de 0,3ml (después de la reconstitución)
Concentrado de tampón de lavado x 20 (pH 7,2, contiene 0,01 % p/v de timerosal)	1 de 100ml	10 de 100ml
Solución enzimática de sustrato (contiene H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' tetrametilbenzidina)	1 de 30ml	10 de 30ml
Solución enzimática de paro (contiene 0,5M de H ₂ SO ₄)	1 de 15ml	10 de 15ml

Material necesario (pero no suministrado)

- Incubadora de 37°C (no precisa CO₂)
- Pipetas calibradas de volumen variable para manejar entre 10 µl hasta 1000 µl con tiras desechables.
- Pipeta multicanal calibrada capaz de admitir 50 µl y 100 µl con puntas desechables.
- Agitador de microplacas.
- Agua deionizada o destilada - 2 litros.
- Lavador de microplacas (se recomienda lavador automático).
- Lector de microplacas equipado con un filtro de 450 nm y otro de referencia de 620 a 650nm.

Instrucciones de almacenamiento

Tubos para recogida de sangre

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

Kit de reactivos ELISA

- Guarde el kit entre 2 y 8°C.
- Proteja en todo momento la solución enzimática de sustrato de la luz directa del sol.

Reactivos resultantes sin utilizar

En el punto Preparación de reactivos, del apartado 6 (página 11), encontrará instrucciones sobre cómo disolver los reactivos.

- Los componentes del kit habitual disueltos se mantienen en buen estado 3 meses como máximo si se guardan a una temperatura de entre 2 y 8°C.
 - *Fíjese en la fecha en que el equipo habitual se ha disuelto.*
- Una vez disuelto, el conjugado concentrado 100X que no se haya utilizado, debe volver a guardarse entre 2 y 8°C y usarse asimismo en los 3 meses siguientes.
 - *Fíjese en la fecha en que se ha disuelto el conjugado.*
- El conjugado listo para el uso debe utilizarse en las 6 horas siguientes a haber sido preparado.
- El tampón de lavado diluido puede guardarse a temperatura ambiente como máximo 2 semanas.

4. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Precauciones

- Un resultado negativo en el 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 surja 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 no deberá considerarse la única y definitiva prueba de la existencia de una infección por *M. tuberculosis*. Llevar a cabo el ensayo de forma incorrecta puede producir falsos positivos.
- Después de un resultado positivo en el QFT deberán 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 ESAT-6, CFP-10 y TB7.7(p4) no aparecen en ninguna de las cepas de BCG ni en la mayoría de las micobacterias no tuberculosas, es posible que un resultado positivo en el 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.

Medidas de precaución

- Exclusivamente para diagnósticos *in vitro*.
- **Daño:** La **solución enzimática de sustrato** contiene 3,3',5,5' de tetrametilbenzidina, perjudicial si se ingiere, inhala o entra en contacto con la piel. Irritante de ojos y piel. Mutágeno. Protegerse los ojos, llevar guantes y manejar como un potencial carcinógeno.
- **Daño:** La **solución enzimática de paro** contiene H₂SO₄, perjudicial si se ingiere, inhala o entra en contacto con la piel o los ojos. Protegerse los ojos, llevar guantes y manejar como un potencial carcinógeno. Si la solución de paro entra en contacto con la piel o los ojos, enjuagar con abundante agua y acudir a un médico.
- **Daño:** El **IFN-γ normal** y el **concentrado de conjugado 100X** pueden provocar molestias gástricas si se ingieren o irritar la piel. Llevar guantes e indumentaria protectora habitual de laboratorio.
- **Manipular la sangre humana como potencialmente infecciosa.** Siga las correspondientes directrices relativas a manipulación de sangre.
- Algunos reactivos incorporan **timerosal**, a modo de conservante. Puede resultar tóxico ingerido, inhalado o si entra en contacto con la piel.
- El **diluyente verde** contiene suero de ratón normal y caseína, que pueden provocar alergias; evitar el contacto con la piel.
- Incumplir las instrucciones del prospecto pueden provocar resultados erróneos. Le rogamos que lea las instrucciones atentamente antes de realizar el ensayo.
- No utilice el equipo si algún frasco de reactivo muestra signos de estar dañado o perder líquido.
- No mezcle o utilice reactivos de ELISA de otros lotes de QFT.

- Deshágase de reactivos y muestras biológicas de acuerdo con la normativa local, regional y nacional al respecto.
- No utilice los tubos de recogida de sangre o el equipo para ELISA después de la fecha de caducidad indicada.
- Compruebe que el equipo del laboratorio como, por ejemplo, el lavador y el lector de placas haya sido calibrado y convalidado para el uso.

5. RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

QFT viene con los siguientes tubos de recogida:

1. Tubo de medición de nulos (tapa gris con anillo blanco) (empleo entre el nivel del mar y los 810m)
2. Antígenos de tuberculosis (tapa roja con anillo blanco) (empleo entre el nivel del mar y los 810m)
3. Medición de mitógeno (opcional) (tapa morada con anillo blanco) (empleo entre el nivel del mar y los 810m)
4. Tubo de medición de nulos (tapa gris con anillo amarillo) (empleo entre los 1.020m y los 1.875m)
5. Antígenos de tuberculosis (tapa roja con anillo amarillo) (empleo entre los 1.020m y los 1.875m)
6. Medición de mitógeno (opcional) (tapa morada con anillo amarillo) (empleo entre los 1.020m y los 1.875m)

Los antígenos están adheridos secos a la pared interior del tubo de recogida de sangre, así que es básico que el contenido de los tubos se mezcle cuidadosamente con la sangre. Los tubos se colocarán en el incubador a 37°C lo antes posible, y siempre en las 16 horas siguientes a la recogida de la sangre.

Para obtener resultados óptimos deberá seguirse el siguiente procedimiento:

1. Recoger para cada sujeto 1 ml de sangre por venopunción directamente en uno de los tubos de recogida del QFT. Esta operación debería ser tarea exclusiva de un flebotomista cualificado.
 - Se recomienda el uso de tubos QFT estándar hasta los 810m de altitud. En altitudes superiores a los 1020 metros, se recomienda el uso de tubos de recogida de sangre QFT (HA).

Si se usan tubos de recogida de sangre QFT fuera de estos márgenes de altitud, o con volúmenes de muestras más pequeños, la sangre se puede recoger usando una jeringa y transfiriendo pues 1mL de sangre a cada uno de los tres tubos. Por razones de seguridad, la mejor forma de realizar esto es quitando la aguja de la jeringa, tomando para ello las precauciones oportunas. Quitar los tapones de los tres tubos QFT y añadir 1mL de sangre a cada uno (hasta llegar a la marca negra del lateral de la etiqueta). Volver a colocar bien los tapones y mezclar como se describe a continuación.

- Como los tubos de 1 ml absorben la sangre relativamente despacio, mantener 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 el volumen de 1 ml. Los tubos de recogida de sangre QFT están validados para admitir volúmenes que oscilan de 0,8 a 1,2 ml. Si la sangre en uno de los tubos no llegase a la marca, se recomienda extraer otra muestra.

- Si se utiliza una aguja con aletas para recoger la sangre, deberá usarse un tubo de purga para asegurarnos de que el conducto está lleno de sangre antes de colocar los tubos de QFT.

2. Inmediatamente después de llenar los tubos, agitarlos diez (10) veces aplicando únicamente la fuerza que es necesaria para estar seguro de que toda la superficie interna del tubo está cubierta de sangre a fin de solubilizar el antígeno en las paredes del tubo.
 - Los tubos se deben encontrar a una temperatura entre 17 y 25°C en el momento de llenarlos de sangre.
 - Si agita el tubo con demasiada fuerza, puede hacer “romper” el gel, alterando los resultados.
3. Etiquetar los tubos adecuadamente.
4. Los tubos se colocarán en el incubador a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ lo antes posible, y siempre dentro de las 16 horas siguientes a la recogida de la sangre. Antes de la incubación, mantener los tubos a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). No refrigerar ni congelar las muestras de sangre.

6. INSTRUCCIONES DE USO

Estadio Uno – Incubación de la sangre y recogida de plasma

Material incluido

Tubos de recogida de sangre de QFT (ver apartado 3).

Material necesario (no incluido)

Ver apartado 3.

Procedimiento

1. Si la sangre no se coloca en el incubador inmediatamente después de ser recogida, **habrá que mezclar los tubos volcándolos 10 veces inmediatamente antes de colocarlos en él**, tal como se describe en el apartado 5.
2. Colocar los tubos **DE PIE** a 37°C entre 16 y 24 horas. El incubador no precisa CO₂ ni humidificación.
3. Los tubos se mantienen bien entre 4 y 27°C durante 3 días antes de centrifugarlos.
4. Tras la incubación a 37°C, centrifugar el tubo entre 5 y 15 minutos a entre 2000 y 3000 RCF (g). El tapón de gelatina separará las células del plasma. Si esto no ocurre, habrá que volver a centrifugar los tubos a mayor velocidad.
 - Es posible recoger el plasma sin centrifugar, aunque en tal caso, habrá que poner especial cuidado para retirar el plasma sin alterar las células.
5. **Después de centrifugar, no pipetee arriba y abajo ni mezcle el plasma de ninguna forma antes de extraer la muestra. Tener cuidado, en todo momento, de no interferir con el material de la superficie del gel.**
 - Extraer la muestra de plasma sólo **usando una pipeta**.
 - Las muestras de plasma pueden cargarse directamente de los tubos de recogida de sangre a la placa ELISA del QFT, incluso si se utilizan equipos ELISA automatizados.
 - Las muestras de plasma pueden almacenarse durante 28 días entre 2 y 8°C o, después de la extracción del plasma, por debajo de -20°C durante periodos más largos.

Estadio dos: IFN- γ humano y ELISA

Material incluido

Equipo ELISA de QFT (ver apartado 3).

Material necesario (no incluido)

Ver apartado 3.

Procedimiento

1. Antes de usarlas, todas las muestras de plasma y reactivos, excepto el concentrado de conjugado 100X, deberán estar a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Esperar por lo menos 60 minutos para que se realice el equilibrado.
2. Retirar las tiras innecesarias del bastidor, volver a cerrar la bolsita de aluminio y colocarla de nuevo en la nevera donde quedará almacenada hasta que se necesite.

Dejar por lo menos una tira para los estándares del QFT y tiras suficientes para cada uno de los sujetos que se quieran diagnosticar (ver en las imágenes 2A y 2B los modelos de 2 y 3 tubos, respectivamente). Después, guardar el bastidor y la tapa para usarlos con el resto de las tiras.

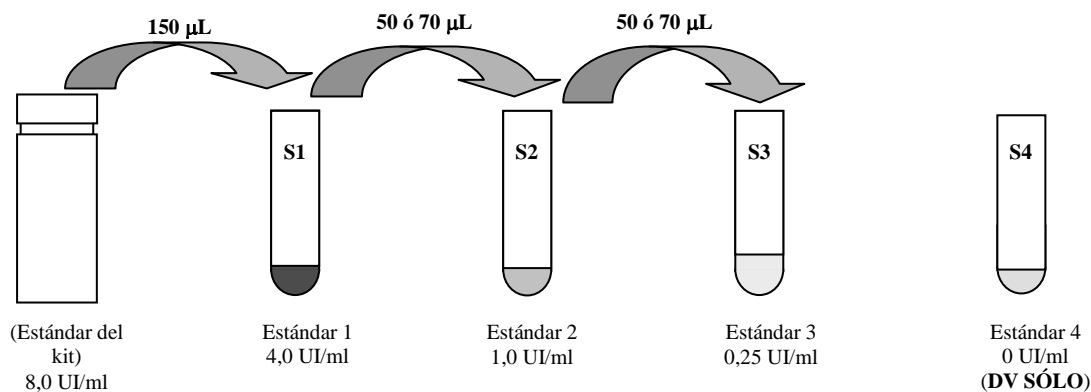
3. Disolver el estándar liofilizado del kit añadiéndole el volumen de agua desionizada o destilada que se indica en la etiqueta del frasco del estándar. Mezclar con suavidad para que se forme lo mínimo posible de espuma y lograr así una solubilización completa. Al disolver el estándar al volumen indicado se consigue una solución con una concentración de 8 UI/ml.

Nota: *El volumen disuelto del estándar del kit varía de un lote a otro.*

Del estándar disuelto saldrán una serie de 4 diluciones del interferón- γ con diluyente verde (DV). Ver imagen 1: el P1 (estándar 1) contiene 4 UI/ml, P2 (estándar 2) contiene 1 UI/ml, P3 (estándar 3) contiene 0,25 UI/ml, y P4 (estándar 4) contiene 0 UI/ml (sólo DV). Los estándares deben analizarse al menos por duplicado.

PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA ESTÁNDARES ANALIZADOS POR DUPLICADO	PROCEDIMIENTO RECOMENDADO PARA ESTÁNDARES ANALIZADOS POR TRIPLICADO
<ol style="list-style-type: none">a. Marcar 4 tubos: "P1", "P2", "P3", "P4".b. Añadir 150 μl de DV a los P1, P2, P3 y P4.c. Añadir 150 μl del estándar del kit al P1 y mezclar bien.d. Dispensar 50 μl de P1 en P2 y mezclar bien.e. Dispensar 50 μl de P2 en P3 y mezclar bien.f. El DV sólo funciona como estándar cero/blanco (P4).	<ol style="list-style-type: none">a. Marcar 4 tubos: "P1", "P2", "P3", "P4".b. Añadir 150 μl del DV al P1.c. Añadir 210 μl de DV a los P2, P3 y P4.d. Añadir 150 μl del estándar del kit al P1 y mezclar bien.e. Dispensar 70 μl de P1 en P2 y mezclar bien.f. Dispensar 70 μl de P2 a P3 y mezclar bien.g. El DV sólo funciona como estándar cero/blanco (P4).

GRÁFICO 1. Preparación de la curva estándar



- Prepare diluciones nuevas del estándar del kit cada vez que realice el ensayo ELISA.

4. Disolver el concentrado 110X de conjugado liofilizado con 0,3 ml de agua deionizada o destilada. Mezclar con suavidad para que se forme lo mínimo posible de espuma y lograr así una solubilización completa del conjugado.

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

TABLA 1. Preparación del conjugado

NÚMERO DE TIRAS	VOLUMEN DE CONCENTRADO 100X DE CONJUGADO	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

- Mezclar bien pero con suavidad para evitar que se forme espuma.
 - Vuelva a guardar inmediatamente los concentrados que no utilice a una temperatura de entre 2 y 8°C.
 - Utilice exclusivamente diluyente verde.
5. Mezclar bien antes de verter en el pocillo ELISA 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.
 6. Si se van a añadir las muestras de plasma directamente desde los tubos QFT centrifugados, evite mezclar el plasma.
 7. Añadir 50 µL de conjugado recién preparado para usar a los pocillos de ELISA ayudándose de una pipeta multicanal.

8. Añadir 50 µl de muestras de plasma de prueba a los correspondientes pocillos usando una pipeta multicanal (vea el siguiente cuadro de reparto en la placa – Cuadros 2A y 2B). Para terminar, añadir 50 µl a cada uno de los estándares, del 1 al 4.

CUADRO 2A. Cuadro de reparto recomendado de muestras de tubos blancos y de antígenos TB (44 pruebas por placa)

Rij	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	5N	9N	13N	17N	S1	S1	25N	29N	33N	37N	41N
B	1A	5A	9A	13A	17A	S2	S2	25A	29A	33A	37A	41A
C	2N	6N	10N	14N	18N	S3	S3	26N	30N	34N	38N	42N
D	2A	6A	10A	14A	18A	S4	S4	26A	30A	34A	38A	42A
E	3N	7N	11N	15N	19N	21N	23N	27N	31N	35N	39N	43N
F	3A	7A	11A	15A	19A	21A	23A	27A	31A	35A	39A	43A
G	4N	8N	12N	16N	20N	22N	24N	28N	32N	36N	40N	44N
H	4A	8A	12A	16A	20A	22A	24A	28A	32A	36A	40A	44A

- E1 (estándar 1), E2 (estándar 2), E3 (estándar 3), E4 (estándar 4).
- 1N (muestra 1. Plasma de medición blanco); 1A (muestra 1. Plasma de antígenos TB).

CUADRO 2B. Cuadro de reparto recomendado de muestras de tubos blancos, de antígenos TB y de mitógeno. (28 pruebas por placa)

Rij	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

- E1 (estándar 1), E2 (estándar 2), E3 (estándar 3), E4 (estándar 4).
- 1N (muestra 1. Plasma de medición blanco); 1A (muestra 1. Plasma para medición de antígenos TB); 1M (muestra 1. Plasma para medición de mitógeno).

9. Mezclar bien durante 1 minuto en un agitador de microplacas el conjugado y las muestras/estándares de plasma.
10. Tapar cada una de las placas e incubarlas a temperatura ambiente (22°C ± 5°C) durante 120 ± 5 minutos.
- Mientras estén en el incubador, no deberá exponerse a la luz directa del sol.
11. Durante la incubación, diluir una parte del concentrado 20X de tampón de lavado con 19 partes de agua demonizada o destilada y mezclar bien. Se incluye suficiente concentrado 20X de tampón de lavado como para preparar 2L de tampón.

Lavar los pocillos con **400µL** de tampón listo para usar durante al menos 6 ciclos. Se recomienda utiliza un lavador de placas automático.

- Es muy importante que se laven a conciencia para que el análisis dé los resultados esperados. Asegurarse de que todos los pocillos están **completamente llenos** de tampón hasta el borde antes de iniciar cada ciclo de lavado. Se recomienda dejar escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
- Añadir desinfectante normal de laboratorio al depósito de evacuación y seguir los procedimientos establecidos para descontaminar materiales potencialmente infecciosos.

11. Colocar las placas sobre un paño absorbente y dar unos toquecitos para que escurran los restos de tampón que puedan quedar. Añadir 100µL de solución enzimática de sustrato a cada pocillo y mezclar bien con un agitador de microplacas.
12. Tapar cada una de las placas e incubarlas a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos.
 - Mientras estén en el incubador, no deberán exponerse a la luz directa del sol.
13. Después de incubarlos durante 30 minutos, añadir 50µL de solución enzimática de paro a cada pocillo y mezclar.
 - Se añadirá la solución enzimática de paro a los pocillos en el mismo orden y aproximadamente a la misma velocidad que el sustrato en el paso 1.
14. Medir la densidad óptica (DO) de cada pocillo a los 5 minutos de interrumpir la reacción mediante un lector de microplacas equipado con un filtro de 450nm y con un filtro de referencia de 620nm a 650nm. Para calcular los resultados se utilizarán esos valores de DO.

7. CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

Cellestis le facilitará el software específico para QFT que analiza datos brutos y calcula resultados (Compruebe que la versión de software en uso sea la más actual).

El programa evalúa la calidad del análisis, genera una curva estándar y proporciona un resultado para cada sujeto, calculado con el método de interpretación explicado a continuación.

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

Generación de curva estándar

(en el supuesto de no usarse el programa de QFT)

Determinar los valores DO medios de las réplicas del estándar del kit en cada placa.

Dibujar una curva estándar de $\log_{10}(\text{e})$ - $\log_{10}(\text{e})$ trazando el $\log_{10}(\text{e})$ del valor medio DO (eje y) junto al $\log_{10}(\text{e})$ de la concentración de interferón gamma de los estándares en UI/ml (eje x), omitiendo de estos cálculos el estándar cero. Calcular la línea que mejor se adecua a la curva estándar por análisis regresivo.

A partir de la curva estándar, determinar la concentración de interferón gamma (UI/ml) de 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 (como por ejemplo Microsoft Excel). Se recomienda utilizar estos paquetes para calcular el análisis regresivo, 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, los resultados extraídos de los estándares deberán revisarse antes de interpretar los resultados correspondientes a las muestras analizadas.

Para que el ELISA se considere válido:

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

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

- El valor DO medio para el estándar cero (diluyente verde) debe ser $\leq 0,150$. Si el valor DO medio es $> 0,150$ habrá que revisar el procedimiento de lavado de las 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 análisis QFT.

<u>Blanco</u> [UI/ml]	<u>Antígenos TB menos blanco</u> [UI/ml]	Resultado del QFT	Informe/Interpretación
$\leq 8,0$	$< 0,35$	Negativo	Infección por <i>M. tuberculosis</i> improbable
	$\geq 0,35$ y $< 25\%$ del valor nulo		
	$\geq 0,35$ y $\geq 25\%$ del valor nulo	Positivo ¹	infección por <i>M. tuberculosis</i> probable
$> 8,02$	Cualquiera	Indeterminado ²	Resultados inutilizables para determinación de antígeno TB

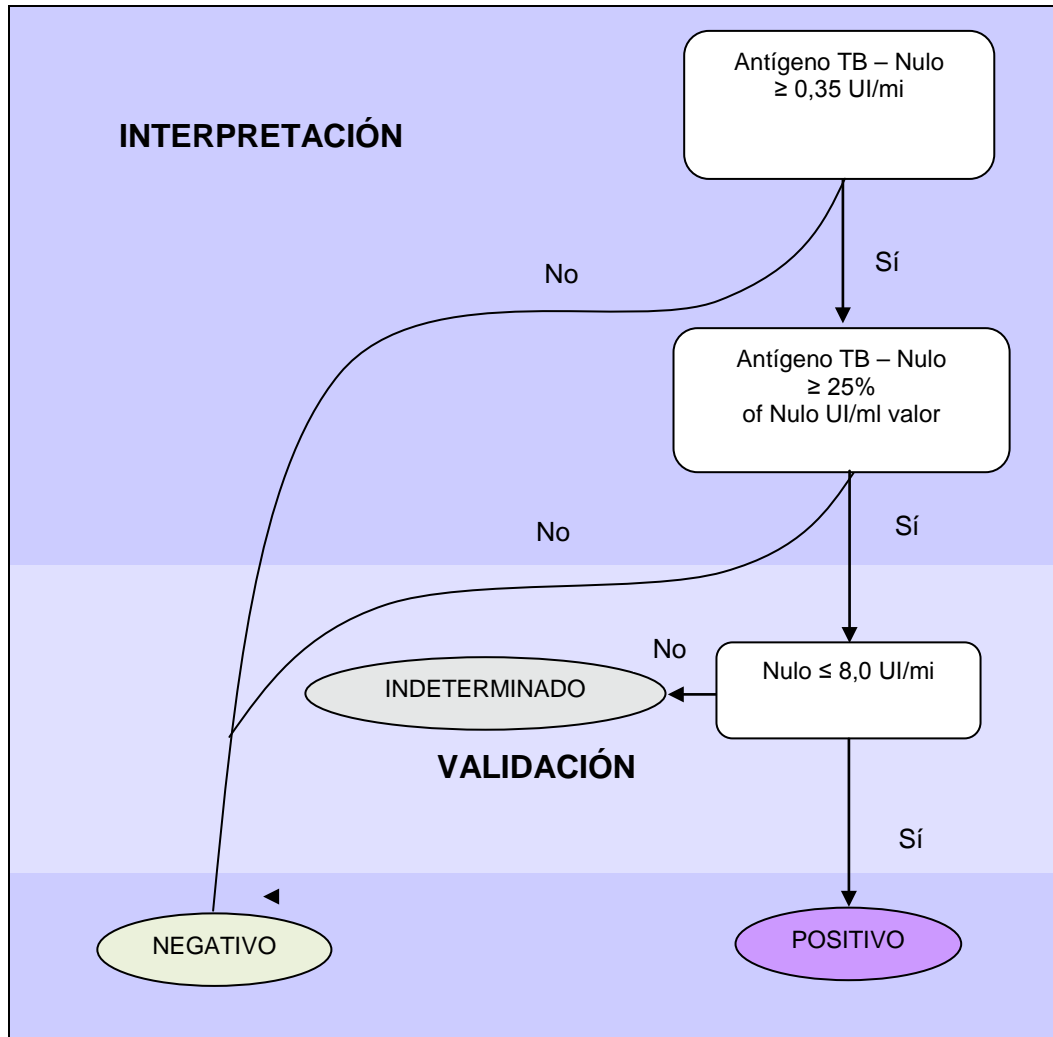
¹ Si no se sospecha una infección por *M. tuberculosis*, un resultado inicialmente positivo puede confirmarse volviendo a analizar las primeras muestras de plasma por duplicado con el ELISA QFT. Si el segundo análisis de una o de ambas réplicas da positivo, se considerará que el individuo ha dado positivo en el ensayo.

² En estudios clínicos realizados, menos del 0,25% de los sujetos mostraron un volumen de interferón- γ $> 8,0$ de UI/mL en el análisis blanco.

³ En el apartado Resolución de problemas se detallan posibles causas.

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

GRÁFICA 3. DIAGRAMA DE FLUJO: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS SI SE UTILIZAN TUBOS BLANCOS Y DE ANTÍGENOS



<u>Blanco</u> [UI/ml]	<u>Antígenos TB menos blanco</u> [UI/ml]	<u>Mitógeno menos blanco</u> [UI/ml] ¹	Resultado del QFT	Informe/Interpretación
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativo	Infección por <i>M. tuberculosis</i> improbable
	≥ 0,35 y < 25% del valor nulo	≥ 0,5		
	≥ 0,35 y ≥ 25% del valor nulo	Cualquiera	Positivo ²	Infección por <i>M. tuberculosis</i> probable
	< 0,35	< 0,5	Indeterminado ³	Resultados inutilizables para determinación de antígeno TB
≥ 0,35 y < 25% del valor nulo	< 0,5			
> 8,0	Cualquiera	Cualquiera		

¹ Los positivos en la medición de mitógeno (y en ocasiones de antígenos TB) suelen estar fuera de los límites del lector de microplacas. Esto no afecta a los resultados.

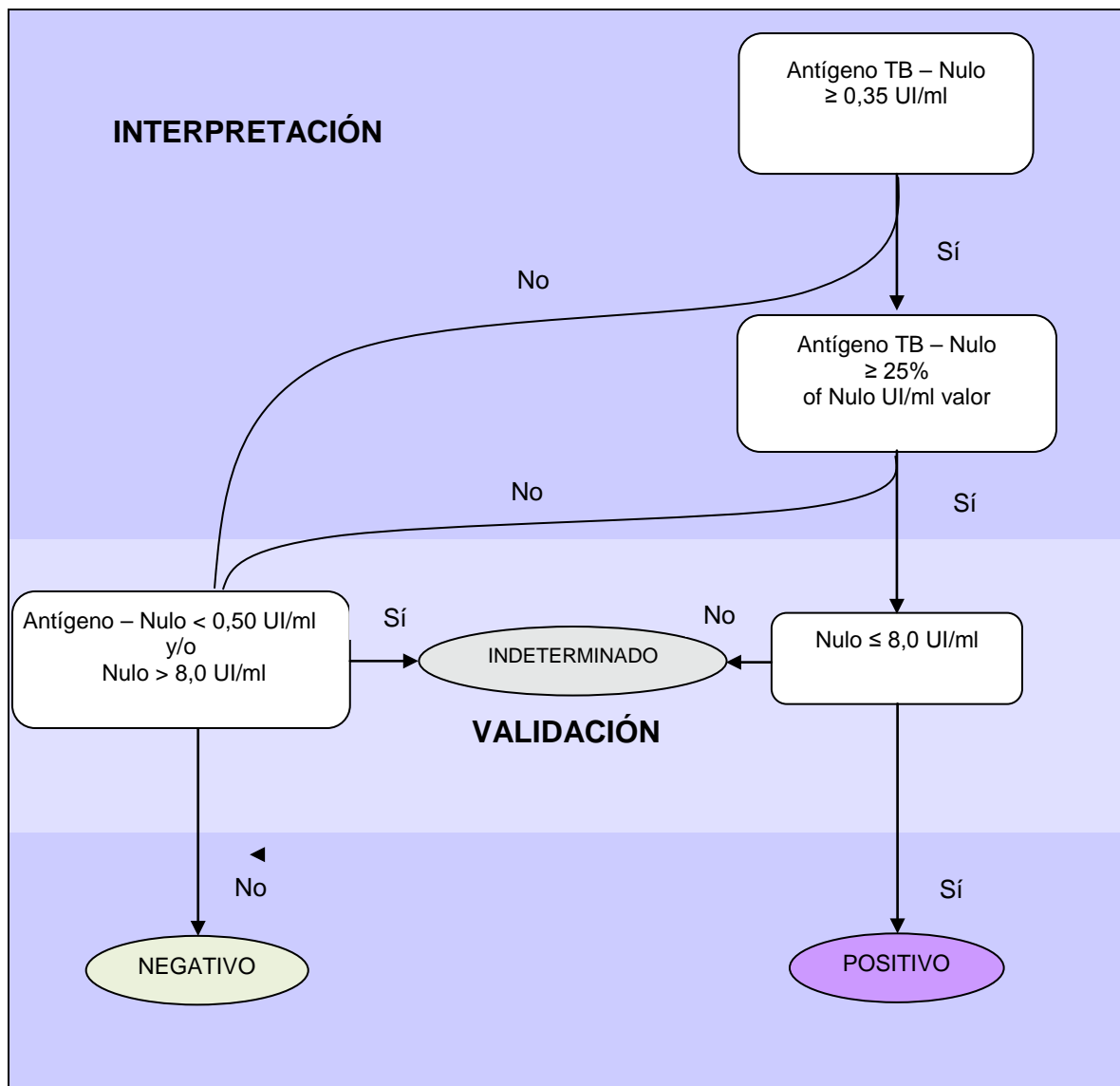
² Si no se sospecha una infección por *M. tuberculosis*, un resultado inicialmente positivo puede confirmarse volviendo a analizar las primeras muestras de plasma por duplicado con el ELISA QFT. Si el segundo análisis de una o de ambas réplicas da positivo, se considerará que el individuo ha dado positivo en el ensayo.

³ En el apartado Resolución de problemas se detallan posibles causas.

⁴ En estudios clínicos realizados, menos del 0,25% de los sujetos mostraron un volumen de interferón- γ >8 de UI/mL en el análisis blanco.

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

GRÁFICA 4. DIAGRAMA DE FLUJO: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS SI SE UTILIZAN TUBOS BLANCOS, DE ANTÍGENOS TB Y DE MITÓGENO



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 presenten valores nulos superiores a 8 UI/ml se clasifican como “indeterminados” porque una reacción 25% superior a los antígenos TB estaría fuera de los límites de medición del ensayo.

Pueden darse resultados poco fiables o indeterminados si:

- No se siguen los pasos descritos en este prospecto.
- Existe un volumen excesivo de interferón gamma en circulación o hay anticuerpos heterófilos,
- Pasan más de 16 horas desde que se haya extrae la muestra de sangre hasta que se incubaba a 37°C.

9. RENDIMIENTO

Estudios clínicos

En la práctica no es posible evaluar aproximadamente la sensibilidad y la especificidad de QFT al no existir un estándar que determine la infección latente de tuberculosis (LTBI). La especificidad de QFT se calculó con aproximación basándose en las tasas de falsos positivos en personas de bajo riesgo (sin factores de riesgo conocidos) de infección de tuberculosis. La sensibilidad se calculó con aproximación basándose en los datos de grupos de pacientes con tuberculosis activa confirmada por cultura microbiológica.

Especificidad

En un estudio estadounidense se recogió para QFT la sangre de 866 voluntarios durante la prueba cutánea de la tuberculina (TST). Los datos demográficos y los factores de riesgo de tuberculosis se determinaron usando un cuestionario estándar en el momento de efectuar el ensayo. Entre los 432 voluntarios que no presentaban factores de riesgo conocido para la infección con *M. tuberculosis*, se dispuso de los resultados del ensayo QFT y de la prueba TST de 391. Ninguno de ellos había sido vacunado con BCG. Se efectuó un segundo estudio de especificidad del QFT en individuos de bajo riesgo en Japón, entre los que el 90% (aprox.) había sido vacunado con BCG. Los resultados de los dos estudios de especificidad aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2. Especificidad de QFT: Resultados para personas sin riesgo conocido de infección de *M. tuberculosis*.

ESTUDIO	Estado BCG % vacunados	Total testados	No. QFT-G indeterminados	No. QFT-G Positivos / No. ensayos válidos	Especificidad QFT-G (IC 95%)	No. Positivos TST/ No. ensayados	Especificidad 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)	-	-

*Usando TST con 10mm de *cut off* en persona no vacunadas contra BCG. La estimación de la especificidad TST llega al 99,1% si se usa un *cut off* de 15mm.

Sensibilidad (tuberculosis activa)

En la presunción de presencia de casos de tuberculosis procedentes de Australia y Japón, se confirmó la infección por *M. tuberculosis* para estimar la sensibilidad de QFT en cultura microbiológica. Mientras no exista un test estándar para determinar la infección latente por tuberculosis (LTBI) se acepta el método de la cultura microbiológica de *M. tuberculosis* ya que pacientes con la enfermedad activa están infectados por definición.

Condición indispensable era que a los pacientes se les hubiera aplicado un tratamiento de menos de 8 días antes de la recogida de muestras para el ensayo de QFT.

(En la Tabla 3 figuran los resultados de los tres grupos de pacientes con culturas positivas al *M. tuberculosis*. La sensibilidad general de QFT para la tuberculosis activa fue del 89% (157/177).

Tabla 3. QFT: Individuos con infección de *M. tuberculosis* confirmada por cultura microbiológica

ESTUDIO	No. positivos QFT-Gold / No. Ensayos válidos	Sensibilidad QFT-Gold (IC 95%)
Pacientes TB, Japón ¹⁵	86 / 92	93% (86-97%)
Australiano	24 / 27	89% (70-97%)
Estadounidense	47 / 58	81% (68-90%)
TOTAL	157 / 177	89% (83-93%)

Diagnóstico de LTBI

Se han publicado varios estudios que demuestran la validez del QFT en distintas poblaciones a riesgo de LTBI. Los resultados de algunos de estos estudios figuran en la Tabla 4.

Tabla 4. Selección de estudios publicados sobre el QFT en distintas poblaciones a riesgo de LTBI.

ESTUDIO	Total individuos	Resultados
Indios (personal sanitario) (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Tasas muy elevadas de TB. 40% positivos QFT de 41% positivos TST (10mm). Elevada concordancia con TST, ningún efecto de BCG en ninguno. Los dos ensayos están correlacionados con los factores de riesgo de edad y período de actividad en el sistema sanitario.
Daneses con HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	La prevalencia general de LTBI con QFT fue del 4,6% /27/590) en personas HIV+. Los resultados positivos estaban asociados a los riesgos TB. Dos individuos positivos en el QFT manifestaron TB activa en el transcurso de un año. Las respuestas indeterminadas (n=20. 3,4%) estaban asociadas de forma significativa a un recuento CD4 <100 / µL
Niños hospitalizados (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Se testaron niños con presunción de TB o con un historial de contacto con TB con el QFT y el TST. 10,5% positivos QFT frente a 9,5% positivos TST (10mm). La concordancia entre los ensayos fue del 95,2% en general y del 100% en personas no vacunadas BCG.
Contactos alemanes (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Se testaron individuos con contacto directo considerando 15 índices diferentes. 51% estaba vacunado con BCG, 27% había nacido en el extranjero. El 70% de los vacunados con BCG y el 18% de los que no estaban vacunados resultaron positivos al TST (5mm), mientras los positivos con QFT resultaron ser del 9% y del 11%, respectivamente. QFT se asoció al riesgo de TB. TST sólo se asoció a la vacunación BCG.

Muchas más publicaciones describen los resultados con QuantiFERON®-TB Gold en versión antígeno líquido (el precursor de QFT, de sensibilidad inferior) y con el QFT mismo. Estos estudios incluyen el uso del/de los ensayo(s) en contactos con casos de TB activa^{9,11, 19, 25}, niños^{6-10, 25, 28}, seropositivos HIV^{2, 5, 20}, personal sanitario^{13, 26, 32}, inmunosuprimidos^{4, 22, 23, 27, 30, 31}, además de casos presuntos de TB^{7, 8, 10, 18} e individuos de bajo riesgo¹⁵.

Reproducibilidad de los resultados e influencia de una prueba TST sobre un test posterior con QFT

En el estudio de especificidad estadounidense se volvió a testar una parte de los voluntarios en un intervalo de tiempo comprendido entre las 4 y las 5 semanas después del QFT inicial y de la TST. Se compararon los resultados de QFT en 260 personas en los dos momentos considerados y la coincidencia fue del 99,6% (259/260). El ensayo TST previo no induce respuestas positivas en QFT.

10. INFORMACIÓN TÉCNICA

Resultados indeterminados

Los resultados indeterminados se dan a título excepcional. Pueden deberse al estado inmunológico del sujeto o a varios factores técnicos:

- Han pasado más de 16 horas desde que se extrae la muestra de sangre hasta que se incuba a 37°C.
- La sangre se ha almacenado a temperatura inferior o superior a los límites indicados (22°C ± 5°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, habrá que repetir todo el análisis QFT con otras muestras. Si se teme que el material no se ha lavado bien o que ha habido fallos 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 es de esperar que un resultado indeterminado a causa de un bajo volumen de mitógeno o elevado volumen de valores nulos cambie al repetir el análisis. 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 apareciesen coágulos de fibrina, habrá que centrifugarlas para que se sedimenten los coágulos, lo que facilita su paso por la pipeta.

Resolución de problemas relativos a ELISA

Coloración indeterminada

POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Placa mal lavada	Lavar la placa al menos 6 veces con 400µL/pocillo de tampón de lavado. Puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado dependiendo del lavador. Deberá dejarse escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
Contaminación entre los pocillos de ELISA	Pasar la muestra por la pipeta y mezclarla con cuidado para reducir riesgos al mínimo.
El equipo/componentes ha(n) caducado	Tener cuidado de utilizar el equipo antes de la fecha de caducidad. Asegurarse de utilizar el estándar y el concentrado 100X de conjugado en los tres meses siguientes a la fecha de disolución.
La solución enzimática de sustrato está contaminada	Desechar el sustrato si toma un color azul. Utilizar depósitos de reactivos limpios.
Se ha mezclado el plasma en tubos de centrifugado antes de su recogida	Recoger con mucho cuidado las muestras de plasma por encima del gel sin antes pipetear arriba y abajo y teniendo cuidado de no interferir con el material de la superficie del gel.

Valores de densidad óptica de estándares bajos

POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Error al diluir el estándar	Asegúrese de preparar correctamente las diluciones del estándar del kit, siguiendo las instrucciones del prospecto.
Error al pasar por la pipeta	Asegurarse de que las pipetas estén calibradas y de utilizarlas siguiendo las instrucciones del fabricante.
Temperatura de incubación demasiado baja	La incubación del ELISA deberá realizarse a temperatura ambiente, de 17°C a 27°C.
Incubación demasiado corta	La incubación de la placa del conjugado, estándares y muestras debe durar 120 ± 5 minutos. La solución enzimática de sustrato debe incubarse en la placa durante 30 minutos.
Filtros de lectura de placas incorrectos	La placa debe leerse a 450 nm con un filtro de referencia de entre 620 y 650 nm.
Los reactivos están demasiado fríos	Todos los reactivos, a excepción del concentrado 100X del conjugado, deberán estar a temperatura ambiente antes de empezar con el análisis. Esto supondrá aproximadamente una hora.
El equipo/componentes han caducado	Tenga cuidado de utilizar el equipo antes de la fecha de caducidad. Asegúrese de utilizar el estándar y el concentrado 100X de conjugado en los tres meses siguientes a la fecha de disolución.

Coloración intensa del fondo

POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Placa mal lavada	Lavar la placa al menos 6 veces con 400µL/pocillo de tampón de lavado. Puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado dependiendo del lavador. Deberá dejarse escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
Temperatura de incubación demasiado elevada	La incubación del ELISA deberá realizarse a temperatura ambiente, de 17°C a 27°C.
El equipo/componentes han caducado	Tenga cuidado de utilizar el equipo antes de la fecha de caducidad. Asegúrese de utilizar el estándar y el concentrado 100X de conjugado en los tres meses siguientes a la fecha de disolución.
La solución enzimática de sustrato está contaminada	Deseche el sustrato si toma un color azul. Utilice depósitos de reactivos limpios.

Curva estándar no lineal y diferencias entre duplicados

POSIBLE CAUSA	SOLUCIÓN
Placa mal lavada	Lavar la placa al menos 6 veces con 400µL/pocillo de tampón de lavado. Puede que sean necesarios más de 6 ciclos de lavado dependiendo del lavador. Deberá dejarse escurrir durante 5 segundos como mínimo entre ciclo y ciclo.
Error al diluir el estándar	Asegurarse de preparar correctamente las diluciones del estándar del kit, siguiendo las instrucciones del prospecto.
Mezclado mal hecho	Mezclar los reactivos bien dándoles la vuelta a los tubos o agitándolos con cuidado antes de dispensarlos sobre la placa.
Trasvase por pipeta fluido o interrupción durante la preparación del análisis	Las muestras deben mezclarse con los estándares de forma fluida, sin interrupciones. Todos los reactivos deben estar preparados antes de dar comienzo al ensayo.

En el CDROM que contiene el manual técnico y la descripción de los productos se incluye un vídeo que muestra cómo llevar a cabo el análisis y que proporciona soluciones a la mayoría de los posibles problemas técnicos. Solicítelo gratuitamente a Cellestis o a su distribuidor habitual.

12. BIBLIOGRAFÍA

En gnowee™ la biblioteca QuantiFERON de referencias, disponible en www.gnowee.net, se encuentra una lista completa de referencias QFT.

1. **Andersen, P., et al.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. **Balcells, M.E., et al.** A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis.* 2008. 12; 645-52.
3. **Bartalesi, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2009. 33; 586-93.
4. **Bocchino, M., et al.** 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.* 2008. 27; 907-13.
5. **Brock, I., et al.** Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res.* 2006. 7; 56.
6. **Chun, J.K., et al.** 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.* 2008. 62; 389-94.
7. **Connell, T.G., et al.** A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. **Detjen, A.K., et al.** 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.* 2007. 45; 322-8.
9. **Diel, R., et al.** Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2009. 135; 1010-8.
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** 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.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2009. 198; 33-7.
17. **Kang, Y.A., et al.** 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.* 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.
22. **Manuel, O., et al.** Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007. 7; 2797-801.
23. **Matulis, G., et al.** Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann Rheum Dis.* 2007. 67; 84-90.
24. **Mirtskhulava, V., et al.** Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 513-519.
25. **Nakaoka, H., et al.** Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis.* 2006. 12; 1383-8.
26. **Pai, M., et al.** Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. *JAMA.* 2005. 293; 2746-55.

27. **Ponce de Leon, D., et al.** 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.* 2008. 35; 776-81.
28. **Richeldi, L., et al.** Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur Respir J.* 2008. 32; 524-5.
29. **Rothel, J.S. and Andersen, P.** Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005. 3; 981-93.
30. **Schoepfer, A.M., et al.** Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol.* 2008. 103; 2799-806.
31. **Silverman, M.S., et al.** Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin Biochem.* 2007. 40; 913-5.
32. **Stebler, A., et al.** Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008. 29, 681-3.

12. ASISTENCIA TÉCNICA

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con:

Cellestis International Pty Ltd: Teléfono: +61 3 8527 3500
 Fax: +61 3 9568 6623
 Email: techsupport@cellestis.com

Cellestis GmbH: Teléfono: +49 6151 428 59-0
 (Europa) Fax: +49 6151 428 59-110
 Email: techsupport@cellestis.com

Sitio web: www.cellestis.com

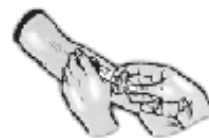
Otros países:

País	Número gratuito
Australia	9001 5776
Austria	0800 8020034
Bélgica	0800 75351
Francia	0800911164
Alemania	0800 182 7452
Irlanda	1800 550 417
Países Bajos	0800 022 5340
Nueva Zelanda	0800 44240
Suiza	0800 561 802
Reino Unido	0800 680 0630

13. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

ESTADIO 1: INCUBACIÓN DE LA SANGRE

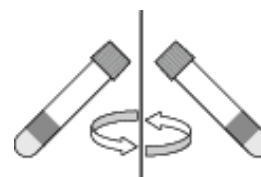
1. Recoger la sangre del paciente en los tubos y mezclar el contenido agitando diez (10) veces aplicando únicamente la fuerza que es necesaria para estar seguro de que toda la superficie interna del tubo está cubierta de sangre a fin de solubilizar el antígeno en las paredes del tubo.



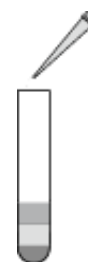
2. Colocar los tubos **de pie** a 37°C entre 16 y 24 horas



3. Después de estar en el incubador, centrifugarlos de 5 a 15 minutos a 2000 - 3000g RCF (g) para separar el plasma de los glóbulos rojos.



4. Después de centrifugar, extraer el plasma con la pipeta. Antes de esta operación, es absolutamente necesario no pipetear hacia arriba y hacia abajo y no mezclar el plasma en ningún caso.



ESTADIO 2: ELISA PARA CUANTIFICAR IFN- γ

1. Equilibrar los componentes de ELISA, excepto el concentrado 100X del conjugado, a temperatura ambiente al menos durante 60 minutos.

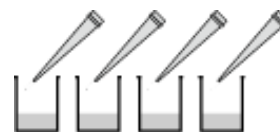


2. Disolver el equipo estándar en 8,0 UI/ml con agua destilada o deionizada. Preparar cuatro (4) diluciones de estándares.

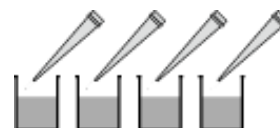


3. Disolver el concentrado 110X de conjugado liofilizado con agua deionizada o destilada.

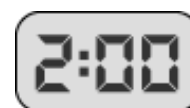
4. Preparar conjugado con diluyente verde y añadir 50 μ L a cada uno de los pocillos.



5. Añadir 50 μ l de las muestras de plasma y 50 μ l de estándar a los pocillos correspondientes. Mezclar utilizando el agitador.

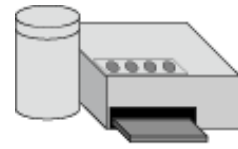


6. Incubar durante 120 minutos a temperatura ambiente.

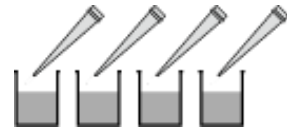


ESTADIO 2: ELISA PARA CUANTIFICAR IFN- γ (continuación)

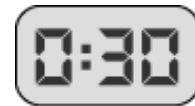
5. Lavar los pocillos al menos 6 veces con 400 μ l/pocillo de tampón de lavado.



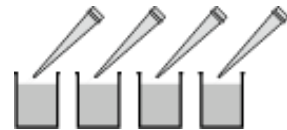
8. Añadir a los pocillos 100 μ l de solución enzimática de sustrato. Mezclar utilizando el agitador.



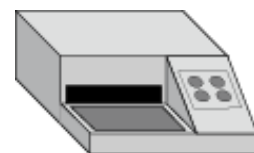
9. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.



10. Añadir 50 μ l de solución de paro a todos los pocillos. Mezclar utilizando el agitador.



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



12. Analizar los resultados.



14. CAMBIOS SIGNIFICATIVOS

Los cambios significativos de esta Edición (05990301G – Julio del 2011) del Folleto Ilustrativo QFT se relacionan en la tabla de abajo:

Apartado	Página	Cambio(s)
5. Recogida y manipulación de muestras	9	Corrección del proceso de agitación del tubo.
6. Instrucciones de uso	10	Corrección de los procesos de manipulación de tubos que contengan sangre.
6. Instrucciones de uso	12	Corrección de los procesos de manipulación de muestras de plasma.
10. Información técnica	23	Suplemento: “Se ha mezclado el plasma en tubos de centrifugado antes de su recogida”.
12. Asistencia técnica	26	Nueva dirección electrónica de la Asistencia Técnica.



Fabricado para:
Cellestis Limited (Australia) and Cellestis GmbH (Europa)
Level 1, Office Tower 2, Chadstone Centre
1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia
Teléfono (Aust) +61 3 8527 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Sitio web: www.cellestis.com

No. de doc.: 05990301G
Julio 2011



EC	REP
----	-----

Representante autorizado:
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Alemania