



Março de 2023

Instruções de uso do QuantiFERON[®]-TB Gold Plus ELISA Kit



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Versão 1



Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso com QuantiFERON[®]-TB Gold Plus Blood Collection Tubes



622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha



1123669PTBR

Índice

Uso previsto	5
Usuário previsto	5
Descrição e princípio	6
Informações do agente patogênico.....	6
Resumo e explicação	7
Princípios do ensaio	9
Materiais fornecidos	11
Conteúdo do kit	11
Componentes do kit.....	12
Plataforma e software	12
Materiais necessários, mas não fornecidos	13
Reagentes adicionais	13
Consumíveis	13
Equipamento.....	13
Avisos e precauções	15
Informações de segurança.....	15
Informações de emergência.....	16
Precauções	17
Armazenamento e manuseio de reagentes	19
Estabilidade em uso.....	19
Reagentes reconstituídos e não usados	19
Armazenamento e manuseio de espécimes.....	20

Protocolo: realização do ensaio ELISA	21
Resultados (Cálculos)	27
Geração da curva-padrão e dos valores de amostra	27
Controle de qualidade do teste	29
Interpretação dos resultados	31
Limitações	33
Características de desempenho	34
Estudos clínicos	34
Sensibilidade	36
Valores esperados	44
Resumo de segurança e desempenho	50
Características do desempenho do ensaio	51
Desempenho analítico	51
Descarte	64
Referências	65
Guia de solução de problemas	67
Símbolos	70
Anexo A: Informações técnicas	73
Resultados indeterminados	73
Amostras de plasma coaguladas	73
Amostras de plasma lipêmico	73
Anexo B: Procedimento de teste ELISA abreviado	74
Informações sobre pedidos	76
Histórico de revisões do documento	78

Uso previsto

O ensaio QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) é um teste de diagnóstico *in vitro* que usa um coquetel de peptídeos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10 para estimular células no sangue total heparinizado. A detecção de interferon- γ (IFN- γ) por ensaio de imunoabsorção enzimática (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) é usada para identificar respostas *in vitro* a esses antígenos peptídicos associados à infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

O QFT-Plus é um teste indireto para infecção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e destinado ao uso em conjunto com a avaliação de riscos, radiografia e outras avaliações clínicas e de diagnóstico.

Usuário previsto

Este kit destina-se ao uso profissional.

O ensaio QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) deve ser utilizado por pessoal devidamente treinado em um ambiente de laboratório profissional.

Descrição e princípio

Informações do agente patogênico

A tuberculose é uma doença transmissível causada pela infecção por organismos do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* e *M. caprae*), que normalmente se espalham para novos hospedeiros por meio de núcleos de gotículas no ar de pacientes com tuberculose respiratória. Um indivíduo recém-infectado pode adoecer devido à tuberculose dentro de semanas a meses, mas a maioria dos indivíduos infectados permanece bem. A infecção latente por tuberculose (ILT), uma condição assintomática não transmissível, persiste em alguns, que poderão desenvolver tuberculose meses ou anos mais tarde. O principal objetivo de diagnosticar a ILT é o de considerar o tratamento clínico para prevenir a tuberculose. Por mais de 100 anos, o teste cutâneo tuberculínico (TCT) foi o único método disponível para o diagnóstico da ILT(4). A sensibilidade cutânea à tuberculina se desenvolve entre 2 e 10 semanas após a infecção. No entanto, alguns indivíduos infectados, incluindo aqueles com uma ampla série de patologias que prejudicam as funções imunológicas, mas também outros sem essas condições, não respondem à tuberculina. Por outro lado, alguns indivíduos com baixa probabilidade de estarem infectados com *M. tuberculosis* apresentam sensibilidade à tuberculina e resultados do TCT positivos após a vacinação com Bacillus Calmette-Guérin (BCG), infecção por micobactérias que não incluem o complexo *M. tuberculosis* ou outros fatores indeterminados.

É necessário distinguir a ILT da tuberculose, uma doença de notificação obrigatória que normalmente envolve os pulmões e o trato respiratório inferior, embora outros sistemas orgânicos possam também ser afetados. A tuberculose é diagnosticada a partir de conclusões históricas, físicas, radiológicas e micobacteriológicas.

Resumo e explicação

O teste QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) é a quarta geração da tecnologia de teste QuantiFERON-TB que avalia respostas mediadas por células por meio de uma medição quantitativa de IFN- γ em uma amostra de sangue total. O QFT-Plus é um teste qualitativo que mede as respostas imunológicas mediadas por células (cell-mediated immune, CMI) a antígenos peptídicos que simulam proteínas micobacterianas. Essas proteínas, ESAT-6 e CFP-10, estão ausentes de todas as cepas de BCG e da maioria das micobactérias não tuberculosas, com exceção de *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*(1). Geralmente, indivíduos infectados com organismos do complexo *M. tuberculosis* possuem linfócitos no sangue que reconhecem esses e outros antígenos micobacterianos. Este processo de reconhecimento envolve a geração e secreção da citocina, IFN- γ . A detecção e a subsequente quantificação de IFN- γ constituem a base deste teste.

Os testes cutâneos tuberculínicos e os testes IGRA são úteis, porém insuficientes para diagnosticar a infecção pelo complexo *M. tuberculosis* em pacientes doentes; um resultado positivo pode corroborar o diagnóstico de tuberculose; todavia, infecções provocadas por outras micobactérias (por exemplo, *M. kansasii*) poderão também levar a resultados positivos. São necessárias outras avaliações clínicas ou de diagnóstico para confirmar ou excluir a tuberculose.

Os antígenos usados no QFT-Plus são um coquetel peptídico que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10. Diversos estudos demonstram que esses antígenos peptídicos estimulam as respostas de IFN- γ nas células T de indivíduos infectados com *M. tuberculosis*, mas geralmente não em pessoas não infectadas ou vacinadas com BCG sem a doença ou risco de ILTB (1, 2, 6, 9). No entanto, tratamentos clínicos ou condições que comprometam a funcionalidade imunológica podem potencialmente reduzir as respostas de IFN- γ . Os pacientes com certas infecções micobacterianas poderão também responder a ESAT-6 e CFP-10, uma vez que os genes que codificam essas proteínas estão presentes em *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1, 3, 7).

A população de teste para o teste QFT-Plus é constituída por pacientes com tuberculose ativa clinicamente confirmada e pacientes com risco de infecção por tuberculose ou infecção latente por tuberculose (ILTb). Sem quaisquer limitações de idade, gênero ou de outro tipo.

Na infecção por tuberculose micobacteriana (MTB), as células T CD4⁺ desempenham um papel fundamental no controle imunológico através da secreção de citocina IFN- γ . As evidências atuais corroboram um papel das células T CD8⁺ na defesa do hospedeiro contra MTB produzindo IFN- γ e outros fatores solúveis que ativam macrófagos para suprimir a evolução de MTB, destruir as células infectadas ou realizar diretamente a lise de MTB intracelular. As células CD8⁺ específicas de MTB produtoras de IFN- γ foram detectadas em indivíduos com ILTB e com TB ativa. Além disso, os linfócitos T CD8⁺ específicos para ESAT-6 e CFP-10 são descritos como sendo mais frequentemente detectados em indivíduos com TB ativa comparativamente a ILTB e podem estar associados a uma exposição recente a MTB (8, 10-12). Adicionalmente, células T CD8⁺ específicas de MTB produtoras de IFN- γ também foram detectadas em indivíduos com TB ativa com coinfeção por HIV (13, 14) e em crianças com TB (15).

O QFT-Plus possui dois tubos de antígeno TB distintos: TB Antigen Tube 1 (TB1) e TB Antigen Tube 2 (TB2). Ambos os tubos contêm antígenos peptídicos dos antígenos associados ao complexo MTB, ESAT-6 e CFP-10. Ambos os tubos TB1 e TB2 contêm peptídeos de ESAT-6 e CFP-10 concebidos para induzir respostas CMI de linfócitos T auxiliares CD4⁺; o tubo TB2 contém um conjunto adicional de peptídeos orientados para a indução de respostas CMI de linfócitos T citotóxicos CD8⁺.

Os fatores de risco para infecção por *M. tuberculosis* incluem indicadores históricos, médicos ou epidemiológicos de tuberculose ou exposição à tuberculose. Para recomendações mais detalhadas acerca do diagnóstico de infecção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e da seleção de pessoas para testes, consulte as orientações mais recentes da OMS <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment> (16). O QFT-Plus foi testado em alguns grupos de pacientes indicados para o rastreio de infecção por TB, de acordo com as orientações atuais da OMS (16), incluindo: pessoas que testaram positivo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que tiveram contato com pacientes de TB recentes e residentes de ambientes de alta concentração que foram expostos a adultos com alto risco de TB (5).

Princípios do ensaio

O QFT-Plus é um ensaio qualitativo que utiliza Tubos de coleta de sangue especializados, contendo antígenos peptídicos que simulam proteínas de *M. tuberculosis*, os quais são usados para coletar sangue total. A incubação do sangue nos tubos ocorre durante 16 a 24 horas, após as quais o plasma é coletado e testado quanto à presença de IFN- γ produzido em resposta aos antígenos peptídicos.

Primeiramente, o sangue total é coletado para cada um dos QFT-Plus Blood Collection Tubes, que incluem um tubo Nil, um tubo TB1, um tubo TB2 e um tubo Mitogen. Como alternativa, o sangue pode ser coletado em um único tubo de coleta de sangue contendo heparina de lítio ou de sódio como anticoagulante e, em seguida, transferido para os QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Os QFT-Plus Blood Collection Tubes são agitados para misturar o antígeno com o sangue e, logo que possível, devem ser incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro de 16 horas após a coleta. Após um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é processado e a quantidade de IFN- γ (UI/ml) é medida pelo ELISA. O QFT-Plus ELISA usa a solução padrão IFN- γ humano recombinante, que foi testada com uma preparação de IFN- γ de referência (Ref. NIH: Gxg01-902-535). Os resultados da amostra de teste são indicados em Unidades Internacionais por ml (UI/ml) relativamente a uma curva-padrão preparada testando diluições da solução padrão fornecida com o kit.

Sabe-se que os anticorpos heterófilos (por exemplo, anti-camundongo humano) no soro ou plasma de certos indivíduos causam interferência nos imunoensaios. O efeito de anticorpos heterófilos no QFT-Plus ELISA é minimizado pela adição de soro normal de camundongo ao Diluente verde e pelo uso de fragmentos de anticorpo monoclonal F(ab')₂ como o anticorpo de captura de IFN- γ no revestimento dos poços da microplaca.

Um ensaio QFT-Plus é considerado positivo para uma resposta de IFN- γ a qualquer tubo de antígeno TB que está significativamente acima do valor de Nil de IFN- γ em UI/ml. A amostra de plasma do tubo Mitogen serve como controle positivo de IFN- γ para cada espécime testado. Uma resposta baixa a Mitogen (<0,5 UI/ml) indica um resultado indeterminado quando uma amostra de sangue também tem uma resposta negativa aos antígenos TB. Esse padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, atividade reduzida dos linfócitos devido ao manuseio inadequado do espécime, enchimento/mistura incorreta do tubo Mitogen ou incapacidade de os linfócitos do paciente gerarem IFN- γ . Níveis elevados de IFN- γ na amostra Nil podem ocorrer com a presença de anticorpos heterófilos ou com secreção de IFN- γ intrínseca. O tubo Nil se ajusta aos efeitos de fundo (por ex., níveis elevados de IFN- γ circulante ou presença de anticorpos heterófilos). O nível de IFN- γ do tubo Nil é subtraído do nível de IFN- γ para os tubos de antígeno TB e o tubo Mitogen. A faixa de medição do QFT-Plus ELISA é de até 10 UI/ml.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

Componentes do ELISA Nº de referência	Kit de 2 placas 622120	Pacote de laboratório de referência 622822
Microplate Strips (Tiras de microplacas) (12 x 8 poços) revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN- γ humano-murino	2 conjuntos de tiras de microplacas de 12 x 8	20 conjuntos de tiras de microplacas de 12 x 8
IFN- γ Standard (Solução padrão de IFN- γ), liofilizada (contém IFN- γ humano recombinante, caseína bovina, 0,01% w/v de Timerosal)	1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)	10 x frascos (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (Diluyente verde) (contém caseína bovina, soro de camundongo normal, 0,01% w/v de Timerosal)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Conjugado 100x concentrado), liofilizado (HRP de anti-IFN- γ humano-murino, contém 0,01% de Timerosal)	1 x 0,3 ml (quando reconstituído)	10 x 0,3 ml (quando reconstituído)
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampão de lavagem 20x concentrado) (pH 7,2, contém 0,05% v/v de ProClin® 300)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato enzimático) (contém H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de parada enzimática) (contém 0,5 M H ₂ SO ₄)	1 x 15 ml	10 x 15 ml
<i>Instruções de uso do QuantiFERON TB-Gold Plus ELISA Kit</i>	1	1

Componentes do kit

Controles e calibradores

O QFT-Plus ELISA usa a solução padrão IFN- γ humano recombinante, que foi testada com uma preparação de IFN- γ de referência (Ref. NIH: Gxg01-902-535).

Plataforma e software

O QFT-Plus Analysis Software é opcional e pode ser usado para analisar dados brutos e calcular resultados. Ele está disponível para download em www.qiagen.com.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Reagentes adicionais

- QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- 2 litros de água deionizada ou destilada

Consumíveis

- Tampa da placa para uma placa de 96 poços
- Opcional: microtubos de 1 ml com tampas em racks no formato de 96 poços ou microplacas sem revestimento com vedação plástica para o armazenamento de plasma (22 pacientes/rack ou plasma)
- Reservatórios de reagente

Equipamento*

- Incubadora a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (com ou sem CO_2)
- Pipetas de volume variável calibradas para administração de $10\ \mu\text{l}$ a $1000\ \mu\text{l}$ com pontas descartáveis
- Pipeta multicanal calibrada com capacidade para administração de $50\ \mu\text{l}$ e $100\ \mu\text{l}$ com pontas descartáveis
- Agitador de microplacas com velocidade de 500 a 1000 rpm
- Lavadora de microplacas (para segurança no manuseio de amostras de plasma, recomenda-se uma lavadora automática de placas)
- Leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 nm a 650 nm
- Vórtex de velocidade variável

* Antes do uso, certifique-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

- Centrífuga capaz de centrifugar os tubos de coleta de sangue a pelo menos 3000 RCF (g)
- Cilindro graduado, 1 ou 2 litros

Avisos e precauções

Esteja ciente de que poderá ser necessário consultar seus regulamentos locais para relatar incidentes graves que tenham ocorrido com o dispositivo ao fabricante e/ou seu representante autorizado e à autoridade regulatória na qual o usuário e/ou o paciente estão estabelecidos.

Para uso em diagnóstico in vitro.

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco apropriado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas. Elas estão disponíveis online em formato PDF conveniente e compacto, em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit e componente do kit QIAGEN.

- Espécimes e amostras são potencialmente infecciosos. Descarte os resíduos das amostras e dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.
- Um resultado de QFT-Plus negativo não exclui a possibilidade de infecção por *M. tuberculosis* ou de tuberculose: os resultados falso-negativos podem ocorrer devido ao estágio da infecção (por ex., espécime obtido antes do desenvolvimento da resposta imunológica celular), manuseio incorreto dos tubos de coleta de sangue após punção venosa, realização incorreta do ensaio ou outras variáveis imunológicas do indivíduo, incluindo aquelas relacionadas a quaisquer comorbidades. Anticorpos heterófilos ou produção de IFN- γ não específico de outras condições inflamatórias podem mascarar respostas específicas aos peptídeos ESAT-6 ou CFP-10.
- Um resultado positivo do QFT-Plus não deve ser a base única ou definitiva para determinar a infecção por *M. tuberculosis*. A realização incorreta do ensaio pode causar respostas falso-positivas do QFT-Plus.

- Um resultado positivo do QFT-Plus deve ser acompanhado por uma avaliação clínica mais aprofundada de tuberculose ativa (por ex., esfregaço e cultura de bacilos ácido-resistentes e radiografia do tórax).
- Embora ESAT-6 e CFP-10 estejam ausentes de todas as cepas de BCG e da maioria das micobactérias não tuberculosas conhecidas, é possível que ocorra um resultado positivo do QFT-Plus devido à infecção por *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. Em caso de suspeita das referidas infecções, deverão ser realizados testes alternativos.
- Um resultado falso-negativo do QFT-Plus pode decorrer da coleta inadequada da amostra de sangue ou do manuseio incorreto do espécime, afetando a função dos linfócitos. Para obter informações acerca do manuseio correto dos espécimes de sangue, consulte a seção "Protocolo: realização do ensaio ELISA", página 21. Atrasos na incubação podem levar a resultados falso-negativos ou indeterminados, e outros parâmetros técnicos podem afetar a capacidade de detecção de uma resposta de IFN- γ relevante.

Informações de emergência

CHEMTREC

Fora dos EUA e do Canadá +1 703-527-3887

Precauções

<p>CUIDADO</p> 	<p>Manuseie o sangue humano como se fosse potencialmente infeccioso.</p> <p>Observe as diretrizes relevantes de manuseio de sangue. Descarte amostras e materiais em contato com sangue ou produtos sanguíneos de acordo com os regulamentos federais, estaduais e locais.</p>
---	--

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Contém: ácido sulfúrico. Aviso! Pode ser corrosivo para metais. Provoca irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Aviso! Causa irritação leve da pele. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QuantiFERON Green Diluent



Contém: tartrazina. Aviso! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Nocivo para a vida aquática, com efeitos duradouros. Evite liberar no meio ambiente.

Mais informações

Folhas de dados de segurança: www.qiagen.com/safety

- O timerosal é usado como conservante em alguns reagentes do QFT-Plus. Pode ser tóxico em caso de ingestão, inalação ou contato com a pele.
- Divergências em relação às *Instruções de uso do QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)* podem gerar resultados incorretos. Leia as instruções com atenção antes do uso.
- Não use o kit se algum frasco de reagente apresentar sinais de danos ou vazamentos antes do uso.
- **Importante:** Inspeccione os frascos antes do uso. Não use frascos de Conjugado ou Solução padrão de IFN- γ que apresentem sinais de danos ou se a vedação de borracha tiver sido comprometida. Não manuseie frascos quebrados. Tome as precauções de segurança apropriadas para os descartar com segurança. Recomenda-se o uso de um deslacrador de frascos para abrir os frascos de Conjugado ou Solução padrão de IFN- γ , a fim de minimizar o risco de ferimentos causados pelo lacre metálico.
- Não misture nem use as Tiras de microplaca, a Solução padrão de IFN- γ , o Diluente verde ou o Conjugado 100x concentrado de diferentes lotes do kit QFT-Plus. Os outros reagentes (Tampão de lavagem 20x concentrado, Solução de substrato enzimático e Solução de parada enzimática) podem ser trocados entre kits contanto que os reagentes estejam dentro do seu período de validade e que os detalhes do lote sejam registrados.
- Descarte os reagentes e as amostras biológicas não usados em conformidade com os regulamentos locais, estaduais e federais.
- Não use o QFT-Plus ELISA Kit após a data de validade.
- Os procedimentos laboratoriais corretos devem ser sempre respeitados.
- Certifique-se de que equipamentos de laboratório, como lavadoras e leitores de placas, tenham sido calibrados/validados para uso.

Armazenamento e manuseio de reagentes

É necessário prestar atenção às datas de validade e às condições de armazenamento impressas na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não use componentes cuja data de validade tenha expirado ou que tenham sido incorretamente armazenados.

Estabilidade em uso

- Armazene o kit ELISA entre 2 °C e 8 °C.
- Mantenha a Solução de substrato enzimático sempre protegida da luz solar direta.

Reagentes reconstituídos e não usados

- Para obter instruções sobre como reconstituir os reagentes, consulte "Protocolo: realização do ensaio ELISA", página 21.
- A solução padrão reconstituída do kit pode ser guardada durante 3 meses, se mantida entre 2 °C e 8 °C.

Anote a data na qual a solução padrão do kit foi reconstituída.

- O Conjugado 100x concentrado reconstituído deve ser armazenado novamente entre 2 °C e 8 °C e tem de ser usado dentro de 3 meses.

Anote a data na qual o conjugado foi reconstituído.

- O conjugado na concentração de trabalho deve ser usado no período de 6 horas após o preparo.
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado em temperatura ambiente por até 2 semanas.
- As tiras de microplacas são de uso único. As tiras não usadas podem ser removidas da estrutura de placas e armazenadas para uso futuro.

Armazenamento e manuseio de espécimes

Para obter mais detalhes acerca do fluxo de trabalho de coleta de sangue para o teste QFT-Plus, consulte as *Instruções de uso dos QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes* (1123668).

Protocolo: realização do ensaio ELISA

Pontos importantes antes de começar

Configuração (tempo necessário para realizar o ensaio)

- Para obter resultados válidos do ensaio QFT-Plus, o operador precisa executar tarefas específicas dentro de tempos determinados. Antes de utilizar o ensaio, recomenda-se que o operador planeje cuidadosamente cada etapa do ensaio para dispor do tempo adequado para realizar cada etapa. O tempo necessário está estimado abaixo; o tempo de teste de várias amostras quando em lote também é indicado.
 - Aproximadamente 3 horas para uma placa ELISA
 - <1 hora de trabalho
 - Adicionar 10 a 15 minutos para cada placa extra

IFN- γ ELISA

- Para obter informações acerca dos materiais necessários para executar o ELISA, consulte "Conteúdo do kit", páginas 11 e "Materiais necessários, mas não fornecidos", página 13.

Procedimento

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o Conjugado 100x concentrado, têm de ser colocadas à temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) antes de serem usadas. Aguarde, pelo menos, 60 minutos para alcançar o equilíbrio.
2. Remova as tiras de placa de ELISA que não sejam necessárias na estrutura, vede novamente na bolsa de papel alumínio e retorne ao refrigerador para armazenamento até ser necessária.

3. Deixe pelo menos 1 tira para as soluções padrão QFT-Plus e tiras suficientes para o número de indivíduos a serem testados (para obter informações acerca do formato de placa recomendado, consulte a Figura 2). Após o uso, conserve a estrutura e a tampa para usar com as tiras restantes.
 - 3a. Reconstitua a Solução padrão de IFN- γ com o volume de água deionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco. Misture suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir que todo o conteúdo do frasco se dissolva completamente. A reconstituição da solução padrão de IFN- γ para o volume correto produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/ml.
 - 3b. Usando a solução padrão reconstituída, prepare uma série de diluições de quatro concentrações de IFN- γ (consulte a Figura 1).
 - 3c. Deve ser gerada uma curva-padrão com as seguintes concentração de IFN- γ :
 - S1 (Solução padrão 1) contém 4,0 UI/ml
 - S2 (Solução padrão 2) contém 1,0 UI/ml
 - S3 (Solução padrão 3) contém 0,25 UI/ml
 - S4 (Solução padrão 4) contém 0 UI/ml (apenas o Diluente verde [GD]).
 - 3d. As soluções padrão devem ser testadas pelo menos em duplicado.
 - 3e. Prepare novas diluições da solução padrão do kit para cada sessão do ELISA.

Procedimento

A	Rotule quatro tubos: S1, S2, S3, S4
B	Adicione 150 μ l de GD a S1, S2, S3, S4
C	Adicione 150 μ l da solução padrão do kit a S1 e misture bem
D	Transfira 50 μ l de S1 para S2 e misture bem
E	Transfira 50 μ l de S2 para S3 e misture bem
F	O GD sozinho serve como padrão zero (S4)

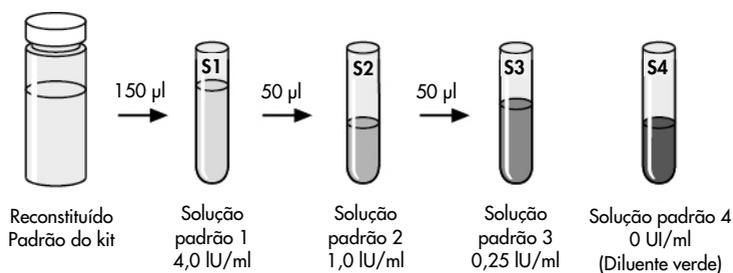


Figura 1. Preparação da série de diluições de curva-padrão

4. Reconstitua o Conjugado 100x concentrado liofilizado com 0,3 ml de água deionizada ou destilada. Misture suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir que todo o conteúdo do frasco se dissolva completamente.
 - 4a. O conjugado na concentração de trabalho é preparado diluindo a quantidade necessária de Conjugado 100x concentrado no Diluyente verde (Tabela 1).
 - 4b. O conjugado na concentração de trabalho deve ser usado no período de 6 horas após o preparo.
 - 4c. Retorne qualquer Conjugado 100x concentrado não usado a uma temperatura entre 2°C a 8°C imediatamente após o uso.

Tabela 1. Preparação do Conjugado (concentração de trabalho)

Número de tiras	Volume de conjugado (Concentração de 100x)	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

5. Para as amostras de plasma coletadas de tubos de coleta de sangue e subsequentemente armazenadas (refrigeradas ou congeladas), misture bem as amostras armazenadas antes de adicionar ao poço de ELISA. As amostras de plasma podem ser armazenadas em QFT-Plus Blood Collection Tubes centrifugados por até 28 dias a uma temperatura de 2 °C a 8 °C. Ainda, as amostras de plasma coletadas podem ser armazenadas por até 28 dias a uma temperatura de 2 °C a 8 °C. As amostras de plasma coletadas também podem ser armazenadas a uma temperatura abaixo de -20 °C (preferencialmente abaixo de -70 °C) por períodos mais longos.

As amostras de plasma podem ser carregadas/usadas diretamente dos tubos de coleta de sangue centrifugados para medição na placa QFT-Plus ELISA.

Importante: Se as amostras de plasma forem transferidas diretamente dos QFT-Plus Blood Collection Tubes centrifugados, deverá ser evitada qualquer mistura do plasma. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

6. Adicione 50 µl de conjugado na concentração de trabalho recém-preparado a cada um dos poços de ELISA.
7. Adicione 50 µl de amostra de plasma para teste aos poços adequados (para a disposição recomendada da placa de ELISA, consulte a Figura 2).
8. Por fim, adicione 50 µl de cada uma das Soluções padrão 1 a 4 aos poços adequados (para a disposição recomendada da placa de ELISA, consulte a Figura 2). As soluções padrão devem ser testadas, pelo menos, em duplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
C	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
G	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Figura 2. Disposição recomendada da placa de ELISA. S1 (Solução padrão 1), S2 (Solução padrão 2), S3 (Solução padrão 3), S4 (Solução padrão 4). 1 N (Amostra 1. Plasma de controle Nil), 1 TB1 (Amostra 1. Plasma TB1), 1 TB2 (Amostra 1. Plasma TB2), 1 M (Amostra 1. Plasma Mitogen).

9. Cubra a placa de ELISA e misture bem o conjugado e as amostras/soluções padrão de plasma usando um agitador de microplacas por 1 minuto a 500–1000 rpm. Evite salpicos.
10. Cubra a placa de ELISA e incube à temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 120 ± 5 minutos. Durante a incubação, a placa de ELISA não deve estar exposta à luz solar direta. Divergências em relação ao intervalo de temperatura especificado podem levar a resultados incorretos.
11. Durante a incubação da placa de ELISA, prepare o tampão de lavagem na concentração de trabalho. Dilua uma parte do Tampão de lavagem 20x concentrado em 19 partes de água deionizada ou destilada e misture bem. É fornecido Tampão de lavagem 20x concentrado suficiente para preparar 2 litros de tampão de lavagem na concentração de trabalho.

12. Quando a incubação da placa de ELISA estiver concluída, lave os poços da placa de ELISA com 400 µl de tampão de lavagem na concentração de trabalho. Execute a etapa de lavagem pelo menos 6 vezes. Por razões de segurança, recomenda-se uma lavadora automática de placas ao manusear amostras de plasma.

Uma lavagem meticulosa é muito importante para a realização do ensaio. Verifique se cada poço está completamente cheio com tampão de lavagem na parte superior do poço para cada ciclo de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre cada ciclo.

Deve ser adicionado desinfetante laboratorial padrão ao reservatório de efluentes e devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.

13. Bata a placa de ELISA com a face para baixo na toalha absorvente e sem fiapos para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100 µl de Solução de substrato enzimático a cada poço, cubra a placa e misture bem por 1 minuto a 500–1000 rpm usando um agitador de microplacas.
14. Cubra a placa de ELISA e incube à temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 30 minutos. Durante a incubação, a placa de ELISA não deve estar exposta à luz solar direta.
15. Após a incubação de 30 minutos, adicione 50 µl de Solução de parada enzimática a cada poço na mesma ordem em que o substrato foi adicionado e misture bem a 500–1000 rpm usando um agitador de microplacas.
16. Meça a densidade óptica (Optical Density, OD) dos poços da placa de ELISA no prazo de 5 minutos após a interrupção da reação usando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e com um filtro de referência de 620 a 650 nm. Os valores de OD são usados para calcular os resultados.

Resultados (Cálculos)

O QFT-Plus Analysis Software pode ser usado para analisar dados brutos e calcular resultados. O software está disponível em www.qiagen.com. Certifique-se de que seja utilizada a última versão do QFT-Plus Analysis Software.

O software realiza uma avaliação de controle de qualidade do ensaio, gera uma curva-padrão e fornece um resultado de teste para cada indivíduo, conforme detalhado em "Interpretação dos resultados", na página 31. O software apresenta todas as concentrações superiores a 10 UI/ml como ">10", tendo em vista que esses valores estão além do intervalo linear validado do ELISA.

Como alternativa ao uso do QFT-Plus Analysis Software, os resultados podem ser determinados de acordo com o método a seguir.

Geração da curva-padrão e dos valores de amostra

Se o QFT-Plus Analysis Software não for usado

A determinação da curva-padrão e dos valores de amostra em UI/ml exigirão um programa de planilhas, como o Microsoft® Excel®, se o QFT-Plus Analysis Software não for usado.

Utilizando um programa de planilhas

1. Determine os valores médios de OD das réplicas de solução padrão do kit em cada placa.
2. Construa uma curva-padrão de $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$ traçando o $\log_{(e)}$ da OD média (eixo Y) em relação ao $\log_{(e)}$ da concentração de IFN- γ das soluções padrão em UI/ml (eixo X), omitindo desses cálculos a solução padrão zero. Calcule a linha de melhor ajuste para a curva-padrão por análise de regressão.

- Use a curva-padrão para determinar a concentração de IFN- γ (UI/ml) para cada uma das amostras de plasma de teste, usando o valor de OD de cada amostra.
- Esses cálculos podem ser realizados usando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas e com softwares de folha de cálculo ou estatístico padrão (como o Microsoft Excel). Recomenda-se que sejam usados esses pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (coefficient of variation, %CV) para as soluções padrão e o coeficiente de correlação (r) da curva-padrão.

Cálculo de amostras

Se as leituras de OD a seguir fossem obtidas para as soluções padrão, os cálculos usando $\log(e)$ – seguiriam os da Tabela 2.

Tabela 2. Curva-padrão

Solução padrão	UI/ml	Valores de OD a e b	OD média	CV%	\log_{10} UI/ml	\log_{10} Média (OD)
Solução padrão 1	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Solução padrão 2	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Solução padrão 3	0,25	0,114, 0,136	0,125	NA	-1,386	-2,079
Solução padrão 4	0	0,034, 0,037	0,036	NA	NA	NA

A equação da curva é $y = 0,7885(X) - 0,9837$, onde "m" = 0,7885 e "c" = -0,9837. Esses valores são usados na equação $X = (Y-c)/m$ para resolver X. Com base na curva-padrão, o coeficiente de correlação calculado (r) = 1000. NA: não aplicável.

Usando os critérios especificados em "Controle de qualidade do teste", na página 29, é determinada a validade do ensaio.

A curva-padrão (Tabela 2) é usada para converter as respostas de OD do antígeno em Unidades Internacionais (UI/ml).

Tabela 3. Cálculo de amostras

Antígeno	Valor de OD	Log _(e) Valor de OD	X	e ^x (UI/ml)	Antígeno –Nil (UI/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	–
TB1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,16
TB2	1,356	0,305	1,634	5,12	5,07
Mitogen	1,783	0,578	1,981	7,25	7,20

Os valores de IFN- γ (em UI/ml) para TB1, TB2 e Mitogen são corrigidos para o fundo subtraindo o valor de UI/ml obtido para o respectivo controle Nil. Esses valores corrigidos são usados para a interpretação dos resultados dos testes.

Controle de qualidade do teste

A exatidão dos resultados de teste depende da geração de uma curva-padrão exata. Portanto, os resultados derivados das soluções padrão devem ser examinados antes que os resultados das amostras de teste possam ser interpretados.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de OD médio da Solução padrão 1 deve ser $\geq 0,600$.
- O %CV dos valores replicados da Solução padrão 1 e da Solução padrão 2 deve ser $\leq 15\%$.
- Os valores de OD replicados da Solução padrão 3 e da Solução padrão 4 não podem variar mais do que 0,040 unidades de densidade óptica em relação a sua média.
- O coeficiente de correlação (r) calculado a partir dos valores médios de absorbância das soluções padrão tem de ser $\geq 0,98$.
- Se os critérios acima não forem atendidos, a execução será inválida e deverá ser repetida.
- O valor de OD da solução padrão zero (Diluyente verde) deve ser $\leq 0,150$. Se o valor de OD médio for $>0,150$, o procedimento de lavagem da placa deverá ser investigado.

O QFT-Plus Analysis Software calcula e relata esses parâmetros de controle de qualidade.

Cada laboratório deve determinar os tipos apropriados de materiais de controle e a frequência dos testes de acordo com as organizações locais, estaduais, federais ou outras aplicáveis. Deve-se considerar a avaliação externa da qualidade e os procedimentos alternativos de validação.

Nota: Plasmas misturados com IFN- γ recombinante demonstraram reduções de até 50% na concentração quando armazenados a 2–8 °C e -20 °C. Não se recomenda o IFN- γ recombinante para estabelecer soluções padrão de controle.

Interpretação dos resultados

Os resultados do QFT-Plus são interpretados usando os critérios a seguir (Tabela 4).

Importante: Diagnosticar ou excluir a tuberculose e avaliar a probabilidade de ILTB requer uma combinação de conclusões epidemiológicas, históricas, clínicas e de diagnóstico que deve ser considerada ao interpretar os resultados do QFT-Plus. Para as diretrizes gerais acerca do diagnóstico e tratamento de TB e ILTB, consulte:

(<https://www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/default.htm>).

Tabela 4. Interpretação dos resultados do teste QFT-Plus

Nil (UI/ml)	TB1 menos Nil (UI/ml)	TB2 menos Nil (UI/ml)	Mitogen menos Nil (UI/ml)*	Resultado do QFT-Plus	Relato/Interpretação
≤8,0	≥0,35 e ≥25% de Nil	Qualquer um	Qualquer um	Positivo†	Provável infecção por <i>M. tuberculosis</i>
	Qualquer um	≥0,35 e ≥25% de Nil			
	<0,35 ou ≥0,35 e <25% de Nil	<0,35 ou ≥0,35 e <25% de Nil	≥0,50	Negativo	IMPROVÁVEL infecção por <i>M. tuberculosis</i>
	<0,35 ou ≥0,35 e <25% de Nil	<0,35 ou ≥0,35 e <25% de Nil	<0,50	Indeterminado‡	Não é possível determinar a probabilidade de infecção por <i>M. tuberculosis</i>
>8,0§	Qualquer um				

* As respostas ao controle positivo do Mitogen (e, ocasionalmente, antígeno TB) podem estar fora do intervalo do leitor de microplacas. Isso não afeta os resultados do teste. Os valores >10 UI/ml são relatados pelo software QFT-Plus como >10 UI/ml.

† Quando não há suspeita de infecção por *M. tuberculosis*, é possível confirmar resultados inicialmente positivos voltando a testar as amostras originais de plasma em duplicado no QFT-Plus ELISA. Se a repetição do teste de uma ou das duas réplicas for positiva, o resultado do teste será considerado positivo.

‡ Consulte "Guia de solução de problemas" (página 67) para possíveis causas.

§ Nos estudos clínicos, menos de 0,25% dos participantes apresentaram níveis de IFN-γ de >8,0 UI/ml para o valor de Nil.

A magnitude do nível de IFN- γ medido não pode ser correlacionada com o estágio ou grau da infecção, o nível de resposta imunológica ou com a probabilidade de progressão da doença ativa. Uma resposta de TB positiva em indivíduos negativos a Mitogen é rara, mas já foi observada em pacientes com TB. Isso indica que a resposta de IFN- γ aos antígenos TB é superior à resposta de Mitogen, o que é possível uma vez que o nível de Mitogen não estimula ao máximo a produção de IFN- γ pelos linfócitos.

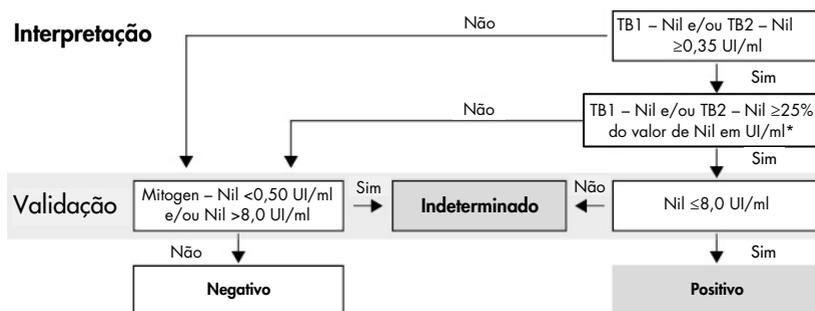


Figura 3. Interpretação do teste QFT-Plus. * Para que o valor de TB1 menos Nil ou TB2 menos Nil seja válido, o valor $\geq 25\%$ de Nil em UI/ml deve ser proveniente do mesmo tubo que o resultado original $\geq 0,35$ UI/ml.

Limitações

Os resultados do teste QFT-Plus têm de ser usados em conjunto com o histórico epidemiológico, o estado clínico atual e outras avaliações de diagnóstico de cada indivíduo.

Os indivíduos com valores de Nil maiores que 8 UI/ml são classificados como "Indeterminado" porque uma resposta aos antígenos TB superior a 25% pode estar fora do intervalo de determinação do ensaio.

- O valor preditivo de um resultado positivo do QFT-Plus no diagnóstico de infecção por *M. tuberculosis* depende da probabilidade de infecção, que é avaliada pelos achados históricos, epidemiológicos, clínicos e de outro tipo.
- Um diagnóstico de ILTB exige que a possibilidade de tuberculose seja descartada por uma avaliação médica, incluindo uma avaliação dos testes médicos e diagnósticos atuais da doença, conforme indicado.
- Um resultado negativo deve ser considerado com os dados médicos e históricos do indivíduo relevantes para a probabilidade de infecção por *M. tuberculosis* e o risco potencial de progressão para tuberculose, especialmente para indivíduos com funcionalidade imunológica comprometida.

Poderão ocorrer resultados não confiáveis ou indeterminados devido a:

- Divergências em relação ao procedimento descrito nestas Instruções de uso
- Transporte/manuseio incorreto do espécime de sangue
- Níveis elevados de IFN- γ circulante ou presença de anticorpos heterófilos
- Tempos de sangue validados excedidos desde a coleta do espécime de sangue até a incubação. Consulte as *Instruções de uso dos QFT-Plus Blood Collection Tubes* (1123668).

Características de desempenho

Estudos clínicos

Como não existe um teste padrão definitivo para confirmar ou excluir o diagnóstico de ILTB, não é possível avaliar na prática uma estimativa da sensibilidade e especificidade do QFT-Plus. A especificidade do QFT-Plus foi calculada de forma aproximada avaliando as taxas de falso-positivos em indivíduos com baixo risco (sem fatores de risco conhecidos) de infecção por tuberculose. A sensibilidade foi calculada de forma aproximada, avaliando os grupos de indivíduos em estudos com TB ativa confirmada por cultura. Além disso, o desempenho do ensaio foi avaliado para taxas positivas e negativas em uma população de indivíduos saudáveis com fatores de risco identificados para infecção por tuberculose (uma população de risco misto).

Especificidade

Foi realizado um estudo multicêntrico que avaliou a especificidade clínica do QFT-Plus, incluindo 733 indivíduos que foram considerados de baixo risco de infecção por *M. tuberculosis* ou sem fatores de risco de exposição à infecção ou doença. As informações demográficas e os fatores de risco de exposição à TB foram determinados usando uma pesquisa padronizada no momento do teste. O estudo foi realizado em quatro locais independentes, incluindo um nos Estados Unidos, dois no Japão e um na Austrália. O teste QFT-Plus foi comparado com o teste QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). Um resumo dos dados de desempenho de especificidade clínica, estratificados por local e região de estudo, é apresentado na Tabela 5. Os resultados do desempenho têm como base o número total de testes válidos. Não houve resultados indeterminados.

Tabela 5. Especificidade do QFT-Plus em uma população de baixo risco

Local	N	Positivo		Negativo		Indeterminado		Especificidade (IC de 95%)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Estados Unidos									
(N° 1) USA-4	212	2	4	210	208	0	0	99,06% (210/212) (96,63– 99,74)	98,11% (208/212) (95,25– 99,26)
Japão									
(N° 2) JPN-3	106	1	2	105	104	0	0	99,06% (105/106) (94,85– 99,83)	98,11% (104/106) (93,38– 99,48)
(N° 3) JPN-1	216	3	5	213	211	0	0	98,61% (213/216) (96,00– 99,53)	97,69% (211/216) (94,70– 99,01)
Total do Japão	322	4	7	318	315	0	0	98,76% (318/322) (96,85– 99,52)	97,83% (315/322) (95,6–98,9)
Austrália									
(N° 4) AU-3	199	8	9	191	190	0	0	95,98% (191/199) (92,27– 97,95)	95,48% (190/199) (91,63– 97,60)

A especificidade do QFT-Plus foi de 98,11% nos EUA, 97,83% no Japão e 95,48% na Austrália. A especificidade geral do QFT-Plus foi de 97,27% (713/733). A especificidade do QFT foi de 99,06% nos EUA, 98,76% no Japão e 95,98% na Austrália. A especificidade geral do QFT foi de 98,09% (719/733).

É apresentada uma discriminação dos resultados por tipo de tubo de antígeno TB e combinações dos mesmos para fornecer um exemplo dos resultados esperados em uma população de baixo risco (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados do estudo de especificidade do QFT-Plus por TB Antigen Tube

Interpretação com base no Antígeno TB - Nil	TB1	TB2	QFT-Plus (positivo por TB1 e/ou TB2)*	TB1 e TB2 positivos concordantes (análise alternativa) [†]
Positivo	10	18	20	8
Negativo	723	715	713	725
Indeterminado	0	0	0	0
Especificidade (IC de 95%)	–	–	97,3% (713/733) (95,8-98,2)	–
Taxa de negatividade (IC de 95%)	98,6% (723/733) (97,5–99,3)	97,5% (715/733) (96,2–98,4)	–	98,9% (725/733) (97,9-99,5)

* Interpretação com base em um valor de antígeno TB - Nil $\geq 0,35$ UI/ml em ambos (TB1 e TB2) ou um dos tubos TB para atender os critérios de interpretação para que o QFT-Plus (TB1 ou TB2) seja determinado como positivo.

[†] Análise alternativa fornecida apenas para fins informativos.

Nos indivíduos com baixo risco de infecção por TB, um total de 20/733 indivíduos acusaram um resultado positivo. Desses, apenas 8 indivíduos acusaram um valor $>0,35$ UI/ml em ambos os tubos TB1 e TB2. Foi realizada uma comparação entre os ensaios QFT e QFT-Plus na coorte do estudo de baixo risco, que mostrou uma concordância geral de 97,5% (715/733) e uma porcentagem de concordância negativa de 98,3% (707/719).

Sensibilidade

Embora não exista um teste padrão definitivo para ILTB, um substituto adequado é a cultura microbiológica de *M. tuberculosis*, uma vez que a infecção com TB é um precursor necessário da doença.

Foi realizado um estudo multicêntrico para avaliar a sensibilidade clínica do QFT-Plus, incluindo 434 indivíduos que apresentaram sinais e sintomas de *M. tuberculosis* ativa confirmada por cultura e/ou PCR e que não estavam em tratamento para TB ou com ≤ 14 dias de tratamento antes da coleta de sangue. O estudo foi realizado em sete locais independentes, incluindo três nos Estados Unidos, três no Japão e um na Austrália. O teste QFT-Plus foi comparado com o teste QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). Um resumo dos dados de desempenho de sensibilidade clínica, estratificados por local e país, é apresentado na Tabela 7. Os resultados do desempenho têm como base o número total de testes válidos. A frequência de resultados indeterminados para o QFT e o QFT-Plus foi de 2,3% (10/434) e 2,5% (11/434), respectivamente.

Tabela 7. Resumo do desempenho do estudo de sensibilidade clínica estratificado por local, país e geral

Local	N	Positivo		Negativo		Indeterminado		Sensibilidade (IC de 95%)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Estados Unidos									
(N° 1) USA-5	15	13	13	2	2	0	0	86,67% (13/15) (62,12– 96,26)	86,67% (13/15) (62,12– 96,26)
(N° 2) USA-1	33	29	29	4	4	0	0	87,88% (29/33) (72,67– 95,18)	87,88% (29/33) (72,67– 95,18)
(N° 3) USA-4	5	5	5	0	0	0	0	100,0% (5/5) (56,55– 100,0)	100,0% (5/5) (56,55– 100,0)
Total dos Estados Unidos	53	47	47	6	6	0	0	88,7% (47/53) (77,4–94,7)	88,7% (47/53) (77,4–94,7)
Japão									
(N° 4) JPN-2	76	72	67	1	3	3	6	98,63% (72/73) (92,64– 99,76)	95,71% (67/70) (88,14– 98,53)
(N° 5) JPN-3	99	97	98	2	1	0	0	97,98% (97/99) (92,93– 99,44)	98,99% (98/99) (94,50– 99,82)

A tabela continua na próxima página

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 7. Resumo do desempenho do estudo de sensibilidade clínica estratificado por local, país e geral (cont.)

Local	N	Positivo		Negativo		Indeterminado		Sensibilidade (IC de 95%)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(N° 6) JPN-1	177	159	157	12	15	6	5	92,98% (159/171) (88,14– 95,94)	91,28% (157/172) (86,11– 94,64)
Total do Japão	352	328	322	15	19	9	11	95,63% (328/343) (92,91– 97,33)	94,43% (322/341) (91,5–96,4)
Austrália									
(N° 7) AU-2	29	27	29	1	0	1	0	96,43% (27/28) (82,29– 99,37)	100,0% (29/29) (88,30– 100,0)

A análise na tabela acima não inclui resultados indeterminados.

A sensibilidade do QFT-Plus foi de 88,7% nos EUA, 94,43% no Japão e 100,0% na Austrália. A sensibilidade geral do QFT-Plus foi de 94,09% (398/423). A sensibilidade do QFT foi de 88,7% nos EUA, 95,63% no Japão e 96,43% na Austrália. A sensibilidade geral do QFT foi de 94,81% (402/424).

É apresentada uma discriminação dos resultados por tipo de tubo de antígeno TB e combinações dos tubos é apresentada para fornecer um exemplo dos resultados esperados em uma população com infecção por TB confirmada (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados do estudo de sensibilidade do QFT-Plus por tubo de antígeno TB

Interpretação com base no antígeno TB - Nil em UI/ml			QFT-Plus (positivo por TB1 e/ou TB2)
	TB1	TB2	
Positivo	388	397	398
Negativo	32	26	25
Indeterminado	14	11	11
Sensibilidade* (IC de 95%)	–	–	94% (398/423) (91,4-96,0)
Taxa de positividade* (IC de 95%)	92,4% (388/420) (89,4-94,6)	93,9% (397/423) (91,1-95,8)	–

* Excluindo valores indeterminados.

Foi realizada uma comparação entre os ensaios QFT e QFT-Plus na coorte de TB ativa confirmada por cultura (coortes de estudo de sensibilidade), que mostrou uma concordância geral de 95,9% e uma porcentagem de concordância positiva de 97,3% (391/402).

Tabela 9. Razões de verossimilhança do QFT-Plus

Local*	Sensibilidade	Especificidade	RV+	RV-
Austrália	100,00%	95,48%	22,11	0,00
Japão	94,43%	97,83%	43,44	0,06
Estados Unidos	88,68%	98,11%	47,00	0,12

* Total

Desempenho em indivíduos com fatores de risco identificados para uma infecção por MTB (indivíduos de risco misto)

Foi avaliada uma coorte de 601 indivíduos com fatores de risco mistos para infecção por TB (por ex., positivo para HIV, histórico de tratamento para TB ativa ou latente, exposição a um caso de TB ativa, status de HCW etc.) com os testes QFT e QFT-Plus. Os fatores de risco foram identificados usando uma pesquisa padronizada e os indivíduos não apresentavam sintomas associados à TB ativa na altura do recrutamento. Os dados demográficos e os fatores de risco são relatados na Tabela 10. Nessa população, 68/601 (11,3%) indivíduos acusaram um resultado positivo para o QFT-Plus, com uma porcentagem de concordância positiva (Positive Percent Agreement, PPA) e uma porcentagem de concordância negativa (Negative Percent Agreement, NPA) de 98,44% e 99,07%, respectivamente (Tabela 11). Nessa coorte de 68 indivíduos positivos para o QFT-Plus, um total de 62 indivíduos revelaram-se positivos para os tubos TB1 e TB2, 2 indivíduos revelaram-se positivo somente para o tubo TB1 e 4 indivíduos apenas para o tubo TB2. Nenhum resultado indeterminado (0/601) foi observado.

Tabela 10. Dados demográficos e fatores associados ao risco de infecção por TB em uma coorte mista

Total de indivíduos (601)		Número	Porcentagem
Sexo	Masculino	539	89,7%
	Feminino	62	10,3%
Idade (anos)	Intervalo	18-70	–
	Média	46,7	–
Vacinado com BCG	Sim	15	2,5%
	Não	586	97,5%
HIV positivo ou testado positivo para o vírus HTLV	Sim	12	2,0%
	Não	589	98%
Diagnosticado anteriormente com TB ativa	Sim	11	1,8%
	Não	590	98,2%
Teve um resultado positivo do teste cutâneo tuberculínico (TCT)/Teste de Mantoux para TB	Sim	47	7,8%
	Não	554	92,2%
Já foi tratado para TB ativa ou latente	Sim	35	5,8%
	Não	566	94,2%
Viveu, trabalhou ou foi voluntário (>1 mês) em um presídio ou prisão	Sim	373	62,1%
	Não	228	37,9%
Viveu trabalhou ou foi voluntário (>1 mês) em um abrigo para sem-tetos	Sim	525	87,4%
	Não	76	12,6%
Profissional de saúde	Sim	8	1,3%
	Não	593	98,7%
Contato próximo de alguém com suspeita de com TB ativa	Sim	9	1,5%
	Não	592	98,5%

Tabela 11. Resumo do desempenho do QFT-Plus vs. QFT em indivíduos com fatores de risco conhecidos para infecção por TB latente

		QFT		Total
		Positivo [+]	Negativo [-]	
QFT-Plus	Positivo [+]	63	5*	68
	Negativo [-]	1*	532	533
	Total	64	537	601

* Todas as 6 amostras discordantes apresentaram níveis de IFN- γ dos tubos de antígeno TB próximos ao nível limite do ensaio.

A porcentagem de concordância positiva (Positive Percent Agreement, PPA) e a porcentagem de concordância negativa (Negative Percent Agreement, NPA) entre os resultados do QFT e do QFT-Plus foram as seguintes:

- PPA: 98,44% (63/64), IC de 95% (91,67, 99,72)
- NPA: 99,07% (532/537), IC de 95% (97,84, 99,60)

A Tabela 12 abaixo ilustra o desempenho do QFT-Plus em comparação com o QFT em indivíduos de estudo vacinados com BCG.

Tabela 12. Desempenho do QFT-Plus em comparação com o teste QFT em indivíduos de estudo vacinados com BCG (dados combinados de indivíduos de estudo de sensibilidade, especificidade e ILTB)

		QFT		Total
		Positivo [+]	Negativo [-]	
QFT-Plus	Positivo [+]	66	5	71
	Negativo [-]	3	268	271
	Total	69	273	342*

* Dois indivíduos do estudo de sensibilidade foram excluídos da análise devido a resultados indeterminados

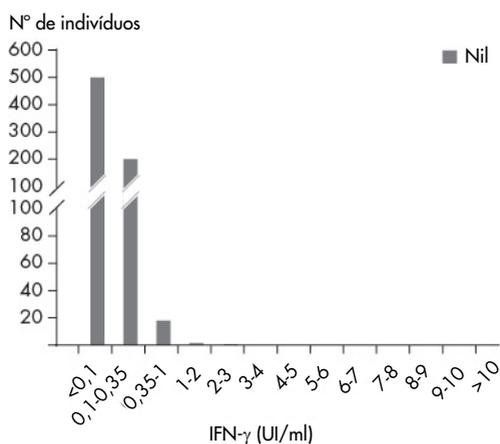
- PPA = 95,6% (66/69), IC de 95% (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2% (268/273), IC de 95% (95,79, 99,22)

Valores esperados

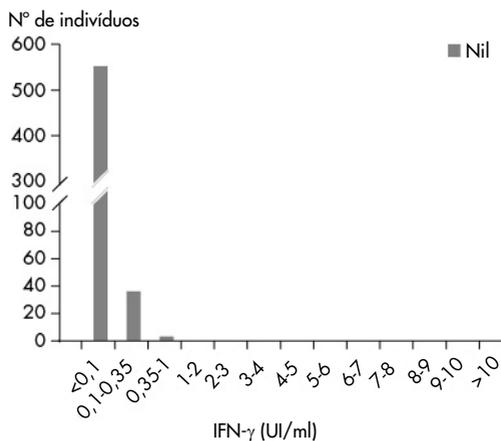
Distribuições de respostas observadas – estratificadas por risco

Observou-se uma variedade de respostas de IFN- γ aos tubos TB1, TB2 e de controle nos ensaios clínicos, sendo as mesmas estratificadas pelo risco de infecção por *M. tuberculosis* (Figuras 4 a 7). O grupo de risco misto é composto por indivíduos representativos de uma população de teste geral, incluindo indivíduos com e sem fatores de risco de exposição à TB, em que a presença de TB ativa é improvável (ou seja, ILTB).

A



B



C

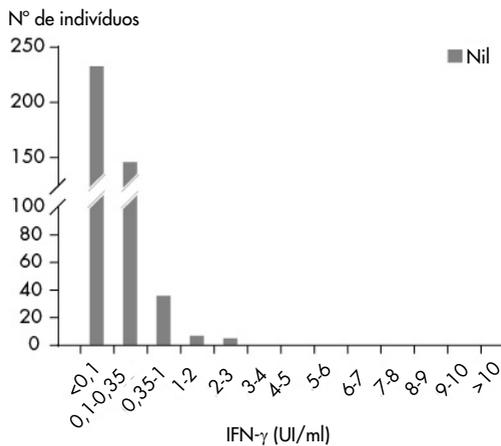
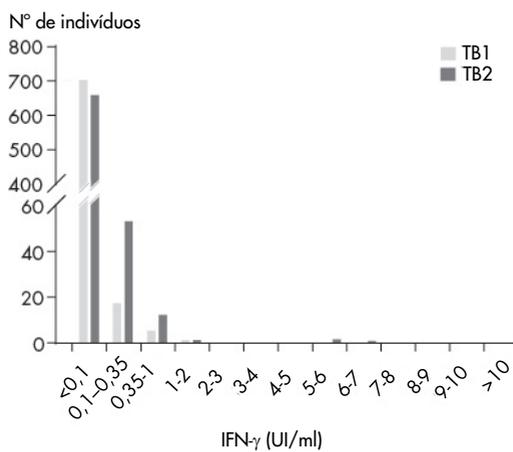
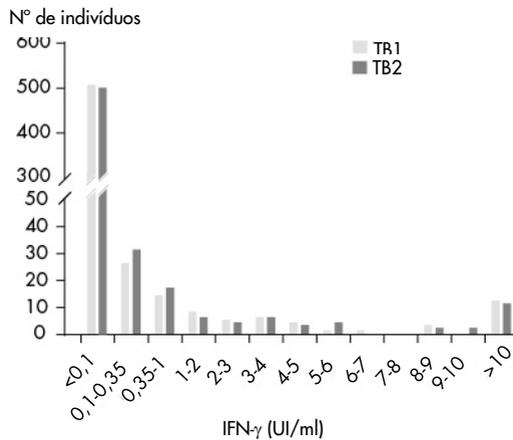


Figura 4. Distribuição de Nil. **A** Distribuição de valores de Nil em uma população de baixo risco (n = 744). **B** Distribuição de valores de Nil em uma população de risco misto (n = 601). **C** Distribuição de valores de Nil em uma população com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n = 416).

A



B



C

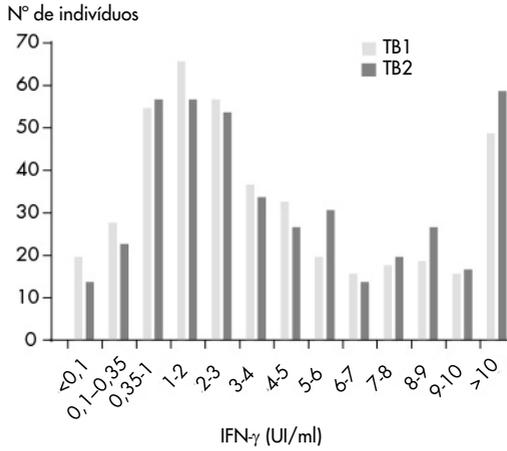
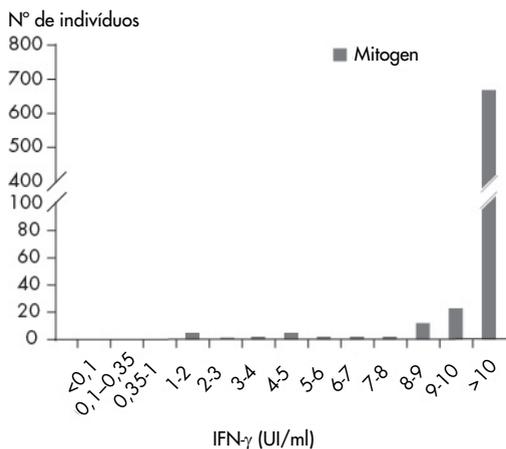
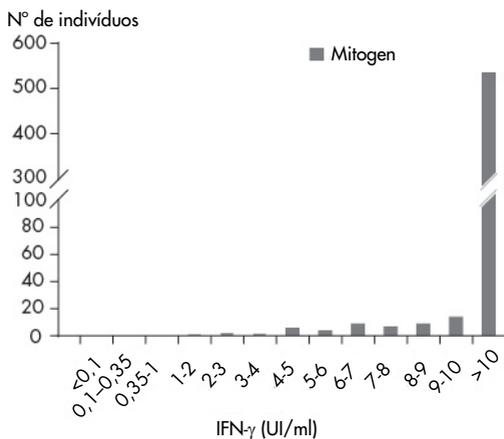


Figura 5. Distribuição de TB1 e TB2 (Nil subtraído). A Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em uma população de baixo risco (n = 744). B Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em uma população de risco misto (n = 601). C Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em uma população com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura.

A



B



C

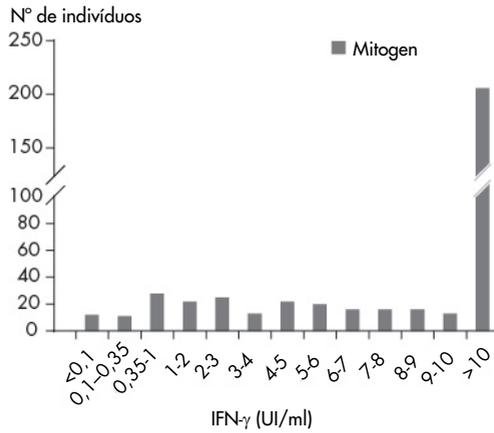


Figura 6. Distribuição de Mitogen (Nil subtraído). **A** Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em uma população de baixo risco (n = 744). **B** Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em uma população de risco misto (n = 601). **C** Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em uma população com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura.

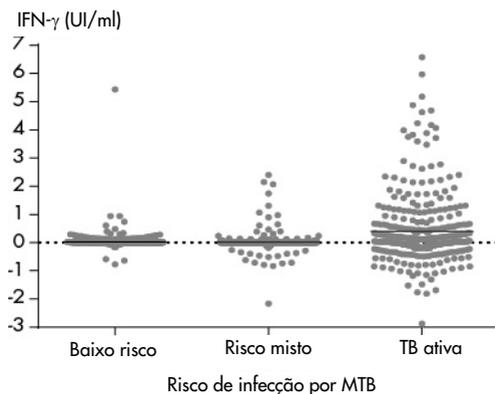


Figura 7. Diferença observada entre os valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído), estratificada por risco. Inclui dados da coorte de estudo de risco misto para mostrar diferenças entre as coortes de baixo risco, risco ativo e risco misto. Essa análise de dados incluiu uma coorte de risco misto com fatores de risco conhecidos. Portanto, da coorte de baixo risco, n = 733; da coorte de risco misto, n = 588; e da coorte de TB ativa, n = 357. A diferença quantitativa em UI/ml de cada indivíduo foi obtida subtraindo o valor de TB1 do valor de TB2.

Resumo de segurança e desempenho

O resumo de segurança e desempenho pode ser encontrado no site da EUDAMED.

Características do desempenho do ensaio

Desempenho analítico

Limite do ensaio

O limite do ensaio QFT-Plus foi determinado usando dados de 216 indivíduos sem fatores de risco identificados de exposição à TB, que haviam sido vacinados com BCG e considerados livres de infecção, e 118 indivíduos com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura. Os dados de sensibilidade e especificidade foram combinados e analisados pela análise da curva Característica de Operação do Receptor (Receiver Operator Characteristic, ROC). Os dados de sensibilidade e especificidade analisados utilizando a curva ROC demonstraram que o limite ideal do ELISA era de 0,35 UI/mL (consulte a Figura 8).

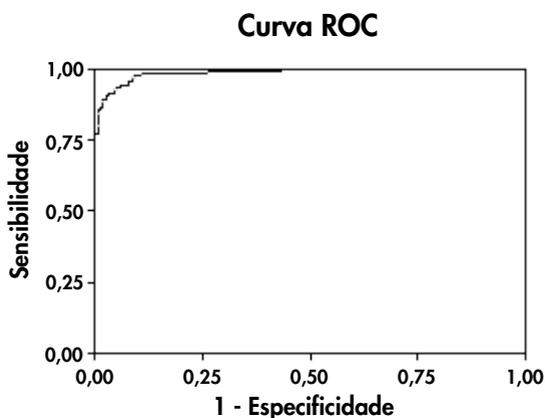


Figura 8. Curva ROC para as respostas de ESAT-6 e CFP-10.

Tabela 13. Valores de sensibilidade e especificidade para o ELISA a limites variados

Limite UI/ml IFN- γ	Sensibilidade (%)	IC de 95%	Especificidade (%)	IC de 95%	Sensibilidade + Especificidade
0,20	91,53	84,97% a 95,86%	96,31	92,87% a 98,40%	187,84
0,23	91,53	84,97% a 95,86%	96,77	93,47% a 98,69%	188,30
0,26	90,68	83,93% a 95,25%	96,77	93,47% a 98,69%	187,45
0,28	90,68	83,93% a 95,25%	97,24	94,08% a 98,98%	187,92
0,30	89,83	82,91% a 94,63%	97,24	94,08% a 98,98%	187,07
0,31	88,98	81,90% a 94,00%	97,24	94,08% a 98,98%	186,22
0,33	88,98	81,90% a 94,00%	97,70	94,71% a 99,25%	186,68
0,35	88,98	81,90% a 94,00%	98,16	95,35% a 99,50%	187,14
0,39	88,14	80,90% a 93,36%	98,16	95,35% a 99,50%	186,3
0,42	87,29	79,90% a 92,71%	98,16	95,35% a 99,50%	185,45
0,43	86,44	78,92% a 92,05%	98,16	95,35% a 99,50%	184,6
0,45	86,44	78,92% a 92,05%	98,62	96,01% a 99,71%	185,06

A tabela continua na próxima página

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 13. Valores de sensibilidade e especificidade para o ELISA a limites variados

Limite UI/ml IFN- γ	Sensibilidade (%)	IC de 95%	Especificidade (%)	IC de 95%	Sensibilidade + Especificidade
0,47	85,59	77,94% ^a 91,38%	99,08	96,71% ^a 99,89%	184,67
0,48	84,75	76,97% ^a 90,70%	99,08	96,71% ^a 99,89%	183,83
0,50	83,90	76,00% ^a 90,02%	99,08	96,71% ^a 99,89%	182,98

Linearidade

Demonstrou-se que o QFT-Plus ELISA é linear colocando aleatoriamente cinco réplicas de 11 pools de plasma de concentrações conhecidas de IFN- γ na placa de ELISA. A linha de regressão linear tem uma inclinação de $1,002 \pm 0,011$ e um coeficiente de correlação de 0,99 (Figura 9).

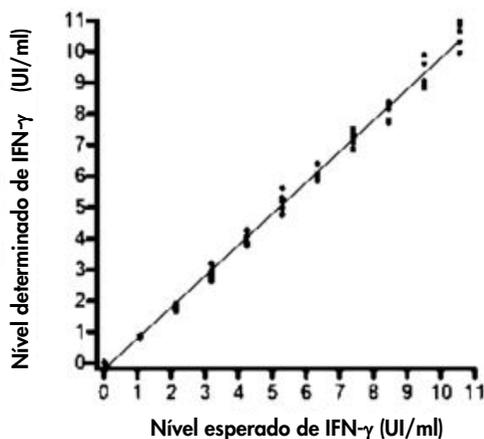


Figura 9. Ilustração da análise de regressão do estudo de linearidade – Média de pool elevado = $-0,24 + 0,9964 \cdot \text{Esperado}$.

Reprodutibilidade

Foi realizado um estudo de reprodutibilidade multicêntrico para avaliar o desempenho do QFT-Plus em diferentes locais de estudo com diversos operadores. Trata-se de um estudo prospectivo realizado em três locais de teste externos e um local de coleta. O estudo teve a participação de um total de 32 indivíduos positivos e 34 negativos (determinados pelo teste QFT). Os indivíduos do estudo eram profissionais de saúde nos Estados Unidos. Os indivíduos do estudo representavam grupos com risco misto de exposição à TB devido à sua ocupação ou por serem profissionais de saúde estrangeiros provenientes de um local com uma taxa de TB acima de 50/100.000.

Foram obtidos três tubos de coleta de sangue de heparina de lítio de cada um dos indivíduos no local de coleta. Os tubos de coleta de sangue de heparina de lítio foram, então, transferidos para cada um dos três locais de teste, onde foram aliqüotados em dois conjuntos de QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen e Nil) e, em seguida, testados em conformidade com o procedimento do ensaio QFT-Plus. Em cada um dos locais, pelo menos dois operadores executaram de forma independente os dois testes por indivíduo do estudo. Foram ocultados de cada operador os resultados obtidos pelo outro operador e o resultado do teste QFT do indivíduo do estudo.

Seis resultados foram gerados nos três locais de teste para cada um dos 66 indivíduos do estudo, resultando em um total de 396 pontos de dados. Um resumo dos resultados de reprodutibilidade é fornecido na Tabela 14.

Tabela 14. Resumo dos resultados do estudo de reprodutibilidade – percentagem de concordância dos resultados qualitativos entre operadores dentro do local; N = 66 amostras de pacientes

Local 1 – 2 operadores	Local 2 – 2 operadores	Local 3 – 3 operadores
64/66 = 96,97%	64/66 = 96,97%	59/66 = 89,39%
Concordância dos resultados qualitativos do conjunto de tubos 1 e conjunto de tubos 2	Concordância dos resultados qualitativos do conjunto de tubos 1 e conjunto de tubos 2	Concordância dos resultados qualitativos do conjunto de tubos 1 e conjunto de tubos 2

A porcentagem de concordância qualitativa em todos os locais do estudo é de 94,7% (375/396). Nesse cálculo, o número total de resultados de testes em concordância (375) inclui aqueles casos em que há concordância de todos os 6 resultados, concordância de 5 de 6 resultados, concordância de 4 de 6 resultados e concordância de 3 de 6 resultados, combinados.

Repetibilidade interlotes

Foi realizado um estudo para determinar a variabilidade interlotes dos QFT-Plus Blood Collection Tubes quando comparados aos tubos QFT. Foi testado um total de 30 indivíduos (15 com resultado confirmado de TB positivo e 15 com resultado confirmado de TB negativo, determinados pelo teste QFT). Neste estudo, foram incluídos três lotes separados de cada um dos QFT-Plus TB1, TB2 e QFT TB Blood Collection Tubes. Foram testadas três réplicas por doador e por lote de tubo de coleta de sangue. Os tubos Nil e Mitogen foram testados com uma réplica cada.

O sangue de cada indivíduo foi coletado em tubos de coleta de sangue de heparina de lítio e, em seguida, 1 ml do sangue foi transferido para cada um dos QFT-Plus e QFT Blood Collection Tubes, onde foi testado em conformidade com os procedimentos do ensaio. Para cada grupo de amostras positivas ou negativas, a variância total dos resultados do tubo QFT-Plus não deve ter sido significativamente maior que a variância total dos resultados do tubo QFT. Isso foi determinado a partir do valor p dado pelo teste de homogeneidade das variâncias (HOV) de Levene. Se o valor p não era significativo ($p > 0,05$) e/ou a variação dos tubos para TB QFT-Plus era menor que a do tubo para TB QFT, significa que havia variância entre os tubos para TB QFT-Plus e QFT.

Tabela 15. Comparação das variâncias entre os tubos de coleta de sangue para TB QFT-Plus e QFT usando o teste HOV de Levene

Tipo de amostra	Diferença	Efeito	Dependente	Valor p	Significativo
Positivo	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Residual	0,0378	Sim
Positivo	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Residual	0,0540	Não
Negativo	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Residual	0,1025	Não
Negativo	TB2 vs. QFT	Sub_Type	Residual	0,6344	Não

A variação entre os QFT-Plus e QFT TB Blood Collection Tubes não foi significativa, com exceção do tubo QFT-Plus TB2 quando testado com indivíduos positivos. Quando o desvio padrão estimado foi analisado, a variação observada no tubo QFT-Plus TB2 foi menor (0,06089) que no tubo para TB QFT (0,07641), como é mostrado na Tabela 16. Portanto, a variância dos tubos de coleta de sangue QFT-Plus TB1 e TB2 não foi maior que a do QFT TB Blood Collection Tube.

Tabela 16. Desvio padrão para residual e intervalo de confiança de 95% para indivíduos positivos

Tipo de amostra	Subtipo	Estimativa do desvio padrão	95% LCL	95% UCL
Positivo	QFT	0,07641	0,06826	0,08680
Positivo	TB1	0,06275	0,05605	0,07127
Positivo	TB2	0,06089	0,05439	0,06917

Repetibilidade intralote

Foi realizado um estudo para determinar a reprodutibilidade intralote dos QFT-Plus Blood Collection Tubes comparando a concentração de IFN- γ a partir de réplicas de QFT-Plus TB Blood Collection Tubes de sangue.

Foram executadas seis alíquotas de uma amostra de sangue dos mesmos indivíduos com infecção por TB confirmada em 6 tubos de coleta de sangue replicados de um lote de cada um dos tubos QFT-Plus (TB1 e TB2). Esse teste foi realizado em 13 indivíduos. O %CV foi calculado para cada doador e para todos os doadores para gerar uma média de %CV, como é mostrado na Tabela 17.

Tabela 17. %CV para média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo em cada tubo de coleta para TB QFT-Plus em indivíduos com TB positiva

Tubo do QFT-Plus	Tamanho da amostra	Média (%CV)	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
TB1	13	13,31	6,88	4,17	12,87	29,56
TB2	13	13,04	7,48	4,86	10,75	29,44

Os resultados demonstraram que a média do %CV para TB1 e TB2 foi ~13%, atendendo aos critérios de aceitação $\leq 30\%$ e demonstrando repetibilidade intralote.

Limite de branco (Limit of Blank, LoB)

O Limite de branco (LoB) foi avaliado para o ensaio QFT-Plus. Foram testadas duas réplicas de cada uma das 14 amostras individuais de plasma humano normal (como os brancos) com dois lotes do QFT-Plus ELISA por três operadores ou três dias de teste, um operador por dia de teste para um total de 84 réplicas para cada lote de kit ELISA.

Os valores de LoB (UI/mL) para os dois lotes de kit ELISA foram calculados separadamente, como é mostrado na Tabela 18.

Tabela 18. Valores de LoB (UI/mL) para os dois lotes de QFT-Plus ELISA Kit

QFT-Plus ELISA Kit	LoB estimado (UI/ml)
Kit 1	0,030
Kit 2	0,040

O maior valor de LoB, 0,040 UI/mL, nos dois lotes de QFT-Plus ELISA Kit, foi reportado como o valor de LoB final.

Limite de detecção (Limit of Detection, LoD)

O Limite de detecção (LoD) foi avaliado para o ensaio QFT-Plus. Um pool de plasma humano negativo para TB foi gerado combinando 14 amostras de plasma diferentes. Cada um dos três operadores preparou um estoque de padrão de referência de IFN- γ a 1,0 UI/mL diluído em tampão. Foi feita uma série de diluições de oito concentrações. O estudo foi realizado por três dias, com três operadores usando dois lotes de QFT-Plus ELISA Kit. Para cada dia de teste, foram testadas cinco réplicas de cada concentração dentro de cada conjunto da série de diluições para um total de 45 réplicas para cada diluição de concentração de IFN- γ para cada lote de QFT-Plus ELISA Kit.

Os valores de LoD para os dois lotes de QFT-Plus ELISA Kit foram calculados separadamente, como é mostrado na Tabela 19.

Tabela 19. Valores de LoD (UI/mL) para os dois lotes de QFT-Plus ELISA Kit

QFT-Plus ELISA Kit	Probabilidade	Concentração estimada (UI/ml)	Limite de confiança de 95% inferior para estimativa	Limite de confiança de 95% superior para estimativa
Kit 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Kit2	0,95	0,065	0,060	0,073

O maior valor de LoD calculado nos dois lotes de QFT-Plus ELISA Kit, 0,065 UI/mL, foi reportado como o valor de LoD final.

Substâncias interferentes

Foi realizado um estudo para determinar os efeitos das possíveis substâncias interferentes no desempenho da detecção de IFN- γ pelo QFT-Plus ELISA. As substâncias interferentes incluídas nesse teste foram: triglicerídeos (total), hemoglobina, proteína (total soro), bilirrubina (conjugada), bilirrubina (não conjugada), sulfato de abacavir, ciclosporina e prednisolona. Foram preparados cinco pools de plasma com concentrações conhecidas de IFN- γ usando diferentes concentrações interferentes. O nível de IFN- γ do pool base foi preparado previamente com uma quantidade predeterminada de IFN- γ presente (aproximadamente 0,21, 0,45 e 1,4 UI/mL). Em seguida, esse pool foi usado para preparar os pools interferentes. As concentrações interferentes testadas foram de 0 mg/dL, 5 mg/dL, 10 mg/dL, 15 mg/dL e 20 mg/dL. As concentrações interferentes alvo foram baseadas em intervalos de referência, valores patológicos e limites terapêuticos e tóxicos ou conforme recomendação do vendedor ou níveis clínicos gerais. Foram testadas seis réplicas para cada nível de concentração de amostra interferente.

Para cada concentração de amostra, foi realizado um teste t de duas amostras, comparando a diferença na média log₁₀ (UI/mL) do nível de interferente primário comparado ao controle (ou seja, nível livre de interferentes), como é mostrado nas Tabelas 20 e 21. A diferença estimada na resposta média, junto com os correspondentes limites de confiança de 95% bilaterais e o valor p também foram estimados.

Tabela 20. Log10 UI/mL: Tabela de resumo do teste t para as diferenças de médias entre o controle e o nível de interferente primário para cada nível de concentração de interferente e de IFN- γ

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Variâncias	Diferença média	IC de 95% inferior	IC de 95% superior	Valor p	Aprovado
Triglicédeos	Alto	1,4	Igual	0,019	-0,040	0,077	0,491	Sim
		0,45	Igual	0,004	-0,022	0,030	0,732	Sim
		0,21	Igual	0,006	-0,035	0,047	0,759	Sim
Hemoglobina	Alto	1,4	Igual	-0,005	-0,42	0,032	0,784	Sim
		0,45	Igual	-0,000	-0,023	0,023	0,981	Sim
		0,21	Igual	0,000	-0,034	0,035	0,980	Sim
Proteína	Alto	1,4	Igual	0,004	-0,034	0,042	0,836	Sim
		0,45	Igual	0,001	-0,38	0,040	0,962	Sim
		0,21	Igual	-0,008	-0,076	0,060	0,809	Sim
Bilirrubina conjugada	Alto	1,4	Igual	-0,011	-0,057	0,034	0,589	Sim
		0,45	Igual	-0,002	-0,058	0,053	0,923	Sim
		0,21	Igual	-0,014	0,074	0,046	0,625	Sim
Bilirrubina não conjugada	Alto	1,4	Igual	-0,008	-0,041	0,026	0,614	Sim
		0,45	Igual	-0,000	-0,042	0,041	0,982	Sim
		0,21	Igual	-0,000	-0,048	0,048	0,989	Sim
Abacavir	Alto	1,4	Igual	0,008	-0,025	0,041	0,601	Sim
		0,45	Igual	0,012	-0,019	0,044	0,412	Sim
		0,21	Igual	-0,006	-0,052	0,040	0,770	Sim

A tabela continua na próxima página

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 20. Log₁₀ UI/mL: Tabela de resumo do teste t para as diferenças de médias entre o controle e o nível de interferente primário para cada nível de concentração de interferente e de IFN- γ

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Variâncias	Diferença média	IC de 95% inferior	IC de 95% superior	Valor p	Aprovado
Ciclosporina	Alto	1,4	Igual	0,014	-0,020	0,047	0,383	Sim
		0,45	Igual	0,005	-0,035	0,045	0,773	Sim
		0,21	Igual	0,024	-0,008	0,056	0,131	Sim
Prednisolona	Alto	1,4	Igual	0,017	-0,017	0,050	0,293	Sim
		0,45	Igual	0,000	-0,036	0,036	0,979	Sim
		0,21	Igual	0,015	-0,035	0,065	0,524	Sim

Tabela 21. Log10 UI/mL: Tabela de resumo do teste t para as diferenças de médias entre o controle e o nível de interferente alto para cada nível de concentração de interferente e de IFN- γ

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Variâncias	Diferença média	IC de 95% inferior	IC de 95% superior	Valor p	Aprovado
Triglicerídeos	Alto	1,4	Igual	0,053	-0,004	0,110	0,063	Sim
		0,45	Igual	0,039	-0,021	0,058	<0,001	Sim
		0,21	Igual	0,034	-0,002	0,071	0,061	Sim
Hemoglobina	Alto	1,4	Igual	-0,001	-0,042	0,040	0,967	Sim
		0,45	Igual	0,016	-0,007	0,040	0,152	Sim
		0,21	Igual	0,014	-0,030	0,059	0,489	Sim
Proteína	Alto	1,4	Igual	-0,030	-0,071	0,011	0,136	Sim
		0,45	Igual	0,000	-0,046	0,046	0,992	Sim
		0,21	Igual	-0,045	-0,103	0,012	0,109	Sim
Bilirrubina conjugada	Alto	1,4	Igual	0,001	-0,046	0,048	0,961	Sim
		0,45	Igual	0,012	-0,043	0,067	0,639	Sim
		0,21	Igual	0,015	-0,044	0,074	0,586	Sim
Bilirrubina não conjugada	Alto	1,4	Igual	0,015	-0,011	0,042	0,231	Sim
		0,45	Igual	0,015	-0,023	0,052	0,411	Sim
		0,21	Igual	0,012	-0,033	0,057	0,566	Sim
Abacavir	Alto	1,4	Igual	0,013	-0,015	0,040	0,322	Sim
		0,45	Igual	0,015	-0,014	0,044	0,283	Sim
		0,21	Igual	0,008	-0,034	0,050	0,677	Sim

A tabela continua na próxima página

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 21. Log10 UI/mL: Tabela de resumo do teste t para as diferenças de médias entre o controle e o nível de interferente alto para cada nível de concentração de interferente e de IFN- γ

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Variâncias	Diferença média	IC de 95% inferior	IC de 95% superior	Valor p	Aprovado
Ciclosporina	Alto	1,4	Igual	0,002	-0,019	0,024	0,816	Sim
		0,45	Igual	0,007	-0,030	0,043	0,682	Sim
		0,21	Igual	0,015	-0,007	0,038	0,155	Sim
Prednisolona	Alto	1,4	Igual	0,007	-0,016	0,030	0,518	Sim
		0,45	Igual	-0,001	-0,034	0,033	0,964	Sim
		0,21	Igual	0,021	-0,025	0,068	0,334	Sim

Os resultados não mostraram diferenças relevantes entre o nível de interferência primário e o controle (nível livre de interferentes) e para o nível de interferência alto, exceto para o nível de concentração de triglicerídeos de 0,45 UI/mL. Determinou-se que a diferença média estava dentro do intervalo de desvio padrão de +/-2. Isso demonstra que a diferença está dentro da variabilidade prevista do ensaio e que o triglicerídeo não tem um efeito interferente no QFT-Plus ELISA.

Descarte

Observe as diretrizes relevantes de manuseio de sangue. Descarte amostras e materiais em contato com sangue ou produtos sanguíneos de acordo com os regulamentos federais, estaduais e locais.

Referências

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 645.
3. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 84.
4. Rothel, J.S., Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: Is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 3, 981.
5. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, 681.
6. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. *J. Immunol.* 166, 439.
7. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. *PLoS Pathol.* 3, 1240.
8. Barcellini, L. et al. (2016) First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur. Respir. J.* 47, 1587.
9. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J. Immunol.* 187, 2222.

10. Rozot, V. et al. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur. J. Immunol. 43, 1568.
11. Nikolava, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 75, 277.
12. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. 69, 533.
13. Ongaya, A. et al. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis 93, S60.
14. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 185, 206.
15. Mazurek, G.H., et al.; IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection – United States, 2010. MMWR Recomm. Rep. 59, 1.
16. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: tuberculosis preventive treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Guia de solução de problemas

Este guia de solução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico no site www.qiagen.com/Support (para obter as informações de contato, visite www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

Solução de problemas do ELISA

Desenvolvimento inespecífico de cores

- | | |
|--|--|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais de seis ciclos de lavagem, a depender da lavadora sendo usada. É necessário usar um tempo de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre os ciclos. |
| b) Contaminação cruzada de poços de ELISA | Tome cuidado ao pipetar e misturar amostras para minimizar os riscos. |
| c) Kit/componentes vencidos | Certifique-se de que o kit seja usado antes do prazo de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado 100x concentrado sejam usados dentro de três meses a partir da data de reconstituição. |
| d) A Solução de substrato enzimático está contaminada | Descarte o substrato se apresentar coloração azul. Certifique-se de que sejam usados reservatórios limpos de reagente. |
| e) Mistura do plasma nos QFT-Plus Blood Collection Tubes antes da coleta | Após a centrifugação, evite pipetar para cima e para baixo ou misturar o plasma por qualquer meio antes da coleta. Sempre tenha cuidado para não perturbar o material na superfície do gel. |

Comentários e sugestões

Leituras de baixa densidade óptica das soluções padrão

- | | |
|---|---|
| a) Erro de diluição da solução padrão | Certifique-se de que as diluições da solução padrão do kit sejam preparadas corretamente, de acordo com estas Instruções de uso. |
| b) Erro de pipetagem | Certifique-se de que as pipetas sejam calibradas e usadas de acordo com as instruções do fabricante. |
| c) Temperatura de incubação muito baixa | A incubação do ELISA deve ser realizada em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). |
| d) Tempo de incubação muito curto | A incubação da placa com o conjugado, com as soluções padrão e com as amostras deve durar 120 ± 5 minutos. A Solução de substrato enzimático deve ser incubada na placa durante 30 minutos. |
| e) Filtro incorreto de leitor de placas usado | A placa deve ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm. |
| f) Os reagentes estão muito frios | Todos os reagentes, com exceção do Conjugado 100x concentrado, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isso leva aproximadamente uma hora. |
| g) O kit/componentes venceram | Certifique-se de que o kit seja usado antes do prazo de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado 100x concentrado sejam usados dentro de 3 meses a partir da data de reconstituição. |

Fundo alto

- | | |
|--------------------------------|--|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 μl /poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais de seis ciclos de lavagem. É necessário usar um tempo de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre os ciclos. |
|--------------------------------|--|

Comentários e sugestões

- | | |
|---|---|
| b) Temperatura de incubação muito alta | A incubação do ELISA deve ser realizada em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). |
| c) Kit/componentes vencidos | Certifique-se de que o kit seja usado dentro do prazo de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado 100x concentrado sejam usados dentro de três meses a partir da data de reconstituição. |
| d) A Solução de substrato enzimático está contaminada | Descarte o substrato se apresentar coloração azul. Certifique-se de que sejam usados reservatórios limpos de reagente. |

Curva-padrão não linear e variabilidade duplicada

- | | |
|---|--|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 μl /poço de tampão de lavagem. Podem ser necessários mais de seis ciclos de lavagem. É necessário usar um tempo de imersão de, pelo menos, 5 segundos entre os ciclos. |
| b) Erro de diluição da solução padrão | Certifique-se de que as diluições da solução padrão sejam preparadas corretamente, de acordo com estas Instruções de uso. |
| c) Mistura mal efetuada | Misture bem os reagentes por inversão ou vórtice suave antes da adição à placa. |
| d) Técnica inconsistente ou interrupção da pipetagem durante a preparação do ensaio | A adição de amostra e solução padrão deve ser realizada de maneira contínua. Todos os reagentes devem ser preparados antes do início do ensaio. |

Símbolos

Os seguintes símbolos são exibidos nas instruções de uso ou na embalagem e no rótulo:

Símbolo

Definição do símbolo



<N>

Contém reagentes suficientes para <N> reações



Data de validade



Este produto atende aos requisitos do Regulamento Europeu 2017/746 para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

EC

REP

Representante autorizado na Comunidade Europeia/União Europeia

IVD

Dispositivo médico de diagnóstico in vitro

REF

Número de referência

LOT

Número de lote

MAT

Número do material (isto é, etiquetagem do componente)

COMP

Componentes

CONT

Contém

NUM

Número

GTIN

Número Global de Item Comercial (Global Trade Item Number)

Rn

R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão



Limites de temperatura

Símbolo

Definição do símbolo



Fabricante



Consultar as instruções de uso



Proteger da luz



Aviso/cuidado ou Cuidado, consultar a documentação fornecida

An in vitro diagnostic test using a peptide cocktail simulating ESAT-6 and CFP-10 proteins to stimulate cells in heparinized whole blood.

Um teste de diagnóstico in vitro que usa um coquetel de peptídeos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10 para estimular células no sangue total heparinizado



Contém material biológico de origem animal



Contém material biológico de origem humana



Identificador único do dispositivo

Símbolo

Definição do símbolo

tartrazine

Contém tartrazina

sulfuric acid

Contém ácido sulfúrico

Anexo A: Informações técnicas

Resultados indeterminados

Os resultados indeterminados são pouco comuns e podem estar relacionados ao estado imunológico do indivíduo sendo testado (5), mas também podem estar relacionado a vários fatores técnicos (por ex., manuseio/armazenamento inadequado dos tubos de coleta de sangue, lavagem incompleta da placa de ELISA), caso as instruções de uso anteriormente descritas não sejam seguidas.

Se suspeitar de problemas técnicos no armazenamento de reagente, na coleta de sangue ou no manuseio de amostras de sangue, repita todo o teste QFT-Plus com novos espécimes de sangue. É possível repetir o teste ELISA de plasmas estimulados se houver suspeita de lavagem inadequada ou de qualquer outro desvio de procedimento com o teste ELISA. Os médicos podem optar por coletar um novo espécime ou realizar outros procedimentos, conforme apropriado.

Amostras de plasma coaguladas

Caso ocorram coágulos de fibrina com o armazenamento a longo prazo de amostras de plasma, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

Amostras de plasma lipêmico

Tenha o devido cuidado ao pipetar amostras lipêmicas, tendo em vista que depósitos de gordura podem bloquear as ponteiros de pipeta.

Anexo B: Procedimento de teste ELISA abreviado

1. Coloque os componentes do ELISA, com exceção do Conjugado 100x concentrado, em temperatura ambiente por, pelo menos, 60 minutos.



2. Reconstitua a solução padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou deionizada. Prepare quatro (4) diluições de solução padrão.



3. Reconstitua o Conjugado 100x concentrado liofilizado com água deionizada ou destilada.

4. Prepare o conjugado na concentração de trabalho no Diluente verde e adicione 50 µl a todos os poços.



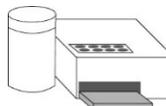
5. Adicione 50 µl de amostras de plasma de teste e 50 µl de soluções padrão aos poços apropriados. Misture com o agitador.



6. Incube em temperatura ambiente por 120 minutos.



7. Lave os poços, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem.



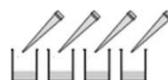
8. Adicione 100 μ l de Solução de substrato enzimático aos poços. Misture com o agitador.



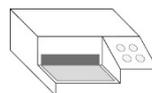
9. Incube em temperatura ambiente por 30 minutos.



10. Adicione 50 μ l de Solução de parada enzimática a todos os poços. Misture com o agitador.



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



12. Analise os resultados.



Informações sobre pedidos

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit	Kit ELISA de 2 placas	622120
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	Kit ELISA de 20 placas	622822
Related products		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen, 50 de cada)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen, 25 de cada)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen, 1 pacote de cada), pacote de 10	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen, 50 de cada)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen, 50 de cada)	623423
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Single Patient Pack	40 tubos (Nil, TB1, TB2 e Mitogen, 1 pacote de cada), pacote de 10	623222

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte as Instruções de uso do kit QIAGEN correspondente. As Instruções de uso do kit QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à assistência técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Data	Alterações
R2, junho de 2021	Inclusão de informações sobre o Pacote para um único paciente Revisão das Tabelas 10 e 11 para distinguir os dados de QFT-GIT vs. QFT-Plus Atualização da seção Descrição e princípio para adicionar informações sobre a população de teste e a faixa de medição Adição da Tabela 9 para incluir dados sobre a razão de verossimilhança do QFT-Plus
R3, outubro de 2021	Reversão do número de referência para os números de referência originais Adição da declaração de uso único para as Tiras de microplacas no conteúdo do kit.
R4, março de 2023	Arquivos de formato

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

Contrato de licença limitada para o QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit

O uso deste produto implica a aceitação, por parte de qualquer comprador ou usuário do produto, dos seguintes termos:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com estas Instruções de uso e recorrendo ao uso exclusivo de componentes contidos no painel. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incorporar os componentes deste painel a quaisquer componentes não incluídos nele, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, nestas Instruções de uso e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infrinjam os direitos de terceiros.
2. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou o seu uso não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este painel e seus componentes estão licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN renuncia especificamente a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, com exceção das expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do painel concordam em não realizar nem permitir que outra pessoa realize qualquer etapa que possa levar a ou facilitar qualquer um dos atos proibidos acima. A QIAGEN poderá fazer cumprir as proibições deste Contrato de Licença Limitada em qualquer Tribunal e recuperará todos os seus custos de investigação e de Tribunal, incluindo honorários de advogados, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Contrato de Licença Limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao painel e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (Grupo QIAGEN) Proclin®, Os nomes registrados, as marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

03/2023 L1123669 1123669PTBR © 2023 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Assistência Técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com