

QuantiFERON[®]-TB Gold

(Método in-tube)

**Teste de interferção-gama para sangue total,
para medição de respostas aos
péptidos antigénicos ESAT-6, CFP-10 & TB7.7(p4)**

FOLHETO INFORMATIVO

Para diagnóstico *in vitro*



ÍNDICE

1. FINALIDADE	2
2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE	2
Princípios da análise	3
Tempo necessário para realizar a análise	3
3. REAGENTES E ARMAZENAGEM	4
Materiais necessários (mas não fornecidos)	4
Instruções de conservação	5
Tubos para colheita de sangue	5
Kit de reagentes	5
Reagentes reconstituídos e não usados	5
4. AVISOS E PRECAUÇÕES	6
Avisos	6
Precauções	7
5. COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS	8
6. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO	9
FASE UM – Incubação de sangue e colheita de plasma	9
FASE DOIS – Interferão- γ humano ELISA	10
7. CÁLCULOS E INTERPRETAÇÃO DO TESTE	13
Geração da curva standard	13
Controlo da qualidade do teste	14
Interpretação dos resultados	14
8. LIMITAÇÕES	18
9. CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO	18
10. INFORMAÇÃO TÉCNICA	20
Resultados inconclusivos	20
Amostra de plasma coagulado	20
Resolução de problemas ELISA	21
Desenvolvimento cromático não-específico	21
Leituras de baixa Densidade Óptica para Standards	21
Fundo de cor intensa	22
Curva standard não-linear e variabilidade entre as amostras duplas	22
11. BIBLIOGRAFIA	23
12. ASSISTÊNCIA TÉCNICA	24
13. PROCEDIMENTO ABREVIADO DO TESTE	25

1. FINALIDADE

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) é um teste para diagnóstico *in vitro* que utiliza um cocktail de péptidos simulando as proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4), a fim de estimular as células no sangue total heparinizado. A detecção de interferão γ (IFN- γ) pelo Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) é usada para identificar respostas *in vitro* a estes péptidos antigénicos, os quais estão associados à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

QuantiFERON®-TB Gold IT é um teste indirecto à infecção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e deve ser usado em conjunto com a avaliação de riscos, a radiografia e outras avaliações médicas e de diagnóstico.

2. SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

A tuberculose é uma doença comunicável causada pela infecção com organismos complexos *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), os quais tipicamente se transmitem por via aérea a novos hospedeiros, através de núcleos de gotículas provenientes de pacientes com tuberculose respiratória. Um indivíduo recentemente infectado pode ficar doente com tuberculose no espaço de semanas ou meses, mas a maioria dos indivíduos infectados permanece saudável. Em alguns indivíduos persiste uma infecção latente de tuberculose (LTBI), um estado assintomático incomunicável que pode degenerar em tuberculose meses ou anos mais tarde. A finalidade principal ao diagnosticar a LTBI é considerar o tratamento médico para evitar a doença. Até há pouco tempo, o teste cutâneo da tuberculina (TST) era o único método disponível para diagnosticar a LTBI. A sensibilidade cutânea à tuberculina desenvolve-se entre 2 a 10 semanas após a infecção. Contudo, alguns indivíduos infectados – incluindo aqueles cuja vasta série de circunstâncias impede as funções imunitárias, mas também outros sem estas condicionantes – não reagem à tuberculina. Ao contrário, alguns indivíduos sem probabilidade de infecção com *M. tuberculosis* apresentam sensibilidade à tuberculina e exibem resultados positivos no TST após vacinação com o bacilo Calmette-Guérin (BCG), por infecção com micobactérias que não as do complexo *M. tuberculosis* ou devido a outros factores não determinados.

A LTBI tem de ser distinguida da tuberculose doença, uma situação que tem de ser reportada e que, normalmente, implica os pulmões e o tracto respiratório inferior, apesar de também poder afectar outros sistemas de órgãos. A tuberculose doença é diagnosticada a partir de conclusões retiradas da avaliação histórica, física, histológica e microbiológica.

O teste QuantiFERON®-TB Gold IT é um teste às respostas imunológicas celulares (CMI) perante péptidos antigénicos que simulam proteínas micobacterianas. Estas proteínas (ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4)) estão ausentes de todas as estirpes do BCG e da maioria das micobactérias não-tuberculosas, à excepção de *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*.¹ Indivíduos infectados com organismos do complexo *M. tuberculosis* normalmente têm linfócitos no sangue que reconhecem estes e outros antigénios micobacterianos. Este processo de reconhecimento envolve a geração e a secreção da citoquina IFN- γ . A detecção e subsequente quantificação de IFN- γ constituem a base deste teste.

Os antigénios usados no QuantiFERON®-TB Gold IT formam um cocktail de péptidos que simulam as proteínas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4). Numerosos estudos demonstraram que estes péptidos antigénicos estimulam as respostas ao IFN- γ em células T por parte de indivíduos infectados com *M. tuberculosis*, mas geralmente não por parte de pessoas não infectadas ou vacinadas com BCG, sem doença nem risco de LTBI.¹⁻³² Contudo, os tratamentos ou estados clínicos que fragilizam a funcionalidade imunitária podem reduzir as respostas ao IFN- γ . Pacientes com determinadas outras infecções micobacterianas também podem reagir a ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4), visto que os genes que codificam essas proteínas estão presentes em *M. kansasii*, *M. szulgai* and *M. marinum*.^{1,23} O teste QuantiFERON®-TB Gold IT é tanto um teste para a LTBI como um auxiliar útil para diagnosticar a infecção com o complexo *M. tuberculosis* em pacientes doentes. Um resultado positivo sustenta o diagnóstico da tuberculose doença; contudo, as infecções por outras micobactérias (p. ex., *M. kansasii*) também poderiam levar a resultados positivos. São necessárias outras avaliações médicas e de diagnóstico para confirmar ou excluir a tuberculose doença.

Princípios da análise

O sistema QuantiFERON[®]-TB Gold IT utiliza tubos especiais para colheita de sangue total. A incubação do sangue ocorre nos tubos durante 16 a 24 horas, após as quais o plasma é colhido e testado quanto à presença de IFN- γ produzido como resposta aos péptidos antigénicos.

O teste QuantiFERON[®]-TB Gold IT é realizado em duas fases. Primeiro, o sangue total é recolhido para dentro de cada um dos tubos para colheita de sangue do QuantiFERON[®]-TB Gold: um tubo de controlo nulo, um tubo de antígeno da TB e um tubo opcional de agente mitogénico.

O tubo de agente mitogénico pode ser usado com o teste QuantiFERON[®]-TB Gold IT como controlo positivo. Isso pode justificar-se caso haja dúvidas sobre a situação imunológica do indivíduo. O tubo de agente mitogénico também pode servir de controlo para manuseamento e incubação correctos do sangue.

Os tubos devem ser incubados a 37°C o mais cedo possível e no espaço de 16 horas a contar da colheita. Na sequência de um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é retirado e a quantidade de IFN- γ (UI/mL) é medida pelo ELISA.

Um teste é considerado positivo no caso de uma resposta do IFN- γ ao tubo de antígeno da TB que se situe significativamente acima do valor nulo UI/mL de IFN- γ . Caso seja usada, a amostra de plasma estimulada pelo agente mitogénico serve de controlo positivo do IFN- γ para cada amostra testada. Uma resposta reduzida ao agente mitogénico (<0,5 UI/mL) indica um resultado inconclusivo caso uma amostra de sangue também tenha uma resposta negativa ao antígeno da TB. Este padrão pode verificar-se em caso de linfócitos insuficientes, de actividade linfocitária reduzida devido ao manuseamento inadequado das amostras, de enchimento/mistura incorrectos do tubo de mitogénio ou da incapacidade dos linfócitos do paciente para gerar IFN- γ . A amostra nula corrige os efeitos de reacções não específicas, de anticorpos heterófilos⁷ ou IFN- γ não específico em amostras de sangue. O nível de IFN- γ do tubo nulo é subtraído ao nível de IFN- γ do tubo de antígeno da TB e do tubo do agente mitogénico (caso seja usado).

Tempo necessário para realizar a análise

Calcula-se que o tempo necessário para realizar a análise QuantiFERON[®]-TB Gold IT seja reduzido; também é indicado o tempo para testar amostras múltiplas quando agrupadas:

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

ELISA: Aprox. 3 horas para uma placa ELISA
(28 a 44 indivíduos)

- <1 hora de trabalho
- Adicione 10 a 15 minutos para cada placa extra

3. REAGENTES E ARMAZENAGEM

Tubos para colheita de sangue

Antigénio da tuberculose e de controlo

N.º do catálogo 0590 0301

1. Controlo nulo (tampa cinzenta)	100 x tubos
2. Antigénio da TB (tampa vermelha)	100 x tubos
3. Controlo do agente mitogénico (tampa púrpura)	100 x tubos

NOTA: Também estão disponíveis tubos noutras configurações:

Cat n.º 0590-0201: 100 x controlo nulo, 100 x tubos para antigénio da TB.

Cat n.º 0593-0201: 100 x tubos de controlo de agente mitogénico.

Tubos para altitudes elevadas (consulte a secção 5)

Cat. N.º 590 0501: (altitude elevada) 100 x controlo nulo, 100 x tubos para antigénio da TB.

Cat n.º 0590-0505: (altitude elevada) 100 x controlo nulo, 100 x tubos para antigénio da TB & 100 x tubos para agente mitogénico.

Cat. N.º T0593 0501 (altitude elevada) 100 x tubos de controlo de agente mitogénico.

Componentes do ELISA

N.º do catálogo 0594 0201

1. Fitas de microplacas	24 x 8 poços
2. Standard de IFN- γ humano, liofilizado	1 x frasco
3. Diluente Verde	1 x 30mL
4. Conjugado 100X Concentrado, liofilizado	1 x 0,3mL
5. Tampão de Lavagem 20X Concentrado	1 x 100mL
6. Solução de Substrato Enzimático	1 x 30mL
7. Solução de Paragem Enzimática	1 x 15mL

Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Incubadora de 37 °C. CO₂ não necessário.
- Pipetas calibradas de volume variável (10 μ L a 1000 μ L) com pontas descartáveis.
- Pipeta calibrada multicanal (50 μ L e 100 μ L) com pontas descartáveis.
- Agitador de microplacas.
- Água desionizada ou destilada - 2L.
- Lavador de microplacas (recomendado um lavador automático).
- Leitor de microplacas equipado com filtro de 450nm e filtro de referência de 620nm a 650nm.

Instruções de conservação

Tubos para colheita de sangue

- Conserve os tubos para colheita de sangue entre 4°C e 25°C.
- A duração dos tubos para colheita de sangue QuantiFERON®-TB Gold é de 15 meses a contar da data de fabrico, se conservados entre 4°C e 25°C.

Kit de reagentes

- Conserve o kit entre 2°C e 8°C.
- Proteja sempre a Solução de Substrato Enzimático da luz solar directa.
- A duração do kit IT ELISA QuantiFERON®-TB Gold é de 3 anos a contar da data de fabrico, se conservado entre 2°C e 8°C.

Reagentes reconstituídos e não usados

Consulte a secção 6 (página 11) para mais instruções sobre como reconstituir os reagentes.

- O Kit Standard reconstituído pode de ser guardado até 3 meses, se conservado entre 2°C e 8°C.
 - *Anote a data em que o Kit Standard foi reconstituído.*
- Uma vez reconstituído, o Conjugado 100X Concentrado não usado tem de voltar a ser conservado entre 2°C e 8°C e de ser usado no espaço de 3 meses.
 - *Anote a data em que o Conjugado foi reconstituído.*
- O Conjugado pronto tem de ser usado no espaço de 6 horas a contar do momento da preparação.
- O tampão de lavagem pronto a usar pode ser conservado à temperatura ambiente durante até 2 semanas.

4. AVISOS E PRECAUÇÕES

Avisos

- Um resultado negativo de QuantiFERON[®]-TB Gold IT não exclui a possibilidade de infecção com *M. tuberculosis* nem de tuberculose doença: Resultados falsos-negativos podem dever-se ao estágio da infecção (p. ex., amostra obtida antes do desenvolvimento da resposta imunológica celular), estados co-mórbidos que afectem as funções imunitárias, manuseamento incorrecto dos tubos de colheita de sangue a seguir à venipunctura, realização incorrecta da análise ou outras variáveis imunológicas.
- Um resultado positivo de QuantiFERON[®]-TB Gold IT não deve ser a única base - nem a definitiva - de determinação da infecção com *M. tuberculosis*. A realização incorrecta da análise pode causar respostas falsas-positivas.
- Um resultado positivo de QuantiFERON[®]-TB Gold IT deve ser seguido de avaliação médica mais exaustiva e de avaliação do diagnóstico quanto à tuberculose doença activa (p. ex., exame e cultura de bacilo ácido-resistente na expectoração, raio-X do tórax).
- Enquanto ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4) estão ausentes de todas as estirpes do BCG e da maioria das micobactérias não-tuberculosas mais conhecidas, é possível que um resultado positivo QuantiFERON[®]-TB Gold IT se deva a uma infecção por *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. *Se houver suspeita de uma dessas infecções, devem ser investigados testes alternativos.*

Precauções

- **Para diagnóstico *in vitro*.**
- **Nocivo: A Solução de Substrato Enzimático** contém 3,3',5,5' de tetrametilbenzidina, a qual é nociva por ingestão, inalação e contacto cutâneo. Irritante para pele e olhos. Mutagénica. Use protecção ocular e luvas e manuseie como potencial carcinogénico.
- **Nocivo: Solução de Paragem Enzimática** contém H₂SO₄, o qual é nocivo por ingestão, contacto com olhos, pele e por inalação. Use protecção ocular, luvas e vestuário protector normal de laboratório. Se a solução de paragem entrar em contacto com a pele ou os olhos, lave com água abundante e consulte o médico.
- **Nocivo: Standard de IFN- γ e Conjugado 100X Concentrado** podem ser desconfortáveis se ingeridos e podem causar irritação cutânea. Use luvas e vestuário protector normal de laboratório.
- **Manuseie o sangue humano como potencialmente infeccioso.** Observe as directrizes relevantes em matéria de manuseamento de sangue.
- **Timerosal** é usado como conservante em alguns reagentes. Pode ser tóxico após ingestão, inalação ou contacto cutâneo.
- **Diluyente Verde** contém soro normal de ratinho e caseína, os quais podem desencadear reacções alérgicas; evite o contacto com a pele.
- Desvios em relação ao Folheto informativo podem causar resultados erróneos. Por favor, queira ler as instruções cuidadosamente antes da utilização.
- Não utilize o kit se algum frasco de reagente mostrar sinais de danos ou de fugas antes da utilização.
- Não misture nem use reagentes ELISA de outros lotes de kits QuantiFERON[®]-TB Gold.
- Elimine reagentes não utilizados e amostras biológicas de acordo com as regulamentações locais e nacionais.
- Não utilize tubos de colheita de sangue nem o kit ELISA após expirar a data de validade.

5. COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

QuantiFERON®-TB Gold IT usa os seguintes tubos de colheita:

1. Controlo nulo (tampa cinzenta com anel branco) (para alturas até 810 m acima do nível do mar)
2. Antigénio da TB (tampa vermelha com anel branco) (para alturas até 810 m acima do nível do mar)
3. Controlo do agente mitogénico (tampa púrpura com anel branco) (para alturas até 810 m acima do nível do mar) (opcional)
4. Controlo nulo (tampa cinzenta com anel amarelo) (para alturas entre 1.020 e 1.875 m)
5. Antigénio da TB (tampa vermelha com anel amarelo) (para alturas entre 1.020 e 1.875 m)
6. Controlo do agente mitogénico (tampa púrpura com anel amarelo) (para alturas entre 1.020 e 1.875 m) (opcional)

Os antigénios secaram na parede interior dos tubos de colheita de sangue, por isso é essencial que o conteúdo dos tubos seja totalmente misturado com o sangue. Os tubos devem ser transferidos para uma incubadora de 37°C o mais cedo possível e no espaço de 16 horas a contar da colheita.

Devem ser cumpridos os seguintes procedimentos, a fim de obter óptimos resultados:

1. Para cada indivíduo, recolha 1mL de sangue por venipunctura directamente para dentro de cada um dos tubos de colheita de sangue QuantiFERON®-TB Gold IT.
 - Em locais até 810 metros de altura, devem ser usados os tubos de colheita de sangue QuantiFERON® Standard. Em locais acima dos 1020 metros, devem ser usados os tubos de colheita de sangue QuantiFERON® para altitudes elevadas (HA).

Se usar tubos de colheita de sangue QuantiFERON® fora de estas alturas, ou no caso de baixos volumes de sangue, também pode extrair o sangue usando uma seringa e transferindo 1 mL de sangue a cada um dos três tubos. Por motivos de segurança, é aconselhável remover a agulha da seringa, tomando as precauções devidas, tirar as tampas dos três tubos QFT-Gold IT e adicionar 1 mL de sangue a cada um dos tubos (marcação preta no lado do rótulo do tubo). Coloque as tampas novamente e misture como descrito abaixo.

- Como os tubos de 1mL extraem o sangue relativamente devagar, mantenha o tubo na agulha durante mais 2-3 segundos depois de o tubo parecer estar cheio, para assim garantir que é retirado o volume necessário.

A marcação preta no lado dos tubos indica o volume de enchimento de 1mL. Os tubos para colheita de sangue QuantiFERON®-TB Gold foram validados para volumes entre 0,8 e 1,2mL. Se o nível do sangue em algum dos tubos não se aproximar da linha indicadora, é recomendável obter outra amostra de sangue.

- Se estiver a usar uma agulha de borboleta para colheita do sangue, deve ser usado um tubo de purga para garantir que a tubagem está cheia de sangue antes de serem usados os tubos QuantiFERON®-TB Gold.
2. Misture os tubos **agitando-os vigorosamente durante 5 segundos** (ou 10 vezes) para assegurar que **toda a superfície interna do tubo** ficou revestida de sangue.
 - É necessária uma mistura profunda para garantir a intergração total do conteúdo do tubo no sangue.
 - É de esperar a formação de espuma do sangue durante o processo de agitação, contudo isso não afecta a performance da análise e não deve constituir uma preocupação para o técnico.
 3. Rotule os tubos adequadamente.
 - Assegure-se de que cada tubo (o nulo, o de antigénio da TB e o do agente mitogénico) é identificável, pelo seu rótulo ou de qualquer outro modo, depois de se retirar a tampa.
 4. Os tubos devem ser transferidos para uma incubadora a 37°C o mais rapidamente possível, no espaço de 16 horas a contar da colheita. Não refrigere nem congele as amostras de sangue.

6. INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Fase um – Incubação de sangue e colheita de plasma

Materiais fornecidos

Tubos de colheita de sangue QuantiFERON®-TB Gold IT (consulte a secção 3).

Materiais necessários (mas não fornecidos)

Consulte a secção 3.

Procedimento

1. Se o sangue não for incubado logo após a colheita, **a mistura dos tubos deve ser repetida imediatamente antes da incubação**, como descrito na secção 5.
2. Incube os tubos **NA VERTICAL** a 37°C, durante 16 a 24 horas. A incubadora não necessita de CO₂ nem de humidificação.
3. Após a incubação a 37°C, os tubos de colheita de sangue podem ser mantidos entre 2°C e 27°C durante 3 dias antes de serem submetidos a centrifugação.
4. Após a incubação dos tubos a 37°C, a colheita de plasma é facilitada centrifugando os tubos durante 15 minutos entre 2000 a 3000 de RCF (g). O tampão de gel separará as células do plasma. Caso isso não ocorra, os tubos devem voltar a ser centrifugados a uma velocidade mais elevada.
 - É possível colher o plasma sem centrifugação, contudo é necessário um cuidado especial para retirar o plasma sem perturbar as células.
5. As amostras de plasma podem ser carregadas directamente dos tubos de colheita de sangue para a placa ELISA de QuantiFERON®-TB Gold, especialmente quando estiverem a ser usadas estações de trabalho automatizadas ELISA.
6. Em alternativa, as amostras de plasma podem ser conservadas antes de submetidas ao ELISA, quer seja nos tubos centrifugados ou recolhidas em contentores de armazenamento de plasma. Por exemplo, recolha >150µL de plasma para dentro dos poços de microplacas ou microtubos em armação no formato de 96 poços e sele para evitar derramar e evaporar, caso as amostras sejam para conservar.
 - As amostras de plasma podem ser conservadas até 4 semanas entre 2°C e 8°C ou abaixo de –20°C (de preferência menos de –70°C) por períodos prolongados.

Fase dois – Interferão- γ humano ELISA

Materiais fornecidos

Kit ELISA QuantiFERON[®]-TB Gold (consulte a secção 3).

Materiais necessários (mas não fornecidos)

Consulte a secção 3.

Procedimento

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, à excepção do Conjugado 100X Concentrado, têm de ser trazidos à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de usados. Deixe decorrer pelo menos 60 minutos para o efeito.
2. Retire as fitas desnecessárias da estrutura, volte a selá-las com a película e volte a conservar no frio até que sejam precisas.

Destine pelo menos uma fita para os Standards QuantiFERON[®]-TB Gold e fitas suficientes para o número de indivíduos a testar (consulte as figuras 2A & 2B sobre os formatos de 2 e 3 tubos, respectivamente). Depois de utilizar, guarde a estrutura e a tampa para as fitas restantes.

3. Reconstitua o Kit Standard liofilizado com o volume de água desionizada ou destilada indicada no rótulo do frasco Standard. Misture cuidadosamente para minimizar a formação de espuma e garantir a dissolução completa. A reconstituição do Standard ao volume indicado produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/mL.

Nota: O volume de reconstituição do Kit Standard apresenta diferenças entre lotes.

Use o Kit Standard reconstituído numa série de diluição de 1:4 de IFN- γ em Diluente Verde (GD) – consulte a figura 1. S1 (Standard 1) contém 4 UI/mL, S2 (Standard 2) contém 1 UI/mL, S3 (Standard 3) contém 0,25 UI/mL e S4 (Standard 4) contém 0 UI/mL (só GD). Os Standards devem ser analisados pele menos em duplicado.

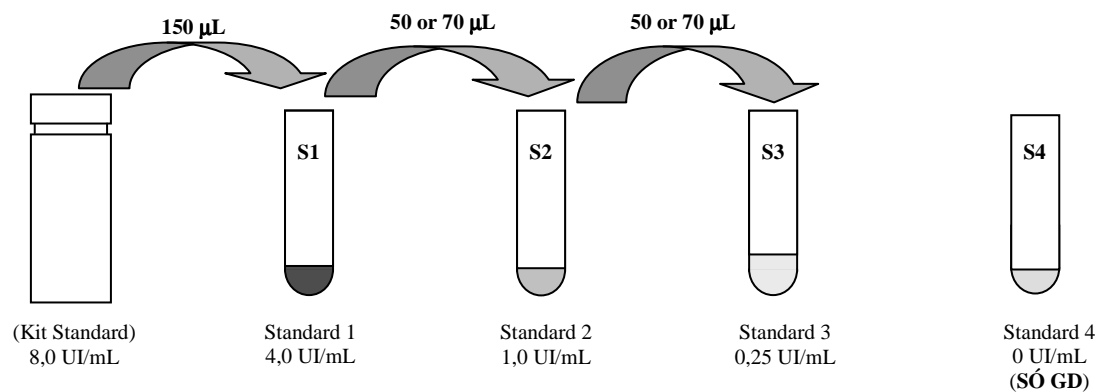
PROCEDIMENTO RECOMENDADO PARA STANDARDS DUPLICADOS

- a. Rotule 4 tubos “S1”, “S2”, “S3” e “S4”.
- b. Adicione **150 μL** de GD ao S1, S2, S3 e S4.
- c. Adicione **150 μL** do Kit Standard ao S1 e misture totalmente.
- d. Transfira **50 μL** de S1 para S2 e misture totalmente.
- e. Transfira **50 μL** de S2 para S3 e misture totalmente.
- f. **Só GD** serve de Standard nulo (S4).

PROCEDIMENTO RECOMENDADO PARA STANDARDS TRIPLICADOS

- a. Rotule 4 tubos “S1”, “S2”, “S3” e “S4”.
- b. Adicione **150 μL** de GD ao S1.
- c. Adicione **210 μL** de GD ao S2, S3 e S4.
- d. Adicione **150 μL** do Kit Standard ao S1 e misture totalmente.
- e. Transfira **70 μL** de S1 para S2 e misture totalmente.
- f. Transfira **70 μL** de S2 para S3 e misture totalmente.
- g. **Só GD** serve de Standard nulo (S4).

FIGURA 1. Preparação da curva standard



- Prepare diluições novas do Kit Standard para cada sessão ELISA.
4. Reconstitua Conjugado 100X Concentrado liofilizado com 0,3mL de água desionizada ou destilada. Misture cuidadosamente para minimizar a formação de espuma e **garantir a dissolução completa do conjugado**.

O conjugado pronto a usar é preparado diluindo a quantidade necessária de Conjugado 100X Concentrado reconstituído em Diluente Verde, como descrito no quadro 1 – Preparado de Conjugado.

QUADRO 1. Preparado de Conjugado

NÚMERO DE FITAS	VOLUME DE CONJUGADO 100X CONCENTRADO	VOLUME DE DILUENTE VERDE
2	10 µL	1,0 mL
3	15 µL	1,5 mL
4	20 µL	2,0 mL
5	25 µL	2,5 mL
6	30 µL	3,0 mL
7	35 µL	3,5 mL
8	40 µL	4,0 mL
9	45 µL	4,5 mL
10	50 µL	5,0 mL
11	55 µL	5,5 mL
12	60 µL	6,0 mL

- Misture total mas cuidadosamente para evitar a formação de espuma.
 - Volte a refrigerar Conjugado 100X Concentrado não necessário entre 2°C e 8°C imediatamente após o uso.
 - Use apenas Diluente Verde.
5. Antes da análise, os plasmas devem ser misturados para garantir que o IFN- γ é distribuído homogeneamente pela amostra.
6. Adicione 50µL de conjugado acabado de preparar e pronto a usar aos poços ELISA, usando uma pipeta multicanal.

- Adicione 50µL de amostras de plasma para teste aos poços adequadas, usando uma pipeta multicanal (consulte o esquema seguinte recomendado para a distribuição das placas – figuras 2A & 2B). Finalmente, adicione 50µL a cada um dos Standards 1 a 4.

FIGURA 2A. Esquema recomendado de amostras para o tubo nulo & o de antígeno da TB (44 testes por placa)

	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 (Amostra 1. Plasma de controlo nulo); 1A (Amostra 1. Plasma de antígeno da TB).

FIGURA 2B. Esquema recomendado de amostras para o tubo nulo, o de antígeno da TB & de agente mitogénico (28 testes por placa)

	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 (Amostra 1. Plasma de controlo nulo); 1A (Amostra 1. Plasma de antígeno de TB); 1M (Amostra 1. Plasma de controlo do agente mitogénico).

- Misture totalmente o conjugado e as amostras de plasma/standards, usando um agitador de microplacas durante 1 minuto.
- Cubra cada placa com uma tampa e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 120 ± 5 minutos.
 - As placas não devem ser expostas a luz solar directa durante a incubação.
- Durante a incubação, dilua uma parte de tampão de lavagem 20X Concentrado com 19 partes de água desionizada ou destilada e misture totalmente. Foi fornecido Tampão de Lavagem 20X Concentrado suficiente para preparar 2L de tampão de lavagem pronto a usar.

Lave os poços com **400µL** de tampão de lavagem pronto a usar durante, pelo menos por 6 ciclos. Recomenda-se a utilização de um lavador automático de placas.

- A lavagem profunda é muito importante para a performance da análise. Assegure-se de que, para cada ciclo de lavagem, cada poço está completamente cheio de tampão de lavagem até ao cimo. Recomenda-se um período de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.
- Deve ser adicionado ao reservatório efluente desinfetante normal de laboratório, assim como devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.

11. Bata com as placas com os poços virados para baixo sobre um papel absorvente para retirar tampão de lavagem residual. Adicione 100µL de Solução de Substrato Enzimático a cada poço e misture totalmente usando um agitador de microplacas.
12. Cubra cada placa com uma tampa e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos.
 - As placas não devem ser expostas a luz solar directa durante a incubação.
13. A seguir à incubação de 30 minutos, adicione 50µL de Solução de Paragem Enzimática a cada poço e misture.
 - A Solução de Paragem Enzimática deve ser adicionada aos poços pela mesma ordem e, aproximadamente, à mesma velocidade do substrato no passo 11.
14. Meça a Densidade Óptica (DÓ) de cada poço no espaço de 5 minutos após adição da solução de paragem, usando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450nm e com um filtro de referência de 620nm a 650nm. Os valores de DÓ são usados para calcular resultados.

7. CÁLCULOS E INTERPRETAÇÃO DO TESTE

A Cellestis tem disponível o programa QuantiFERON[®]-TB Gold IT Analysis Software, usado para analisar dados em bruto e calcular os resultados.

O software executa uma avaliação de Controlo da Qualidade da análise, gera uma curva standard e fornece um resultado do teste para cada indivíduo, como explicado ao pormenor na secção de Interpretação de Resultados.

Como alternativa ao QuantiFERON[®]-TB Gold IT Analysis Software, os resultados podem ser determinados de acordo com o método seguinte:

Geração da curva standard

(se não for usado o QuantiFERON[®]-TB Gold IT Analysis Software)

Determine os valores médios de DÓ das réplicas do Kit Standard em cada placa.

Construa uma curva standard $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ traçando o $\log_{(e)}$ da DÓ média (eixo y) contra o $\log_{(e)}$ da concentração de IFN- γ dos standards em UI/mL (eixo x), omitindo o standard zero destes cálculos. Calcule a linha que melhor assenta à curva standard por análise de regressão.

Use a curva standard para determinar a concentração de IFN- γ (UI/mL) para cada uma das amostras de plasma a testar, usando o valor de DÓ para cada amostra.

Estes cálculos podem ser efectuados usando software disponível com leitores de microplacas e folhas de cálculo comuns ou software para estatística (como o Microsoft Excel). Recomenda-se que esse tipo de software seja usado para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (%CV) para os standards e o coeficiente de correlação (r) da curva standard.

Controlo da Qualidade do Teste

A precisão dos resultados do teste depende da geração de uma curva standard exacta. Assim sendo, os resultados derivados dos standards têm de ser examinados antes de os resultados das amostras de teste poderem ser interpretados.

Para o ELISA ser válido:

- O valor médio de DÓ para o Standard 1 tem de ser $\geq 0,600$.
- O %CV dos valores de DÓ replicados do Standard 1 e Standard 2 tem de ser $\leq 15\%$.
- Os valores DÓ replicados para o Standard 3 e Standard 4 não podem divergir mais do que 0,040 de unidades de DÓ do seu valor médio.
- O coeficiente de correlação (r) calculado a partir dos valores médios de absorvância dos standards tem de ser de $\geq 0,98$.

O QuantiFERON[®]-TB Gold Analysis Software calcula e regista estes parâmetros de controlo da qualidade.

Se os critérios acima indicados não forem satisfeitos, o teste é considerado inválido e tem de ser repetido.

- O valor médio de DÓ para o Standard Zero (Diluyente Verde) tem de ser $\leq 0,150$. Se o valor médio de DÓ for $> 0,150$, há que investigar o procedimento de lavagem da placa.

Interpretação dos resultados

Os resultados de QuantiFERON[®]-TB Gold IT são interpretados usando os seguintes critérios:

NOTA: Diagnosticar ou excluir a tuberculose doença e avaliar a probabilidade da LTBI exige uma combinação das conclusões retiradas da avaliação epidemiológica, histórica, médica e de diagnóstico que deverão ser levadas em conta ao interpretar os resultados de QuantiFERON[®]-TB Gold IT.

CASO SEJAM USADOS APENAS TUBOS NULOS & DE ANTIGÉNIO DA TB

Nulo [UI/mL]	Antigénio da TB menos nulo [UI/mL]	QuantiFERON [®] -TB [UI/mL]	Relatório/Interpretação
$\leq 8,0$	$< 0,35$	Negativo	<i>Infecção por M. tuberculosis NÃO provável</i>
	$\geq 0,35$ e $< 25\%$ do valor do nulo		
	$\geq 0,35$ e $\geq 25\%$ do valor do nulo	Positivo¹	<i>Infecção por M. tuberculosis provável</i>
$> 8,0^2$	Qualquer um	Inconclusivo³	Resultados são inconclusivos quanto à resposta ao antigénio da TB

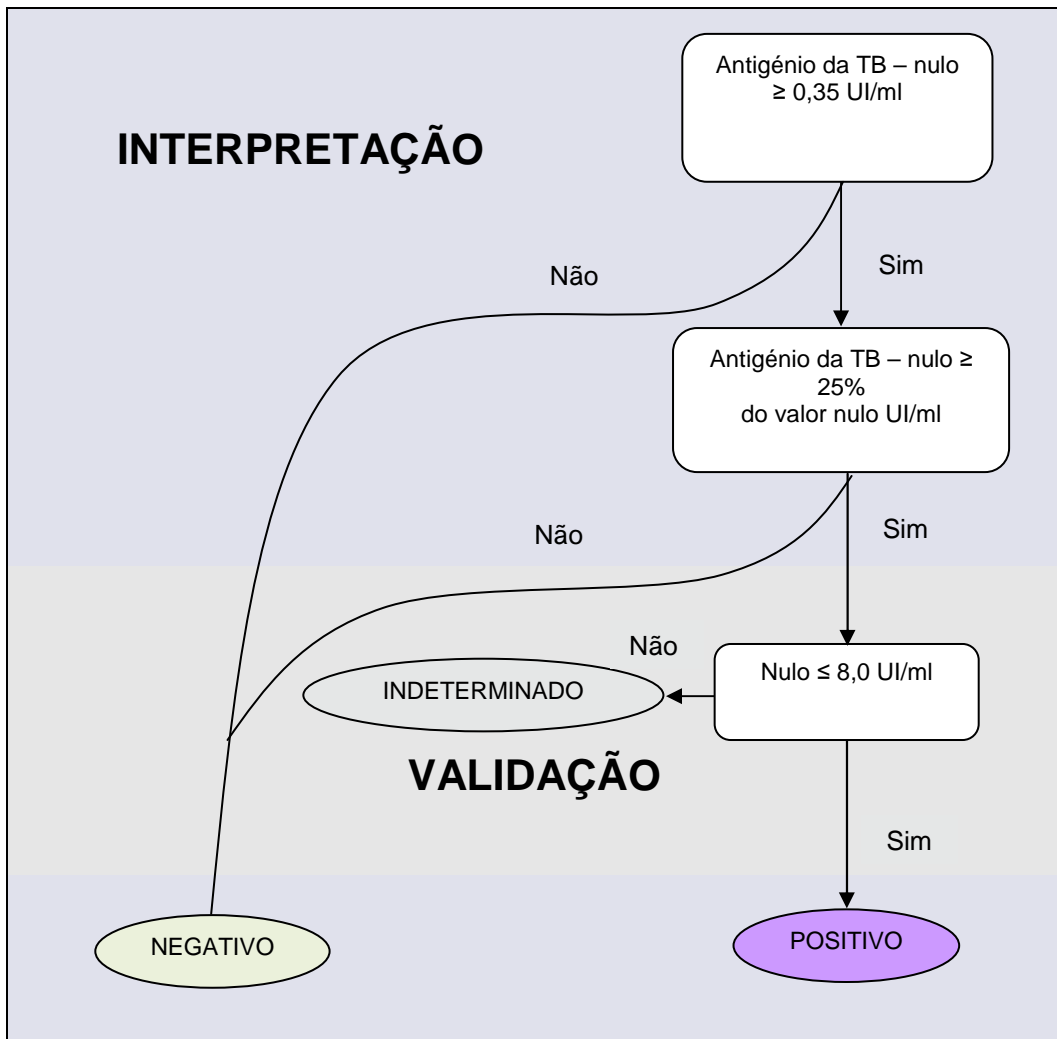
¹ Nos casos em que não se suspeita de infecção por M. tuberculosis, resultados inicialmente positivos podem ser confirmados por novo teste às amostras originais de plasma em duplicado no QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA. Se o teste repetido de uma ou das duas réplicas for positivo, o teste do indivíduo deve ser considerado positivo.

² Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos sujeitos apresentaram níveis de IFN- $\gamma > 8,0$ UI/mL para o controlo nulo.

³ Consulte a secção de Resolução de problemas para aferir possíveis causas.

A magnitude do nível de IFN- γ medido não pode ser correlacionada com o estágio nem o grau de infecção, com o nível de resposta imunitária nem com a probabilidade de progressão para doença activa.

FIGURA 3. Fluxograma para interpretação CASO sejam usados tubos de NULO & DE ANTIGÊNIO DA TB



CASO SEJAM USADOS TUBOS DE NULO, DE ANTIGÉNIO DA TB E DE AGENTE MITOGÉNICO

Nulo [UI/mL]	Antigénio da TB menos nulo [UI/mL]	Agente mitogénico menos nulo [UI/mL]¹	QuantiFERON®-TB [UI/mL]	Relatório/Interpretação
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativo	<i>Infecção por M. tuberculosis</i> NÃO provável
	≥ 0,35 e < 25% do valor do nulo	≥ 0,5		
	≥ 0,35 e ≥ 25% do valor do nulo	Qualquer um	Positivo²	<i>Infecção por M. tuberculosis</i> provável
	< 0,35	< 0,5	Inconclusivo³	Resultados são inconclusivos quanto à resposta ao antigénio da TB
≥ 0,35 e < 25% do valor do nulo	< 0,5			
> 8,0 ⁴	Qualquer um	Qualquer um		

¹ As respostas ao controlo positivo de agente mitogénico (e ocasionalmente de antigénio da TB) situam-se frequentemente fora da amplitude do leitor de microplacas. Isso não tem qualquer impacto nos resultados do teste.

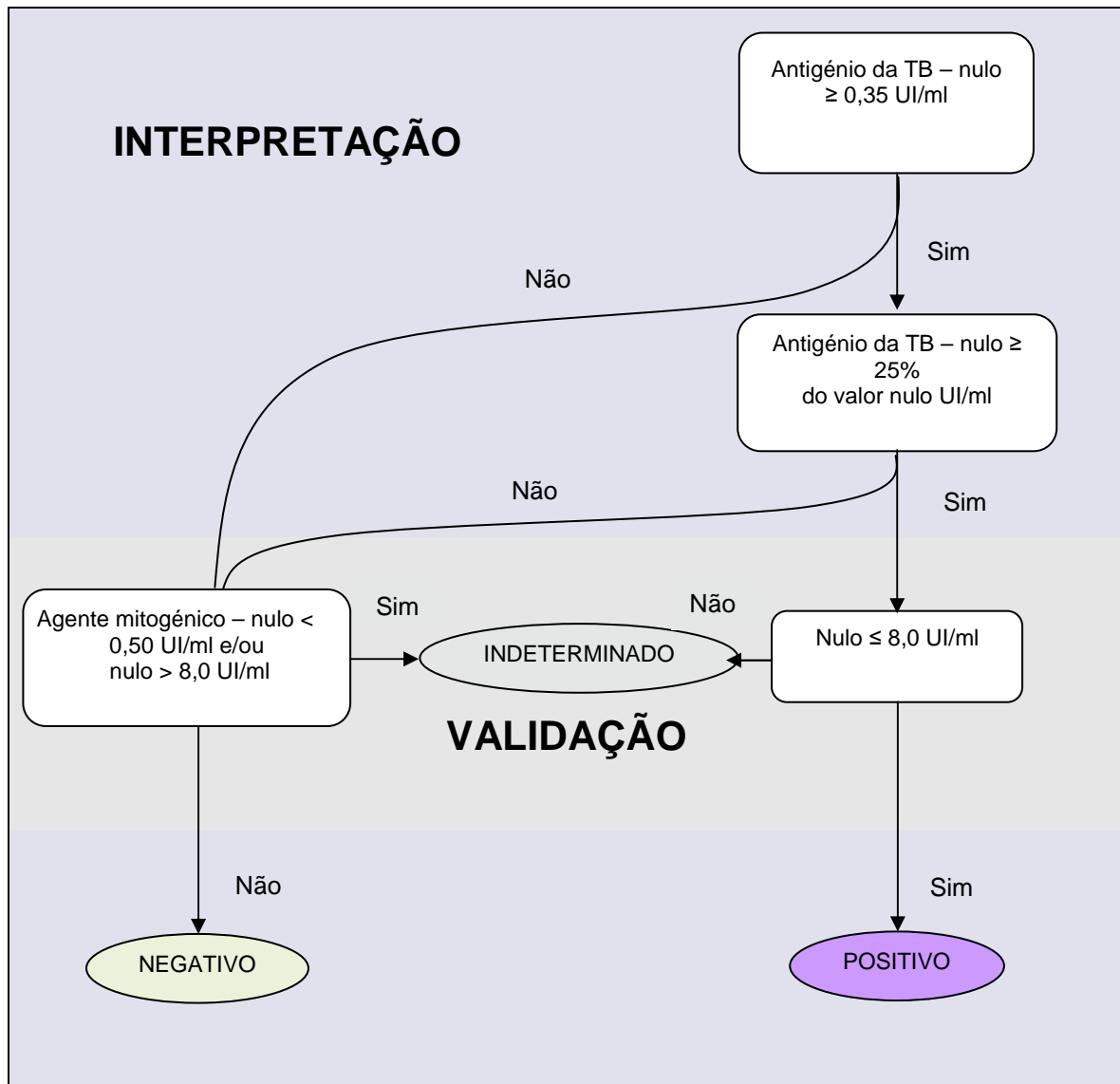
² Nos casos em que não se suspeita de infecção por *M. tuberculosis*, resultados inicialmente positivos podem ser confirmados por novo teste às amostras originais de plasma em duplicado no QuantiFERON®-TB Gold ELISA. Se o teste repetido de uma ou das duas réplicas for positivo, o teste do indivíduo deve ser considerado positivo.

³ Consulte a secção de Resolução de problemas para aferir possíveis causas.

⁴ Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos sujeitos apresentaram níveis de IFN-γ > 8,0 UI/mL para o controlo nulo.

A magnitude do nível de IFN-γ medido não pode ser correlacionada com o estágio nem grau de infecção, com o nível de resposta imunitária nem com a probabilidade de progressão para doença activa.

FIGURA 4. Fluxograma para interpretação CASO sejam usados tubos de NULO, DE ANTIGÊNIO DA TB E DE AGENTE MITOGÊNICO



8. LIMITAÇÕES

Os resultados do teste com QuantiFERON®-TB Gold IT têm de ser usados em conjunto com o historial epidemiológico de cada indivíduo, com o seu estado actual e com outras avaliações de diagnóstico.

Resultados com valores de nulo superiores a 8 UI/mL são classificados de "inconclusivos" porque uma resposta 25% superior aos antígenos da TB poderá situar-se fora da amplitude de medição da análise.

Podem ocorrer resultados não fiáveis ou inconclusivos devido a:

- desvios do procedimento descrito no Folheto Informativo,
- níveis excessivos de IFN- γ em circulação ou presença de anticorpos heterófilos,
- mais de 16 horas entre a colheita da amostra de sangue e a incubação a 37°C.

9. CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Estudos clínicos

Como não existe um padrão definitivo para a infecção latente de tuberculose (LTBI), na prática não pode ser feita uma estimativa à sensibilidade e à especificidade quanto a QuantiFERON®-TB Gold IT. A especificidade de QuantiFERON®-TB Gold IT foi aproximada avaliando falsos-positivos em pessoas de baixo risco (sem factores de risco conhecidos) de infecção com tuberculose. A sensibilidade foi aproximada avaliando grupos de pacientes com TB doença activa confirmada por cultura.

Especificidade

Num estudo norte-americano envolvendo 866 voluntários, foi retirado sangue para QuantiFERON®-TB Gold IT quando foi efectuado um TST. A informação demográfica e os factores de risco relativamente à TB foram determinados usando um inquérito standard na altura do teste. De 432 voluntários sem factores de risco conhecidos de infecção por *M. tuberculosis*, estiveram disponíveis resultados de QuantiFERON®-TB Gold IT e TST para 391. Nenhum deles havia sido vacinado com BCG. Foi realizado um segundo estudo de especificidade com QuantiFERON®-TB Gold IT em indivíduos de baixo risco no Japão, aproximadamente 90 % dos quais haviam sido vacinados com BCG. O quadro 2 apresenta os resultados de ambos os estudos de especificidade.

Quadro 2. Especificidade de QuantiFERON®-TB Gold IT: resultados para pessoas sem risco relatado de infecção por *M. tuberculosis*.

ESTUDO	Percentagem de vacinados com BCG	Total testado	N.º QFT-G inconclusivo	N.º QFT-G positivo / n.º testes válidos	Especificidade de QFT-G (95% CI)	N.º TST positivo / n.º testados	Especificidade de TST* (95% CI)
EUA (não publicado)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (97,6-99,8)	6 / 391	98,5% (96,5-99,4)
Japão (não publicado)	~90%	190	4	3 / 186	98,4% (95-99,6)	-	-
TOTAL		581	5/584 (0,9%)	6 / 576	99,0%	-	-

*Usando *cut off* de TST de 10mm. A estimativa da especificidade de TST é de 99,1% ao usar um *cut off* de 15mm.

Sensibilidade à TB activa

A fim de avaliar a sensibilidade de QuantiFERON®-TB Gold IT, foram testados suspeitos de infecção da TB da Austrália e do Japão, os quais confirmaram subsequentemente a infecção por *M. tuberculosis* por cultura. Enquanto não existe um teste padrão definitivo para a infecção latente da tuberculose (LTBI), um substituto adequado é a cultura microbiológica de *M. tuberculosis*, visto que os pacientes com a doença estão, por definição, infectados. Os pacientes haviam recebido menos de 8 dias de tratamento, antes da colheita de sangue para o teste de QuantiFERON®-TB Gold IT.

O quadro 3 resume as conclusões dos dois grupos de pacientes positivos na cultura de *M. tuberculosis*. A sensibilidade geral de QuantiFERON®-TB Gold IT para a TB doença foi de 89% (48/54).

Quadro 3. QuantiFERON®-TB Gold IT: Indivíduos com infecção de *M. tuberculosis* confirmada por cultura.

ESTUDO		Doença confirmada por	N.º QFT-Gold positivo / n.º testes válidos	Sensibilidade QFT-Gold (95% CI)
Estudo de validação de pacientes de TB do Japão		Cultura	24 / 27	89% (72-96%)
Estudo de validação de pacientes de TB da Austrália	Pulmonar	Cultura	7 / 10	70% (40-89%)
	Extra-pulmonar		17 / 17	100% (82-100%)
TOTAL			48 / 54	89% (78-95%)

Diagnóstico da LTBI

Foi publicado um número de estudos que demonstram a performance de QuantiFERON®-TB Gold IT em várias populações em risco de contrair LTBI. O quadro 4 apresenta as conclusões primárias de alguns estudos seleccionados.

Quadro 4. Estudos publicados seleccionados sobre QuantiFERON®-TB Gold IT em populações em risco de contrair LTBI.

ESTUDO	Total testado	Resultados e conclusões
Prestadores de cuidados de saúde na Índia (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Cenário de taxas de TB muito elevadas. 40% de QFT-Gold IT positivos cf. 41% TST positivos a 10mm. Elevada concordância com TST, sem efeito do BCG em nenhum dos lados. Ambos os testes relacionados com os factores de risco "idade" e "período de trabalho na prestação de cuidados de saúde"
Portadores do VIH na Dinamarca (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	A prevalência geral de LTBI por QFT-Gold IT foi de 4,6% (27/590) em portadores de VIH ⁺ . Resultados positivos foram associados aos riscos da TB. Dois indivíduos positivos por QFT-Gold IT evoluíram para TB activa no espaço de um ano. Respostas inconclusivas (n=20, 3,4%) foram associadas significativamente à contagem de CD4 <100 / µL.
Crianças hospitalizadas (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	Crianças com suspeita de TB ou com história de contacto com TB foram testadas com QFT-Gold IT e TST. 10,5% de QFT-Gold IT positivos cf. 9,5% TST positivos a 10mm. A concordância entre os testes foi de 95,2% em geral e de 100% em indivíduos não vacinados com BCG.
Contactos alemães (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Foram testados contactos estreitos de 15 casos índices diferentes. 51% estavam vacinados com o BCG, 27% nascido no estrangeiro. 70% dos vacinados com BCG e 18% dos não vacinados eram positivos ao TST (5mm), ao passo que 9% e 11% eram positivos a QFT-Gold IT, respectivamente. QFT-Gold IT foi associado ao risco de TB. TST só foi associado à vacinação com BCG.

Muitas mais publicações descrevem a performance da versão do antígeno líquido menos sensível de QuantiFERON®-TB Gold (o precursor de QuantiFERON®-TB Gold IT) e do teste QuantiFERON®-TB Gold IT. Estes estudos incluem a utilização do(s) teste(s) em contactos de casos de TB activa^{9,11,19,25}, crianças^{6-10,25,28}, portadores do VIH^{2,5,20}, prestadores de cuidados de saúde^{13,26,32}, indivíduos imunossuprimidos^{3,4,22,23,27,30,31}, bem como suspeitos de TB^{7,8,10,18} e indivíduos de baixo risco¹⁵.

Repetibilidade e efeito do TST em testes subsequentes com QuantiFERON®-TB Gold

Como parte do estudo de especificidade norte-americano, um sub-conjunto dos voluntários voltou a ser testado 4 a 5 semanas após o teste original com QuantiFERON®-TB Gold IT e com TST. Os resultados com QuantiFERON®-TB Gold IT para 260 recrutados estiveram disponíveis em ambas as alturas e o nível de concordância foi de 99,6% (259/260). Um TST anterior não induziu respostas positivas do QuantiFERON®-TB Gold IT.

10. INFORMAÇÃO TÉCNICA

Resultados inconclusivos

Resultados inconclusivos deviam ser raros e podem ser o estado de imunidade do indivíduo a ser testado, embora possam também estar relacionados com um número de factores técnicos:

- mais de 16 horas entre a colheita de sangue e a incubação a 37°C
- armazenamento do sangue fora da amplitude térmica recomendada (22°C ± 5°C)
- mistura insuficiente dos tubos para colheita de sangue
- lavagem incompleta da placa ELISA

Se houver suspeitas sobre a técnica de colheita ou manuseamento das amostras de sangue, repita o teste completo de QuantiFERON®-TB Gold IT com uma nova amostra de sangue. O teste ELISA de plasmas estimulados poderá ser repetido em caso de suspeita de lavagem inadequada ou de outro desvio do procedimento com o teste ELISA. Não seria de esperar que testes inconclusivos que resultem de valores reduzidos de agente mitogénico ou de valores elevados do nulo se alterem na repetição, a não ser que haja um erro no teste ELISA. Resultados inconclusivos devem ser relatados como tal. O médico pode escolher entre recolher outra amostra ou efectuar outros procedimentos, conforme seja conveniente.

Amostra de plasma coagulado

Se ocorrerem coágulos de fibrina com amostras de plasma armazenadas durante um longo período, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

Resolução de problemas ELISA

Desenvolvimento cromático não-específico

POSSÍVEL CAUSA	SOLUÇÃO
Lavagem incompleta da placa.	Lave a placa pelo menos 6 vezes com 400 μ L/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, dependendo do lavador usado. Deve respeitar-se um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.
Contaminação cruzada de poços ELISA.	Cuidado ao pipetar e misturar a amostra, a fim de minimizar o risco.
Data de validade do kit / componentes expirou.	Assegure-se de que o kit usado está dentro da validade. Assegure-se de que o Standard e o Conjugado 100X Concentrado reconstituídos são usados no espaço de três meses a contar da data de reconstituição.
Solução de Substrato Enzimático está contaminada.	Ponha de parte o substrato se apresentar coloração azul. Assegure-se de que são usados reservatórios limpos para os reagentes.

Leituras de baixa Densidade Óptica para Standards

POSSÍVEL CAUSA	SOLUÇÃO
Erro de diluição do Standard.	Assegure-se de que as diluições do Kit Standard são preparadas correctamente, conforme o Folheto Informativo.
Erro de pipetagem.	Assegure-se de que as pipetas são calibradas e usadas de acordo com as instruções do fabricante.
Temperatura de incubação demasiado baixa.	A incubação do ELISA deve ser feita à temperatura ambiente, entre 17°C e 27°C.
Tempo de incubação demasiado curto.	A incubação da placa com o conjugado, standards e amostras deve durar 120 \pm 5 minutos. A Solução de Substrato Enzimático é incubada na placa durante 30 minutos.
Usado um filtro incorrecto do leitor de placas.	A placa deve ser lida a 450nm, com um filtro de referência entre 620 e 650nm.
Reagentes estão demasiado frios.	Todos os reagentes, à excepção do Conjugado 100X Concentrado, têm de ser trazidos à temperatura ambiente antes de iniciar a análise. Isso leva aproximadamente uma hora.
Data de validade do kit / componentes expirou.	Assegure-se de que o kit usado está dentro da validade. Assegure-se de que o Standard e o Conjugado 100X Concentrado reconstituídos são usados no espaço de três meses a contar da data de reconstituição.

Fundo de cor intensa

POSSÍVEL CAUSA	SOLUÇÃO
Lavagem incompleta da placa.	Lave a placa pelo menos 6 vezes com 400µL/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, dependendo do lavador usado. Deve respeitar-se um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.
Temperatura de incubação demasiado elevada.	A incubação do ELISA deve ser feita à temperatura ambiente, entre 17°C e 27°C.
Data de validade do kit / componentes expirou.	Assegure-se de que o kit usado está dentro da validade. Assegure-se de que o Standard e o Conjugado 100X Concentrado reconstituídos são usados no espaço de três meses a contar da data de reconstituição.
Solução de Substrato Enzimático está contaminada.	Ponha de parte o substrato se apresentar coloração azul. Assegure-se de que são usados reservatórios limpos para os reagentes.

Curva standard não-linear e variabilidade entre as amostras duplas

POSSÍVEL CAUSA	<u>SOLUÇÃO</u>
Lavagem incompleta da placa.	Lave a placa pelo menos 6 vezes com 400µL/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, dependendo do lavador usado. Deve respeitar-se um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.
Erro de diluição do Standard.	Assegure-se de que as diluições do Standard são preparadas correctamente, conforme o Folheto Informativo.
Mistura mal feita.	Misture os reagentes totalmente por inversão ou por turbilhão antes de os adicionar à placa.
Técnica inconsistente de pipetagem ou interrupção durante a configuração da análise.	A adição de amostras e de Standard deve ser feita de forma contínua. Todos os reagentes devem ser preparados antes de começar a análise.

Um vídeo sobre o procedimento durante a análise e sobre a solução para a maioria dos problemas técnicos encontra-se no CD de Informação sobre o Produto e Guia Técnica, disponível gratuitamente junto da Cellestis ou através do seu distribuidor.

11. BIBLIOGRAFIA

A comprehensive list of QuantiFERON®-TB Gold references is located on the Cellestis website (www.cellestis.com)

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.* 2008. [Epub ahead of print].
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. [Epub ahead of print].
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.* 2008. [Epub ahead of print].
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.* 2008. [Epub ahead of print].
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.

13. PROCEDIMENTO ABREVIADO DO TESTE

FASE 1 – INCUBAÇÃO DO SANGUE

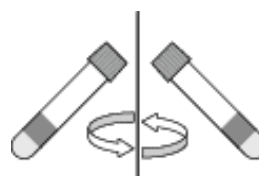
1. Recolha o sangue do paciente para dentro dos tubos para colheita de sangue e misture-o, **agitando os tubos vigorosamente durante 5 segundos (ou 10 vezes)**, para assegurar que **toda a superfície interna do tubo** ficou revestida com sangue.



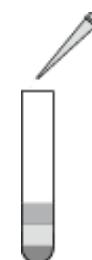
2. Incube os tubos **na vertical** a 37°C, durante 16 a 24 horas.



3. A seguir à incubação, centrifugue os tubos durante 5 a 15 minutos, entre 2000 e 3000g RCF (g), para separar o plasma dos glóbulos vermelhos.

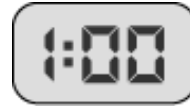


4. A seguir à centrifugação, recolha uma amostra de plasma de cada tubo para quantificação de IFN- γ .



FASE 2 – IFN- γ ELISA

1. Deixe os componentes ELISA, à exceção do Conjugado 100X Concentrado, atingirem a temperatura ambiente durante, pelo menos, 60 minutos.

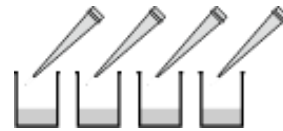


2. Reconstitua o Kit Standard a 8,0 UI/mL com água destilada ou desionizada. Prepare quatro (4) diluições standard.

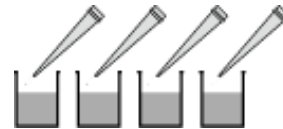


3. Reconstitua Conjugado 100X Concentrado liofilizado com água destilada ou desionizada.

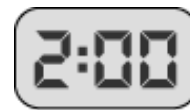
4. Prepare conjugado pronto a usar em Diluente Verde e adicione 50 μ L a todos os poços.



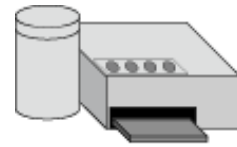
5. Adicione 50 μ L de amostras de plasma para teste e 50 μ L standards aos poços adequadas. Misture usando o agitador.



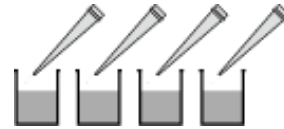
6. Incube durante 120 minutos à temperatura ambiente.



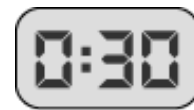
7. Lave os poços pelo menos 6 vezes com 400 μ L/poço de tampão de lavagem.



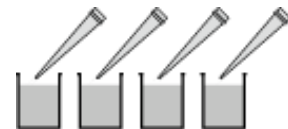
8. Adicione 100 μ L de Solução de Substrato Enzimático aos poços. Misture usando o agitador.



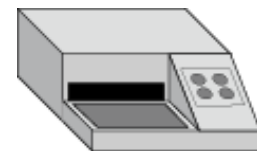
9. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.



10. Adicione 50 μ L de solução de paragem a todos os poços. Misture usando o agitador.



11. Leia os resultados a 450nm com um filtro de referência de 620 a 650nm.



12. Analise os resultados.





Fabricado para:
Cellestis Limited (Australia) e Cellestis GmbH (Europe)
1046A Dandenong Road, Carnegie, Victoria, 3163, Austrália
Telefone (Aust) +61 3 9571 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Website: www.cellestis.com

Doc. n.º 05990301C
August 2009

