

QuantiFERON[®]-TB **Gold**

**Le test IFN-gamma sur sang total mesure de réponses aux
antigènes peptidiques ESAT-6, CFP-10 & TB7.7**

NOTICE
D'EMPLOI

Pour usage diagnostique *in vitro*



TABLE DES MATIÈRES

1. APPLICATION	2
2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST	2
Principes de l'analyse	4
Temps requis pour la conduite de l'analyse	4
3. RÉACTIFS ET STOCKAGE	5
Matériel nécessaire (mais non fourni)	6
Instructions de stockage	6
Tubes pour prélèvement de sang	6
Réactifs de kit	6
Réactifs reconstitués et non utilisés	6
4. MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS	7
Mises en garde	7
Précautions	8
5. ÉCHANTILLONNAGE SANGUIN ET MANIPULATION	9
6. MODE D'EMPLOI	10
1 ^{ère} étape - Incubation du sang et prélèvement du plasma	10
2 ^{ème} étape - Dosage IFN - γ humain par ELISA	11
7. CALCULS ET INTERPRÉTATIONS DU TEST	17
Génération d'une courbe standard	17
Contrôle de qualité du test	18
Interprétation des résultats	19
8. LIMITES	23
9. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE	23
10. INFORMATIONS TECHNIQUES	26
Résultats indéterminés	26
Échantillons de plasma coagulés	26
Dépannage ELISA	27
Coloration non spécifique	27
Valeurs de lecture des standards de faible densité optique	27
Forte coloration de fond	28
Courbe standard non linéaire et variabilité double	28
11. BIBLIOGRAPHIE	29
12. SERVICE TECHNIQUE	31
13. PROCÉDURE DE TEST ABRÉGÉE	32
14. IMPORTANTES MODIFICATIONS	35

1. APPLICATION

QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT[®]) est un test de diagnostic *in vitro* faisant appel à un cocktail de peptides simulant les protéines ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4) en vue de stimuler les cellules de sang entier héparinisé. La détection d'interféron- γ (IFN- γ) à l'aide du test immunologique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sert à identifier les réactions *in vitro* aux antigènes peptidiques associés à l'infection au *Mycobacterium tuberculosis*.

Le QFT est un test indirect de dépistage de l'infection au *M. tuberculosis* (y compris la maladie) destiné à être utilisé conjointement à d'autres mesures d'évaluation des risques, radiographie et autres procédés médicaux et diagnostiques.

2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

La tuberculose est une maladie contagieuse causée par une infection due aux mycobactéries du complexe tuberculeux (*M. tuberculosis*) qui se transmet de façon typique par des gouttelettes évaporées en noyaux de condensation (droplet nuclei) provenant de patients atteints de tuberculose. Une personne ayant contracté l'infection récemment peut tomber malade de tuberculose en quelques semaines ou mois, mais la plupart des patients contaminés ne souffrent pas. L'infection tuberculeuse latente (Latent tuberculosis infection, LTBI), est une maladie asymptomatique non contagieuse qui persiste chez certains patients susceptibles de développer une tuberculose après des mois ou même des années. Le but essentiel du diagnostic de la LTBI est d'évaluer la nécessité d'un traitement médical pour prévenir la tuberculose. Jusqu'il y a peu de temps, le test cutané à la tuberculine (tuberculin skin test, IDR) était la seule méthode disponible pour le diagnostic de la LTBI. La sensibilité cutanée à la tuberculine apparaît entre 2 à 10 semaines post infection. Cependant, certains patients contaminés, y compris ceux présentant tout un éventail de maladies qui entravent les fonctions immunitaires, mais aussi d'autres patients ne présentant pas ces affections, ne répondent pas à la tuberculine. Au contraire, certains patients non susceptibles d'être atteints d'infection aux *M. tuberculosis* présentent une sensibilité à la tuberculine et ont des résultats de IDR positifs après vaccination au bacille Calmette-Guérin (BCG), à la suite d'une infection par des mycobactéries autres que celles du complexe *M. tuberculosis*, ou bien en raison d'autres facteurs indéterminés.

Il faut faire une claire distinction entre l'infection tuberculeuse latente (LTBI) et la tuberculose elle-même, une maladie à déclaration obligatoire affectant le plus souvent les poumons et le tractus respiratoire inférieur, bien que d'autres organes puissent également être touchés. Le diagnostic de la tuberculose est basé sur des données historiques, physiques, radiologiques, histologiques et mycobactériologiques.

Le test QFT est un test basé sur le principe de la réponse immunitaire médiée par les cellules (Cell Mediated Immune, CMI) aux antigènes peptidiques simulant les protéines mycobactériennes. Ces protéines, ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4), sont absentes de toutes les souches de BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses, à l'exception de *M. kansasii*, *M. szulgai* and *M. marinum*.¹ Le sang de patients contaminés par des organismes du complexe *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) présente en règle générale des lymphocytes capables de reconnaître les antigènes mycobactériens. Ce processus de reconnaissance implique la génération et la sécrétion de cytokine, IFN- γ . La détection et la quantification subséquente d'IFN- γ constitue le principe du test.

Les antigènes utilisés dans le test QFT sont un cocktail de peptides stimulant les protéines ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4). De nombreuses études ont mis en évidence que ces antigènes peptidiques stimulent des réponses IFN- γ dans les cellules T de patients contaminés au *M. tuberculosis*, mais que ce n'est pas le cas chez des patients vaccinés au BCG qui ne présentent pas de maladie ou qui ne sont pas à risque pour une LTBI.¹⁻³² Cependant, les réponses IFN- γ peuvent être potentiellement réduites par des traitements médicaux ou bien par des maladies qui portent atteinte aux fonctions immunitaires. Des patients souffrant d'autres infections mycobactériennes peuvent également présenter une sensibilité à ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4) vu que les gènes codant ces protéines sont présents dans *M. kansasii*, *M. szulgai* and *M. marinum*.^{1,23} Ainsi, le test QFT représente un auxiliaire de grande utilité pour diagnostiquer une infection au complexe *M. tuberculosis* chez des patients malades.

Un résultat positif corrobore le diagnostic de la tuberculose; cependant, les infections dues à d'autres mycobactéries (par ex. *M. kansasii*) peuvent également aboutir à des résultats positifs. D'autres examens médicaux et diagnostiques sont nécessaires pour confirmer ou exclure la tuberculose.

Principes de l'analyse

Le système QFT fait appel à des tubes spéciaux pour le prélèvement du sang entier. L'incubation du sang s'effectue dans les tubes pendant 16 à 24 heures. Ensuite, le plasma est prélevé et analysé pour détecter la présence d'IFN- γ produit en réponse aux antigènes peptidiques.

Le test QFT s'effectue en deux paliers. Premièrement, le sang entier est prélevé dans chacun des tubes de QFT qui comprennent un tube de contrôle nul, un tube antigène TB et un tube mitogène optionnel.

Le tube mitogène peut être utilisé dans le test QFT comme contrôle positif. Ceci peut être particulièrement justifié lorsqu'il subsiste un doute quant à l'état du système immunitaire du patient en question. Le tube mitogène peut aussi servir de contrôle pour la manipulation correcte des échantillons de sang et leur incubation.

Les tubes doivent être incubés à 37°C le plus rapidement possible et au plus tard dans les 16 heures consécutives au prélèvement. Après une durée d'incubation de 16 à 24 heures, les tubes sont centrifugés, le plasma recueilli et la quantité d'IFN- γ (UI/ml) mesurée avec la méthode ELISA.

Un test est considéré comme positif pour toute réponse d'IFN- γ au tube antigène TB significativement supérieure à la valeur zéro de IFN- γ UI/ml. S'il est utilisé, l'échantillon de plasma stimulé par mitogène sert de contrôle positif IFN- γ pour chaque spécimen analysé. Une faible réponse au mitogène (<0,5 UI/ml) indique un résultat indéterminé lorsqu'un échantillon de sang a une réponse négative aux antigènes TB. Cette constellation peut apparaître en présence de lymphocytes insuffisants, de lymphocytes d'activité réduite due à une manipulation inadéquate des échantillons, à un remplissage/une agitation incorrect/e du tube mitogène ou bien à l'inaptitude des lymphocytes du patient à générer de l'IFN- γ . L'échantillon nul corrige la coloration de fond non spécifique, les effets d'anticorps hétérophiles⁷, ou bien les valeurs d'IFN- γ non spécifiques dans les échantillons de sang. Le niveau de IFN- γ du tube de valeur zéro est déduit du niveau IFN- γ du tube TB antigène et du tube mitogène (s'il est utilisé).

Temps requis pour la conduite de l'analyse

Le temps requis pour la conduite de l'analyse QFT est estimé ci-dessous; le temps nécessaire pour tester des échantillons multiples groupés en lots est également indiqué:

Incubation à 37°C des tubes de sang:

16 à 24 heures

ELISA:

Env. 3 heures par plaque ELISA

- <1 heure de travail
- Ajouter 10 à 15 minutes pour chaque plaque supplémentaire

3. RÉACTIFS ET STOCKAGE

Tubes de prélèvement du sang de tuberculose et de contrôle antigène

Référence catalogue : T0590-0301

- | | |
|--|-------------|
| 1. Contrôle zéro (bouchon gris) | 100 x tubes |
| 2. TB antigène (bouchon rouge) | 100 x tubes |
| 3. Contrôle mitogène (bouchon pourpre) | 100 x tubes |

REMARQUE: Les tubes sont également disponibles dans d'autres configurations:

(Cat. n°. T0590-0201) 100 x tubes de contrôle nul, 100 x tubes TB antigène

(Cat. n°. T0593-0201) 100 x tubes contrôle mitogène

Tubes Haute Altitude (se référer à la section 5)

(Cat n°. T0590-0501): (pour haute altitude) 100 x tubes de contrôle nul, 100 x tubes antigène TB

(Cat n°. T0590-0505): (pour haute altitude) 100 x tubes de contrôle nul, 100 x tubes antigène TB & 100 x tubes de contrôle mitogène

(Cat n°. T0593-0501): (pour haute altitude) 100 x tubes de contrôle mitogène

Composants ELISA-

Composants ELISA	N° de commande : 0594-0201	N° de commande : 0594-0501
	Kit de 2 plaques	Référence pack labo
Barrettes de microplaque sensibilisées avec un anticorps monoclonal de murin anti-IFN- γ humain	2 plaques à 96 puits	20 plaques à 96 puits
IFN- γ humain standard, lyophilisé (contient un IFN- γ humain recombinant, caséine bovine, 0,01 % w/v (poids/volume) thimérosal)	1 x flacon (après reconstitution = 8 UI/mL)	10 x flacon (après reconstitution = 8 UI/mL)
Diluant vert (GD) (contient de la caséine bovine, du sérum de souris, 0,01% w/v thimérosal)	1 x 30 mL	10 x 30 mL
Concentré de conjugué (100 X), lyophilisé (HRP anti- IFN- γ humain (de murin), contient 0,01% w/v thimérosal)	1 x 0,3mL (après reconstitution)	10 x 0,3mL (après reconstitution)
Concentré 20 X de tampon de lavage (pH 7,2, contient 0,01 % w/v thimérosal)	1 x 100mL	10 x 100mL
Solution de substrat d'enzyme (contient H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' tétraméthylebenzidine)	1 x 30mL	10 x 30mL
Solution de stoppage d'enzyme (contient 0,5M H ₂ SO ₄)	1 x 15mL	10 x 15mL

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Incubateur 37°C. CO₂ non nécessaire.
- Pipettes à volume variable étalonnées de 10µl à 1000µl avec embouts jetables.
- Pipettes multicanaux étalonnées d'un volume de 50µl et de 100µl avec embouts jetables.
- Agitateur pour microplaque.
- Eau déionisée ou distillée – 2 l.
- Laveur de microplaque (laveur automatique recommandé).
- Lecteur de microplaque équipé de filtres de 450 nm et de filtres de référence de 620 nm à 650 nm.

Instructions de stockage

Tubes de prélèvement de sang

- Stocker les tubes de prélèvement de sang à une température comprise entre 4°C et 25°C.

Réactifs de kit

- Stocker le kit à une température comprise entre 2°C et 8°C.
- Veiller toujours à mettre la solution de substrat d'enzyme à l'abri de la lumière directe.

Réactifs reconstitués et non utilisés

Pour les instructions relatives à la reconstitution des réactifs, se reporter à la préparation des réactifs au chapitre 6 (page 11).

- Le kit standard reconstitué peut être conservé jusqu'à 3 mois s'il est stocké à une température entre 2°C et 8°C.
 - *Noter la date de reconstitution du kit standard.*
- Une fois reconstitué, le concentré 100 X de conjugué doit être replacé en stockage entre 2°C et 8°C et doit également être utilisé dans les 3 mois.
 - *Noter la date de reconstitution du conjugué.*
- Le conjugué concentré prêt à l'emploi doit être utilisé dans les 6 heures suivant sa préparation.
- Le tampon de lavage concentré prêt à l'emploi peut être conservé jusqu'à 2 semaines à température ambiante.

4. MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Mises en garde

- Un résultat négatif au test QFT n'exclut pas la possibilité d'une infection au *M. tuberculosis* ou de la tuberculose: un résultat faussement négatif peut être imputable au stade de l'infection (par ex. les échantillons ont été prélevés avant le développement de la réponse immunitaire des cellules), un état comorbide affectant les fonctions immunitaires, manipulation incorrecte des tubes de prélèvement du sang consécutive à la ponction veineuse, performance erronée de l'analyse ou bien d'autres variables immunologiques.
- Un résultat positif au test QFT ne peut pas être considéré comme une base unique et définitive pour déterminer une infection au *M. tuberculosis*. Une performance erronée de l'analyse peut conduire à une réponse faussement positive.
- Un résultat positif au test QFT doit être corroboré par des examens médicaux plus poussés et d'une évaluation diagnostique de l'éventualité d'une affection tuberculeuse active (e.g. frottis et culture AFB, radiographie du thorax).
- Alors que les antigènes ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4) sont absents de toutes les souches de BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses connues, il est possible qu'un résultat positif au test QFT soit imputable à une infection par *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. Si les soupçons envers de telles infections sont justifiés, il y a lieu de procéder à des tests supplémentaires.

Précautions

- **Pour usage diagnostique *in vitro*.**
- **Dangereux:** La solution de substrat d'enzyme contient de la 3,3',5,5' tetraméthylbenzidine dangereuse en cas d'ingestion, d'inhalation et de contact avec la peau. Irrite la peau et les yeux. Agent mutagène. Protéger les yeux, porter des gants et manipuler comme un agent potentiellement carcinogène.
- **Dangereux:** La solution de stoppage d'enzyme contient du H₂SO₄ qui est dangereux en cas d'ingestion, de contact avec les yeux, avec la peau, et d'inhalation. Protéger les yeux, porter des gants et des vêtements normaux de protection pour laboratoire. Si la solution de stoppage entre en contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau et consulter un médecin.
- **Dangereux:** L'ingestion d'**IFN-γ Standard et de concentré 100X de conjugué** peuvent causer de l'inconfort et une irritation de la peau. Porter des gants et des vêtements normaux de protection pour laboratoire.
- **Manipuler le sang humain comme étant potentiellement infectieux.** Observer les directives applicables relatives à la manipulation du sang.
- Le **thimérosol** est utilisé comme agent de conservation dans certains réactifs. Il peut avoir un effet toxique à l'ingestion, l'inhalation ou au contact avec la peau.
- Le **diluant vert (GD)** contient du sérum normal de souris et de la caséine, ce qui peut provoquer des réactions allergiques; éviter tout contact avec la peau.
- Toute dérogation par rapport au texte de la notice d'emploi peut produire des résultats erronés. Veuillez s.v.p. lire attentivement la notice avant l'emploi.
- Ne pas utiliser le kit dans la mesure où un flacon de réactif serait endommagé ou présenterait un défaut d'étanchéité avant l'emploi.
- Ne pas mélanger ou utiliser les réactifs ELISA provenant d'un autre lot de kits QFT.
- Evacuer les réactifs non utilisés et les échantillons biologiques conformément à la législation locale, de l'Etat, et à l'échelon fédéral.
- Ne pas utiliser les tubes de prélèvement du sang ou bien le kit ELISA après la date de péremption.
- S'assurer que le matériel de laboratoire tel que laveurs et lecteurs de plaques ont été calibrés/validés pour utilisation.

5. ÉCHANTILLONNAGE SANGUIN ET MANIPULATION

Le QFT utilise les tubes de prélèvement suivants:

1. Contrôle nul (bouchon gris avec anneau blanc). (A utiliser jusqu'à une altitude de 810 m au-dessus du niveau de la mer)
2. Antigènes TB (bouchon rouge avec anneau blanc). (A utiliser jusqu'à une altitude de 810 m au-dessus du niveau de la mer)
3. Contrôle mitogène (optionnel) (bouchon pourpre avec anneau blanc). (A utiliser jusqu'à une altitude de 810 m au-dessus du niveau de la mer)
4. Contrôle nul (bouchon gris avec anneau jaune). (A utiliser à une altitude entre 1.020 m et 1.875 m)
5. Antigènes TB (bouchon rouge avec anneau jaune). (A utiliser à une altitude entre 1.020 m et 1.875 m)
6. Contrôle mitogène (optionnel) (bouchon pourpre avec anneau jaune). (A utiliser à une altitude entre 1.020 m et 1.875 m)

Les antigènes ont été appliqués et séchés sur les parois internes des tubes de prélèvement sanguin, de sorte qu'il est essentiel de bien mélanger le contenu des tubes avec le sang prélevé. Les tubes doivent ensuite être transférés dans un incubateur à 37°C le plus rapidement possible et au plus tard dans les 16 heures suivant le prélèvement.

Pour obtenir des résultats optimums, respecter les procédures suivantes:

1. Pour chaque sujet, prélever par ponction veineuse 1ml de sang directement dans chacun des tubes de prélèvement sanguin QFT. Cette opération devrait être réalisée par un phlébotomiste expérimenté.
 - Les tubes de prélèvement sanguin QFT standards doivent être utilisés jusqu'à une altitude de 810 mètres. Les tubes de prélèvement sanguin QFT Haute Altitude (HA) doivent être utilisés à des altitudes comprises entre 1.020 et 1.875 mètres.

Si les tubes de prélèvement sanguin QFT sont utilisés à une altitude différente de celles mentionnées ci-dessus ou encore, si le volume de sang prélevé est trop faible, les prélèvements peuvent être effectués au moyen d'une seringue. 1ml de ce sang sera ensuite transféré dans chacun des trois tubes. Pour des raisons de sécurité, il est conseillé d'ôter d'une part, l'aiguille de la seringue et d'autre part, les bouchons des trois tubes QFT tout en veillant à respecter les procédures de sécurité appropriées - et d'ensuite verser 1 ml de sang dans chacun des trois tubes de prélèvement (jusqu'à la ligne de marquage noire sur le côté de l'étiquette du tube). Remettre les bouchons, s'assurer qu'ils sont bien en place et mélanger comme décrit ci-dessous.

- Vu que les tubes de 1ml aspirent le sang assez lentement, dès qu'un tube semble être plein, maintenir celui-ci sur l'aiguille pendant 2 à 3 secondes afin de prélever le volume exact.

Sur le côté du tube, la ligne noire de marquage correspond à un volume de 1ml. Les tubes de prélèvement sanguin QFT sont validés pour une plage de volumes allant de 0,8 à 1,2ml. Si dans un tube, le niveau de sang n'atteint pas

presque la ligne de marquage, il est recommandé de refaire un prélèvement sanguin.

- Si le prélèvement est effectué avec une “aiguille butterfly”, il y a lieu d’utiliser également un tube purgeur pour assurer que la tubulure est remplie de sang avant d’utiliser les tubes QFT.
2. Une fois les tubes remplis, les secouer immédiatement dix (10) fois assez fermement de façon à ce que toute la surface interne du tube soit parfaitement recouverte de sang afin de solubiliser les antigènes sur les parois du tube.
 - Les tubes devraient être à une température comprise entre 17 et 25°C au moment du remplissage.
 - Un mélange trop énergique risque de provoquer une modification du gel et pourrait donner des résultats aberrants.
 3. Etiqueter les tubes de manière adéquate.
 4. Les tubes doivent ensuite être transférés le plus rapidement possible dans un incubateur à 37°C ± 1°C et au plus tard dans les 16 heures suivant le prélèvement. Avant l’incubation, veillez à conserver les tubes à température ambiante (22°C ± 5°C). Ne pas réfrigérer ou congeler les échantillons sanguins.

6. MODE D’EMPLOI

1^{ère} étape – Incubation du sang et récolte du plasma

Matériel fourni

Tubes de prélèvement du sang QFT (se reporter au chapitre 3).

Matériel nécessaire (mais non fourni)

Se reporter au chapitre 3.

Procédure

1. Si le sang n’est pas incubé immédiatement après son prélèvement, les **tubes doivent être remélangés en les retournant 10 fois immédiatement avant l’incubation.**
2. Incuber les tubes **DEBOUT** à 37°C pendant 16 à 24 heures. L’incubateur ne nécessite pas de CO₂ ou d’humidification.
3. Les tubes de prélèvement du sang peuvent être conservés à une température entre 4°C et 27°C jusqu’à 3 jours avant d’être centrifugés.

4. Après incubation des tubes à 37°C, centrifuger les tubes pendant 15 minutes entre 2000 et 3000 RCF (g). Le plug de gel séparera les cellules du plasma. Si ce n'est pas le cas, les tubes doivent être centrifugés une nouvelle fois à une vitesse plus élevée.
 - Il est possible de récolter le plasma sans centrifugation, cependant il est encore plus délicat de récupérer le plasma sans déranger les cellules.
5. **Une fois la centrifugation terminée, les pipettes ne doivent pas être secouées et le plasma ne doit pas être mélangé de quelque manière que ce soit avant d'être recueilli. Veillez à ne faire bouger à aucun moment le liquide à la surface du gel.**
 - Les échantillons de plasma ne doivent être recueillis qu'**à l'aide d'une pipette.**
 - Les échantillons de plasma peut être chargés directement des tubes de prélèvement sanguin centrifugés dans la plaque ELISA QFT, même en cas d'utilisation de stations de travail ELISA automatisées.
 - Les échantillons de plasma peuvent être stockés jusqu'à 28 jours, à une température comprise entre 2°C et 8°C. Si le plasma a été recueilli, il peut être conservé à -20°C sur une longue période.

2^{ème} étape – Dosage IFN- γ humain par ELISA

Matériel fourni

Kit ELISA QFT (Se reporter au chapitre 3).

Matériel nécessaire (mais non fourni)

Se reporter au chapitre 3.

Procédure

1. Tous les échantillons de plasma et les réactifs, excepté le concentré 100X de conjugué, doivent être portés à température ambiante ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) avant l'emploi. Prévoir au moins 60 minutes pour l'équilibration.
2. Retirer du cadre les barrettes superflues, resceller dans la poche en pellicule et restocker au réfrigérateur jusqu'à nouvelle utilisation.

Prévoir au moins une barrette pour les standards de QFT et un nombre suffisant de barrettes pour les sujets testés (se reporter respectivement aux figures 2A & 2B pour les formats à 2 tubes et à 3 tubes). Après l'utilisation, conserver le cadre et le couvercle pour les barrettes restantes.

3. Reconstituer le standard lyophilisé du kit avec le volume d'eau déionisée ou distillée indiqué sur l'étiquette du flacon standard. Mélanger doucement pour minimiser la formation de mousse et obtenir une solubilisation complète. La reconstitution du standard dans le volume indiqué produira une solution d'une concentration de 8,0 UI/ml.
Remarque: Le volume de reconstitution du standard du kit diffèrera d'un lot à l'autre.

Utiliser le standard du kit reconstitué pour produire une série de dilutions à 1 pour 4 de IFN- γ dans du diluant vert (Green Diluent, GD) – se reporter à la figure 1. S1 (standard 1) contient 4 UI/ml, S2 (standard 2) contient 1 UI/ml, S3 (standard 3) contient 0,25 UI/ml, et S4 (standard 4) contient 0 UI/ml (uniquement GD). Les standards doivent être analysés au moins en double.

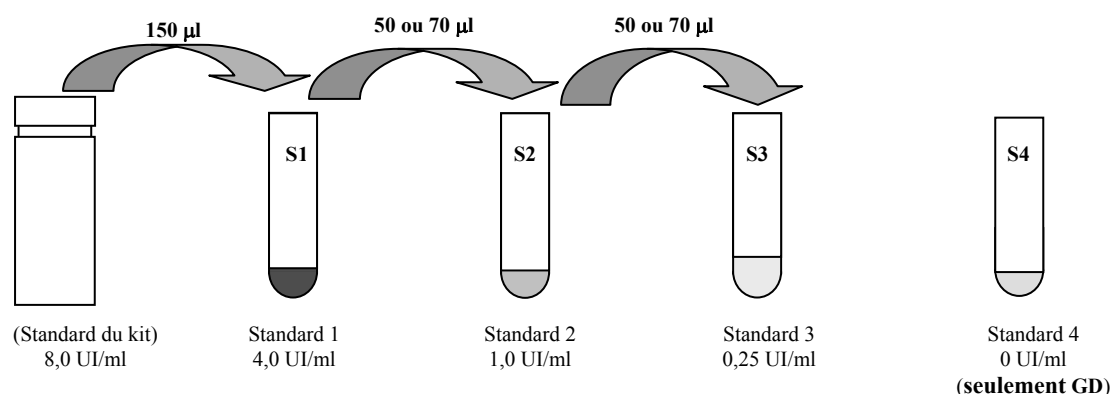
PROCÉDURE RECOMMANDÉE POUR STANDARDS EN DOUBLE

- a. Etiqueter 4 tubes "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Ajouter **150 μ l** de GD à S1, S2, S3, S4.
- c. Ajouter **150 μ l** du standard du kit à S1 et mélanger vigoureusement.
- d. Transvaser **50 μ l** de S1 à S2 et mélanger vigoureusement.
- e. Transvaser **50 μ l** de S2 à S3 et mélanger vigoureusement.
- f. **GD seul** fait fonction de standard zéro (S4).

PROCÉDURE RECOMMANDÉE POUR STANDARDS EN TRIPLE

- a. Etiqueter 4 tubes "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Ajouter **150 μ l** de GD à S1.
- c. Ajouter **210 μ l** de GD à S2, S3, S4.
- d. Ajouter **150 μ l** de standard du kit à S1 et mélanger vigoureusement.
- e. Transvaser **70 μ l** de S1 à S2 et mélanger vigoureusement.
- f. Transvaser **70 μ l** de S2 à S3 et mélanger vigoureusement.
- g. **GD seul** fait fonction de standard zéro (S4).

FIGURE 1. Préparation de la courbe standard



- Préparer des dilutions fraîches de standard de kit pour chaque analyse ELISA
4. Reconstituer le concentré 100X de conjugué lyophilisé avec 0,3ml d'eau déionisée ou distillée. Mélanger doucement afin de minimiser la formation de mousse et d'obtenir la dissolution complète du conjugué.

Le conjugué prêt à l'emploi se prépare en diluant la quantité requise de concentré 100X reconstitué dans du diluant vert (GD) comme indiqué au tableau 1 – Préparation du conjugué.

TABEAU 1. Préparation du conjugué

NOMBRE DE BARRETTES	VOLUME DE CONCENTRÉ 100X DE CONJUGUÉ	VOLUME DE DILUANT VERT (GD)
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

- Mélanger complètement mais avec douceur pour éviter la formation de mousse.
- Restocker immédiatement le concentré 100X de conjugué non utilisé à une température entre 2°C et 8°C.
- Utiliser uniquement du diluant vert (GD).

5. Pour les échantillons de plasma relevés à partir des tubes sanguins qui ont été ensuite congelés et stockés pendant plus de 24 heures avant le test, mélanger soigneusement avant de les ajouter au puit ELISA.
 - Si les échantillons de plasma doivent être ajoutés directement à partir des tubes QFT centrifugés, éviter de mélanger le plasma.
6. Ajouter 50µl de conjugué concentré prêt à l'emploi fraîchement préparé aux puits ELISA en utilisant une pipette multicanaux.
7. Ajouter 50µl d'échantillons de plasma de tests dans les puits correspondants en utilisant une pipette multicanaux (Se reporter au plan recommandé ci-dessous de répartition des échantillons sur la plaque – figures 2A & 2B). Enfin, ajouter 50µl à chaque standard de 1 à 4.

FIGURE 2A. Plan recommandé de répartition sur la plaque des échantillons des tubes nuls & antigènes TB (44 tests par plaque)

	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

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Echantillon 1. plasma de contrôle nul); 1A (Echantillon 1. plasma antigène TB).

FIGURE 2B. Plan recommandé de répartition sur la plaque des échantillons des tubes nuls, antigènes TB & mitogènes (28 tests par plaque)

	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

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
 - 1N (Echantillon 1. plasma de contrôle nul); 1A (Echantillon 1. plasma antigène TB); 1M (Echantillon 1. plasma de contrôle mitogène).
8. Mélanger complètement pendant 1 minute les échantillons de conjugué et de plasma /standards en utilisant un agitateur pour microplaque.
 9. Couvrir chaque plaque d'un couvercle et incuber à température ambiante ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) pendant 120 ± 5 minutes.
 - Mettre les plaques à l'abri de la lumière directe pendant l'incubation.
 10. En cours d'incubation, diluer 1 volume de concentré 20X de tampon de lavage avec 19 volumes d'eau déionisée ou distillée et mélanger vigoureusement. La quantité de concentré 20X de tampon de lavage fournie est suffisante pour préparer 2 L de tampon de lavage prêt à l'emploi.

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

- Un lavage approfondi est très important pour le bon fonctionnement de l'analyse. Veiller que chaque puits soit **rempli à ras bord** de tampon de lavage avant chaque cycle de lavage. Il est recommandé de laisser tremper pendant au moins 5 secondes entre deux cycles.
- Ajouter un désinfectant standard de laboratoire dans le réservoir d'évacuation des effluents et observer les procédures en vigueur relatives à la décontamination de matériaux potentiellement infectieux.

11. Frapper les plaques retournées sur un linge absorbant pour faire couler les résidus de tampon de lavage. Ajouter 100µl de solution de substrat d'enzyme à chaque puits et mélanger vigoureusement avec un agitateur de microplaque.
12. Couvrir chaque plaque d'un couvercle et incuber à température ambiante ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) pendant 30 minutes.
 - Mettre les plaques à l'abri de la lumière directe pendant l'incubation.
13. Après l'incubation de 30 minutes, ajouter dans chaque puits 50µl de solution de stoppage d'enzyme et bien mélanger.
 - Ajouter la solution de stoppage d'enzyme dans les puits selon le même ordre et à peu près au même rythme que le substrat au point 11.
14. Mesurer la densité optique (DO) de chaque puits dans les 5 minutes consécutives au stoppage de la réaction en utilisant un lecteur de microplaque équipé d'un filtre de 450nm et d'un filtre de référence de 620nm à 650nm. Les valeurs DO sont utilisées pour calculer les résultats.

7. CALCULS ET INTERPRÉTATION DES TESTS

Le logiciel d'analyse pour QFT utilisé pour l'analyse des données brutes et le calcul des résultats est disponible auprès de Cellestis. (Veillez à utiliser la dernière version du logiciel en date).

Le logiciel effectue une vérification du contrôle de qualité de l'analyse, génère une courbe standard et fournit un résultat de test pour chaque sujet comme expliqué en détails au paragraphe consacré à l'interprétation des résultats.

La méthode ci-dessous représente un procédé alternatif à l'utilisation du logiciel d'analyse QFT pour déterminer les résultats des tests:

Génération d'une courbe standard

(si le logiciel QFT n'est pas utilisé)

Déterminer les valeurs moyennes DO des répliques du standard de kit sur chaque plaque.

Construire une courbe standard $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$ en traçant plotting le $\log_{(e)}$ de la valeur moyenne DO (axe y) contre le $\log_{(e)}$ de la concentration d'IFN- γ des standards en UI/ml (axe x), en omettant dans ces calculs le standard zéro. Calculer la ligne optimale de la courbe standard par analyse de régression.

Utiliser la courbe standard pour déterminer la concentration d'IFN- γ (UI/ml) pour chacun des échantillons de plasma de test en tenant compte de la valeur de chaque échantillon.

Ces calculs peuvent être effectués en utilisant des logiciels livrés avec les lecteurs de microplaques, avec des logiciels standards de feuilles de calcul ou de statistique (comme Microsoft Excel). Il est recommandé d'utiliser ces logiciels pour effectuer l'analyse de régression, calculer le coefficient de variation (%CV) pour les standards, et le coefficient (r) de corrélation de la courbe standard.

Contrôle de qualité du test

L'exactitude des résultats des tests dépend de la génération d'une courbe standard précise. C'est pourquoi les résultats déduits des standards doivent être examinés avant de pouvoir interpréter les résultats des échantillons de test.

Pour que les résultats de l'analyse ELISA soient valides:

- **La valeur moyenne DO pour le standard 1 doit être $\geq 0,600$.**
- **Le %CV pour les valeurs DO de réplique de standard 1 et le standard 2 doit être $\leq 15\%$.**
- **Les valeurs DO de réplique pour standard 3 et standard 4 ne doivent pas varier de plus de 0,040 unités de DO de leur valeur moyenne.**
- **Le coefficient de corrélation (r) calculé à partir des valeurs moyennes d'absorbance des standards doit être $\geq 0,98$.**

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

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

- **La valeur moyenne DO pour le zéro standard (diluant vert, GD) doit être $\leq 0,150$. Si la valeur DO moyenne est $> 0,150$, il y a lieu de vérifier le processus de lavage des plaques.**

Interprétation des résultats

Les résultats du test QFT sont interprétés sur la base des critères suivants:

REMARQUE: Le diagnostic de la tuberculose ou le diagnostic permettant d'exclure celle-ci en établissant la probabilité d'une infection tuberculeuse latente (LTBI) implique qu'une combinaison de résultats épidémiologiques, historiques, médicaux, et diagnostiques doit être prise en compte dans l'interprétation des résultats du test QFT.

Nul [UI/ml]	Antigène TB moins Nul [UI/ml]	Résultat QFT	Rapport/Interprétation
≤ 8,0	< 0,35	Négatif	Infection au <i>M. tuberculosis</i> improbable
	≥ 0,35 et < 25% de la valeur nulle		
	≥ 0,35 et ≥ 25% de la valeur nulle	Positif¹	Infection au <i>M. tuberculosis</i> probable
> 8,0 ²	n'importe lequel	Indéterminé³	Résultats sont indéterminés pour la réponse à l'antigène TB

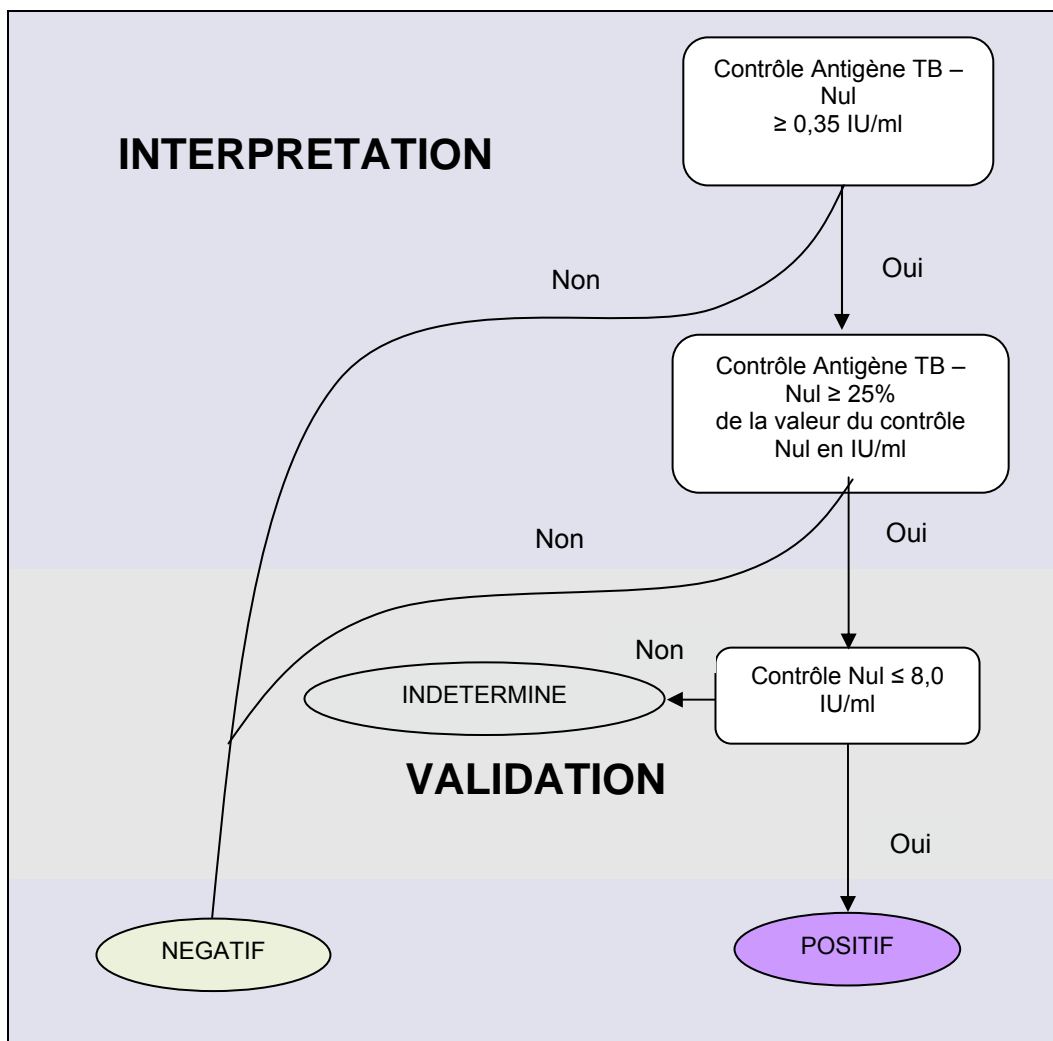
¹ Dans les cas où une infection au *M. tuberculosis* n'est pas soupçonnée, un résultat initialement positif peut être confirmé en retestant les échantillons de plasma originaux en double par la méthode ELISA QFT. Si le test répété de l'une ou des deux répliques s'avère positif, la personne en question doit être considérée comme ayant été testée positivement.

² Dans les études cliniques, moins de 0,25 % des sujets présentaient des niveaux d'IFN- γ > 8,0 UI/ml pour le contrôle nul.

³ Se reporter au chapitre : Dépannage pour établir les causes possibles.

La magnitude des taux d'IFN- γ ne peut pas être mise en corrélation avec le stade ou le degré de gravité de l'infection, avec le niveau de la réponse immunitaire ou avec la probabilité d'une progression vers un état actif de la maladie.

Figure 3. Diagramme Synoptique D'Interprétation De L'Utilisation Des Tubes NUL & ANTIGÈNE TB



<u>Nul</u> [UI/ml]	<u>Antigène TB moins Nul</u> [UI/ml]	<u>Mitogène moins Nul</u> [UI/ml] ¹	Résultat QFT	Rapport/Interprétation
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Négatif	Infection au <i>M. tuberculosis</i> Improbable
	≥ 0,35 et < 25% de la valeur nulle	≥ 0,5		
	≥ 0,35 et ≥ 25% de la valeur nulle	n'importe lequel	Positif²	Infection au <i>M. tuberculosis</i> probable
	< 0,35	< 0,5	Indéterminé³	Résultats sont indéterminés pour la réponse à l'antigène TB
≥ 0,35 et < 25% de la valeur nulle	< 0,5			
> 8,0 ⁴	n'importe lequel	n'importe lequel		

¹ Les réponses au contrôle positif mitogène (et occasionnellement à l'antigène TB) peuvent être situées communément hors de la plage de lecture du lecteur de microplaques. Ceci n'a aucune influence sur les résultats des tests.

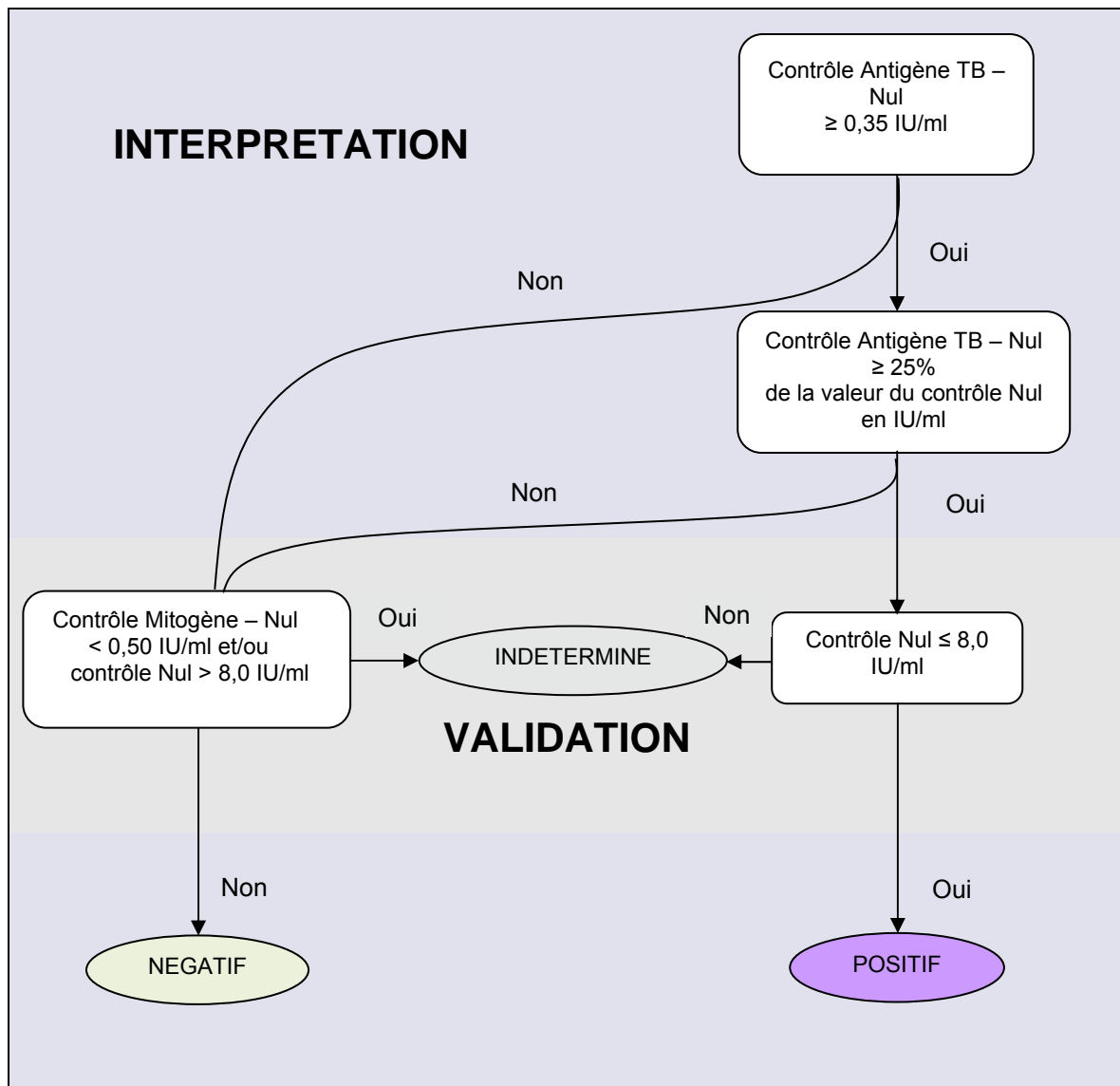
² Dans les cas où une infection au *M. tuberculosis* n'est pas soupçonnée, un résultat initialement positif peut être confirmé en retestant les échantillons de plasma originaux en double par la méthode ELISA QFT. Si le test répété de l'une ou des deux répliques s'avère positif, la personne en question doit être considérée comme ayant été testée positivement.

³ Se reporter au chapitre Dépannage pour établir les causes possibles.

⁴ Dans les études cliniques, moins de 0,25 % des sujets présentaient des niveaux d'IFN-γ > 8,0 UI/ml pour le contrôle nul.

La magnitude des taux d'IFN-γ ne peut pas être mise en corrélation avec le stade ou le degré de gravité de l'infection, avec le niveau de la réponse immunitaire ou avec la probabilité d'une progression vers un état actif de la maladie.

FIGURE 4. Diagramme Synoptique D'Interprétation De L'Utilisation Des Tubes NUL, ANTIGÈNE TB & MITOGÈNE



8. LIMITES

Les résultats des tests QFT doivent être utilisés conjointement avec les données épidémiologiques, l'état actuel des examens médicaux et autres évaluations d'ordre diagnostique spécifiques à chacun des sujets.

Les sujets présentant des valeurs nulles supérieures à 8 UI/ml sont classés comme "indéterminés" du fait qu'une réponse de plus de 25% aux antigènes TB peut être hors de la plage de mesure de l'analyse.

Les résultats non fiables ou indéterminés peuvent être imputables à:

- Des dérogations à la procédure décrite dans la notice d'emploi,
- Des taux excessifs d'IFN- γ en circulation ou bien à la présence d'anticorps hétérophiles,
- Un laps de temps supérieur à 16 heures entre le prélèvement de l'échantillon de sang et le début de l'incubation à 37°C.

9. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Etudes cliniques

A défaut d'un standard définitif pour l'infection tuberculeuse latente (ITBL), il ne peut y avoir d'évaluation pratique d'une estimation de sensibilité et de spécificité pour le QFT. La spécificité du QFT a été approximativement déterminée en évaluant des taux faussement positifs chez les personnes à faible risque (sans facteur de risque connu) d'infection tuberculeuse. La sensibilité a été approximativement déterminée en évaluant des groupes de patients présentant une affection tuberculeuse active confirmée par culture.

Spécificité

Dans une étude effectuée aux Etats-Unis portant sur 866 volontaires, des prélèvements de sang ont été effectués en vue du test QFT, alors qu'un test IDR avait été mis en oeuvre. Les données démographiques et les facteurs de risque de TB ont été déterminés à l'aide d'une enquête standard conduite au moment du test. Parmi les 432 volontaires sans facteurs de risque connus d'infection par *M. tuberculosis*, des résultats de test au QFT et IDR étaient disponibles pour 391 d'entre eux. Aucun d'entre eux n'avait reçu de vaccination au BCG. Une deuxième étude de spécificité a été effectuée avec le QFT au Japon chez des personnes à faible risque dont environ 90% avaient été vaccinées au BCG. Les résultats des deux études de spécificité figurent au tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Specificité du QFT: Résultats de personnes ne présentant pas de risque connu d'infection par *M. tuberculosis*.

ETUDE	Statut BCG ... % de pers. vaccinées	Total des pers. testées	Nb. de tests QFT indéterminés	Nb. de tests QFT positifs / Nb. de tests valides	Specificité du QFT (95% CI)	Nb. de IDR positifs / Nb. de pers. testées	Specificité de IDR* (95% CI)
USA (non publié)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (98-100)	6 / 391	98,5% (97-99)
Japon ¹⁵	~ 90%	168	6	2 / 162	98,8% (95-100)	-	-
TOTAL	-	559	7 / 559 (1,3%)	5 / 552	99,1% (98-100)	-	-

*En se basant sur une valeur seuil IDR de 10 mm auprès de personnes non vaccinées au BCG. Estimation de la spécificité IDR est de 99,1% en prenant une valeur seuil de 15mm.

Sensitivité pour TB active

Les personnes originaires des Etats-Unis, d'Australie et du Japon suspectées d'être atteintes de TB et chez lesquelles une infection par *M. tuberculosis* a été subséquentement déterminée par culture ont été soumises à un test d'évaluation de la sensibilité du QFT. Alors qu'il n'existe pas de standard absolu pour l'infection tuberculeuse latente, (ITBL), la culture microbiologique de *M. tuberculosis* représente une solution de substitution viable, étant donné que les patients présentant la maladie sont, par définition, infectés. Les patients étaient traités depuis moins de 8 jours avant de subir un prélèvement de sang en vue du test au QFT. Le tableau 3 récapitule les résultats des trois groupes de patients constatés positifs par culture de *M. tuberculosis*. La sensibilité globale du QFT à l'affection tuberculeuse active a été de 89% (157/177).

Tableau 3. QFT: Sujets présentant une infection par *M. tuberculosis* confirmée par culture.

ETUDE	Nb. de tests positifs QFT / Nb. de tests valides	Sensibilité du QFT (95% CI)
Patients tuberculeux au Japon ¹⁵	86 / 92	93% (86-97%)
En Australie	24 / 27	89% (70-97%)
Aux USA	47 / 58	81% (68-90%)
TOTAL	157 / 177	89% (83-93%)

Diagnostic de l'ITBL

Plusieurs études démontrant la performance du QFT dans diverses populations exposées au risque de l'ITBL ont été publiées. Les principaux résultats de quelques études sélectionnées sont représentés ci-dessous au tableau 4.

Tableau 4. Etudes publiées sélectionnées sur le QFT dans des populations à risque d'ITBL.

Etude	Total pers. testées	Résultats et conclusions
Indian HCW (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁷	726	Environnement caractérisé par taux de TB très élevés. 40% positifs au QFT pour 41% positifs au IDR positive à 10mm. Forte concordance avec IDR, aucun effet dû au BCG ni d'un côté, ni de l'autre. Deux tests en relation avec facteurs de risque dus à l'âge et à la période active dans le secteur de santé
Danish HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	Prévalence totale de ITBL par QFT était de 4,6% (27/590) chez les séropositifs au VIH ⁺ . Résultats positifs étaient associés avec risques de TB. Deux sujets positifs au QFT ont contracté la TB active en l'espace d'un an. Réponses indéterminées (n=20. 3,4%) étaient significativement associées avec un comptage CD4 <100 / µl
Hospitalized Children Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Les enfants suspectés d'avoir une TB ou ayant une histoire de contact avec la TB ont subi un test au QFT et au IDR. 10,5% de positifs au QFT pour 9,5% de positifs au IDR à 10mm. La coïncidence entre les tests était globalement de 95,2% et de 100% chez les non vaccinés au BCG.
German Contacts (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Les contacts étroits de 15 cas différents indexés ont été testés. 51% étaient vaccinés au BCG, 27% d'origine étrangère. 70% des vaccinés au BCG et 18% de non vaccinés étaient positifs au IDR (5mm), alors que respectivement 9% et 11% étaient positifs au QFT. Le QFT était associé au risque de TB. Le IDR était seulement associé au vaccin BCG.

Beaucoup d'autres publications décrivent la performance de la version antigène liquide moins sensible du QuantiFERON[®]-TB Gold (le précurseur du QFT) et du test QFT. Ces études portent également sur l'utilisation du/des test(s) dans les contacts personnels avec des cas de TB active^{9,11,19,25}, les enfants^{6-10,25,28}, les séropositifs au VIH^{2,5,20}, les professionnels de la santé^{13,26,32}, les immunodéprimés^{3,4,22,23,27,30,31}, de même que les personnes suspectées être porteuses d'une infection TB^{7,8,10,18} et les personnes à faible risque¹⁵.

Répétabilité et effet du IDR sur le test subséquent au QFT.

Comme partie de l'étude de spécificité effectuée aux Etats-Unis, un sous-groupe de volontaires a été retesté entre 4 et 5 semaines après les tests originaux QFT et IDR. Des résultats au test QFT étaient disponibles pour 260 recrues aux deux points temporels et le niveau de coïncidence était de 99,6% (259/260). Le fait qu'un test IDR ait été effectué au préalable, n'a pas induit de réponses positives au test QFT.

10. INFORMATIONS TECHNIQUES

Résultats indéterminés

Les résultats indéterminés demeurent exceptionnels et peuvent être imputables soit au fait que le test porte sur le statut immun du sujet, soit à un certain nombre de facteurs d'ordre technique:

- Un laps de temps supérieur à 16 heures entre le prélèvement de l'échantillon de sang et le début de l'incubation à 37°C.
- Stockage du sang hors de la plage de températures recommandée (22°C ± 5°C).
- Tubes de prélèvement du sang insuffisamment mélangés.
- Lavage insuffisant de la plaque ELISA.

Si des facteurs techniques relatifs au prélèvement et à la manipulation des échantillons de sang sont soupçonnés être à l'origine de problèmes, répéter intégralement le test QFT sur un nouvel échantillon de sang. Une répétition de l'analyse ELISA de plasmas stimulés peut être effectuée si un lavage inadéquat ou toute autre dérogation à la procédure normale du test ELISA sont soupçonnés être à l'origine d'un problème. Il ne faut pas s'attendre à ce que les tests à résultats indéterminés dus à de faibles valeurs mitogènes ou à des valeurs nulles élevées changent lorsqu'ils sont répétés, à moins qu'une erreur ait été commise dans la conduite du test ELISA. Les résultats indéterminés doivent être protocolés tels quels. Les médecins peuvent décider soit de prélever un nouvel échantillon, soit d'avoir recours à d'autres méthodes.

Échantillons de plasma coagulés

Si des caillots de fibrine apparaissent dans des échantillons de plasma stockés à long terme, centrifuger les échantillons pour faire sédimenter les caillots et faciliter ainsi le pipettage du plasma.

Dépannage ELISA

Coloration non-spécifique

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Lavage incomplet de la plaque.	Laver la plaque au moins 6 fois avec 400µl/puits de tampon de lavage. Selon le laveur utilisé, plus de 6 cycles de lavage peuvent être nécessaires. Prévoir de laisser tremper au moins 5 secondes entre les cycles de lavage.
Contamination croisée des puits ELISA.	Pipeter et mélanger avec soin les échantillons pour minimiser les risques.
Le kit / composants ont dépassé la date de péremption.	Veiller à utiliser le kit avant la date de péremption. Veiller à utiliser le standard et le concentré 100X de conjugué reconstitué dans les trois mois à compter de la date de reconstitution.
La solution de substrat d'enzyme est contaminée.	Evacuer le substrat en cas de coloration bleue. Veiller à utiliser des réservoirs de réactifs propres.
Le plasma a été mélangé dans les tubes à centrifuger avant la récolte.	S'assurer que les échantillons de plasma sont prélevés avec soin au-dessus du gel sans pipetter de haut en bas et en prenant soin de ne pas remuer le matériel à la surface du gel.

Valeurs de lecture des standards de faible densité optique

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Erreur de dilution du standard.	Veiller à ce que les dilutions du standard de kit soient préparées correctement et conformément à la notice d'emploi.
Erreur de pipettage.	Veiller à ce que les pipettes soient calibrées et utilisées conformément aux instructions du fabricant.
Température d'incubation trop basse.	Incubation du test ELISA doit être effectuée à température ambiante entre 17°C et 27°C.
Temps d'incubation trop court.	L'incubation de la plaque contenant le conjugué, les standards et les échantillons doit durer 120 ± 5 minutes. La solution de substrat d'enzyme est incubée sur la plaque pendant 30 minutes.
Filtre du lecteur de plaque est incorrect.	La plaque doit être lue à 450 nm avec un filtre de référence entre 620 et 650 nm.
Réactifs sont trop froids.	Tous les réactifs, à l'exception du concentré 100X de conjugué, doivent être portés à température ambiante avant de commencer l'analyse. Cette opération dure environ une heure.
Kit / composants ont dépassé la date de péremption.	Veiller à utiliser le kit avant la date de péremption. Veiller à utiliser le standard et le concentré 100X de conjugué reconstitué dans les trois mois à compter de la date de reconstitution.

Forte coloration de fond

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Lavage incomplet de la plaque.	Laver la plaque au moins 6 fois avec 400µl/puits de tampon de lavage. Selon le laveur utilisé, plus de 6 cycles de lavage peuvent être nécessaires. Prévoir de laisser tremper au moins 5 secondes entre les cycles de lavage.
Température d'incubation trop élevée.	L'incubation du test ELISA doit être effectuée à température ambiante entre 17°C et 27°C.
Le kit / composants ont dépassé la date de péremption.	Veiller à utiliser le kit avant la date de péremption. Veiller à utiliser le standard et le concentré 100X de conjugué reconstitué dans les trois mois à compter de la date de reconstitution.
La solution de substrat d'enzyme est contaminée.	Evacuer le substrat en cas de coloration bleue. Veiller à utiliser des réservoirs de réactifs propres.

Courbe standard non linéaire et variabilité double

CAUSE POSSIBLE	SOLUTION
Lavage incomplet de la plaque.	Laver la plaque au moins 6 fois avec 400µl/puits de tampon de lavage. Selon le laveur utilisé, plus de 6 cycles de lavage peuvent être nécessaires. Prévoir de laisser tremper au moins 5 secondes entre les cycles de lavage.
Erreur de dilution du standard.	Veiller à ce que les dilutions du standard de kit soient préparées correctement et conformément à la notice d'emploi.
Mélange insuffisant.	Mélanger complètement les réactifs par inversion ou en les agitant doucement avant de les ajouter sur la plaque.
Technique de pipetage incohérente ou bien interruption pendant la préparation de l'analyse.	L'addition de l'échantillon et du standard doit être effectuée de façon continue. Tous les réactifs doivent être préparés avant de commencer l'analyse.

Un film video sur le processus d'analyse et une solution à la plupart des problèmes d'ordre technique se trouvent dans l'Information sur le produit et dans le CD-ROM contenant le guide technique et sont disponibles gratuitement auprès de Cellestis ou bien par l'intermédiaire de votre distributeur.

11. BIBLIOGRAPHIE

Vous trouverez une liste exhaustive des ouvrages de référence sur le QFT sur gnowee™ - la librairie de référence QuantiFERON, disponible sur le site: www.gnowee.net

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 IDR 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 *MycobacterUIm 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.** *MycobacterUIm 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 *MycobacterUIm 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. SERVICE TECHNIQUE

Pour le service technique veuillez s.v.p. contacter :

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

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

Site Web: www.cellestis.com

Autres pays :

Pays	Numéro vert
Australie	9001 5776
Autriche	0800 8020034
Belgique	0800 75351
France	0800911164
Allemagne	0800 182 7452
Irlande	1800 550 417
Pays-Bas	0800 022 5340
Nouvelle Zélande	0800 44240
Suisse	0800 561 802
Royaume-Uni	0800 680 0630

13. PROCÉDURE DE TEST ABRÉGÉE

ETAPE 1 – INCUBATION DU SANG

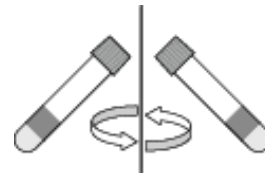
1. Recueillir le sang du patient dans les tubes de prélèvement et mélanger en les agitant dix (10) fois juste assez fermement pour que la surface interne du tube soit complètement recouverte de sang afin de solubiliser les antigènes sur les parois du tube.



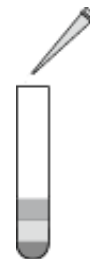
2. Incuber les tubes **verticalement** à 37°C pendant 16 à 24 heures.



3. Après l'incubation, centrifuger les tubes pendant 15 minutes de 2000 à 3000g RCF (g) pour séparer le plasma et les globules rouges.

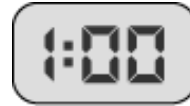


4. Une fois la centrifugation terminée, recueillir le plasma à l'aide de la pipette. En aucun cas, les pipettes ne doivent être secouées ni le plasma mélangé avant que celui-ci ne soit recueilli.



ETAPE 2 – Dosage IFN- γ par ELISA

1. Equilibrer les composants ELISA, à l'exception du concentré 100X de conjugué, à température ambiante pour au moins 60 minutes.

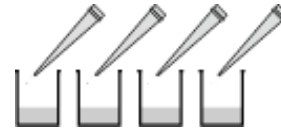


2. Reconstituer l'IFN- γ humain recombinant standard à 8,0 UI/ml avec de l'eau distillée ou déionisée. Préparer quatre (4) dilutions standard.

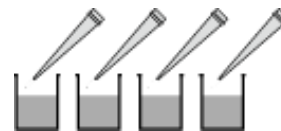


3. Reconstituer le concentré 100X de conjugué lyophilisé avec de l'eau distillée ou déionisée.

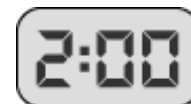
4. Préparer le conjugué en le diluant (diluant vert, GD) et ajouter 50 μ l à chaque puits.



5. Ajouter 50 μ l d'échantillon de plasma test et 50 μ l de standard dans les puits correspondants. Mélanger avec l'agitateur.

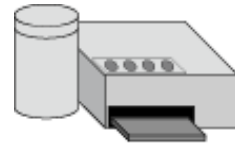


6. Incuber pendant 120 minutes à température ambiante.

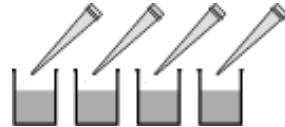


ETAPE 2 – Dosage IFN- γ par ELISA (suite)

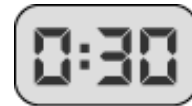
7. Laver les puits au moins 6 fois avec 400 μ l de tampon de lavage.



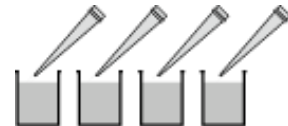
8. Ajouter dans les puits 100 μ l de solution de substrat d'enzyme. Mélanger à l'agitateur.



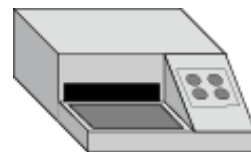
9. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.



10. Ajouter 50 μ l de solution de stoppage dans tous les puits. Mélanger à l'agitateur.



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



12. Analyser les résultats.



14. IMPORTANTES MODIFICATIONS

Toutes les modifications significatives effectuées dans la présente version (05990301G – Juillet 2011) de la notice du QFT sont répertoriées dans le tableau ci-dessous :

Chapitre	Page	Modification(s)
5. Échantillonnage sanguin et manipulation	9	Modification de la procédure lors du mélange.
6. Mode d'emploi	10	Modification de la manipulation des tubes contenant le sang.
6. Mode d'emploi	12	Modification de la manipulation des échantillons de plasma.
10. Informations techniques	26	Ajout : « Le plasma a été mélangé dans les tubes à centrifuger avant la récolte »
12. Service technique	29	Nouvelle adresse Email pour le service technique.



Manufacturé pour:
Cellestis Limited (Australie) et Cellestis GmbH (Europe)
Level 1, Office Tower 2, Chadstone Centre
1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australie,
Tél. (Aust) +61 3 8527 3500, (Europe) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Site Web: www.cellestis.com

Doc. No. 05990301G
Juillet 2011



EC	REP
----	-----

Représentant autorisé:
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Allemagne