

Bula do QuantiFERON Monitor[®] (QFM[®]) ELISA

 2 x 96

As respostas de medição de teste de sangue total IFN- γ
a estimulantes imunitários inatos e adaptativos

Versão 1

IVD Para utilização em diagnóstico *in vitro*



REF 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, EUA

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, ALEMANHA

1079024PT Rev. 03

 www.QuantiFERON.com



Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação do teste	4
Princípios do ensaio	5
Tempo necessário para execução do ensaio	6
Componentes e armazenamento	6
Materiais necessários mas não fornecidos	8
Armazenamento e manuseamento	8
Advertências e precauções	10
Advertências	10
Precauções	11
Colheita e manuseamento de amostras	13
Indicações de utilização	17
Cálculos e interpretação de testes	24
Geração de curva padrão	24
Controlo de qualidade do teste	25
Interpretação de resultados	25
Limitações	27
Características de desempenho	27
Estudos clínicos	27
Características de desempenho dos ensaios	32
Informações técnicas	33
Amostras de plasma coaguladas	33
Guia de resolução de problemas	34
Bibliografia	37
Símbolos	38
Informações de contacto	38
Procedimento abreviado do teste	39

Utilização prevista

O ensaio QuantiFERON Monitor (QFM) é um teste de diagnóstico *in vitro* destinado à detecção de função imunitária mediada por células através da medição do interferão-gama (IFN- γ) em plasma mediante ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) após a incubação de sangue total heparinizado com estimulantes de resposta imunitária inata e adaptativa.

O ensaio é utilizado na detecção de resposta imunitária mediada por células na população de transplante de órgãos sólidos imunossuprimida.

O QFM destina-se a utilização conjunta com a avaliação de riscos e outras avaliações clínicas e de diagnóstico.

Resumo e explicação do teste

A imunodeficiência é caracterizada por uma capacidade reduzida para proceder a uma resposta imunitária eficaz. Esta resposta comprometida ou ausente pode ser resultado de uma imunodeficiência primária ou adquirida (secundária) (1).

As imunodeficiências primárias são geneticamente hereditárias e são caracterizadas por deficiências de componentes distintos do sistema imunitário inato ou adaptativo (1). Todavia, a maioria das imunodeficiências são adquiridas (secundárias) e podem ser induzidas por agentes patogénicos, fármacos (como terapia imunossupressora após transplante de órgão), doença (tal como cancro, por ex., leucemia e linfoma) ou por contaminantes ambientais (1).

A base molecular da imunodeficiência é variada; contudo, a imunidade mediada por células desempenha um papel fundamental na indução de muitas das manifestações clínicas observadas. Actualmente, o diagnóstico e gestão de síndromes de imunodeficiência depende do agente responsável (2, 3).

Por exemplo, uma gestão *ad hoc* é o padrão na monitorização do estado de imunodeficiência celular dos indivíduos submetidos a transplante de órgãos sólidos (SOT) que estejam a tomar fármacos para suprimir o seu sistema imunitário. O estado da resposta imunitária do indivíduo é normalmente medido pela monitorização dos níveis farmacológicos e da avaliação clínica/patológica da função de enxerto (2, 3).

Uma série de testes de função de linfócitos T mede a imunidade mediada por células a mitógenos como a fitohemaglutinina (PHA), mitógeno de fitolaca e concanavalina A (ConA); contudo, estes testes apenas medem a capacidade funcional dos linfócitos T, que são um subconjunto das células envolvidas na imunidade mediada por células. Vem tornando-se cada vez mais evidente que

os mecanismos imunitários inatos contribuem muito para a defesa do hospedeiro, seja através de actuação solitária ou aumentando as respostas específicas dos linfócitos T. Por conseguinte, a conjugação de respostas funcionais de células de imunidade inata (células exterminadoras naturais [NK]) e adaptativa (linfócitos T) forma uma análise abrangente da imunidade mediada por células (2, 3).

O QFM é um teste de diagnóstico *in vitro* que utiliza uma combinação de estimulantes (sob a forma de uma esfera LyoSphere™) que estimulam especificamente tipos diferentes de células envolvidas no sistema imunitário inato e adaptativo. O estado imunitário funcional de um indivíduo é avaliado através da medição da resposta à estimulação do sistema imunitário inato e adaptativo com agonistas de receptores de tipo Toll (TLR) e de receptores de linfócitos T (TCR), respectivamente. A detecção do interferão-gama (IFN- γ) pelo ELISA fornece uma medição qualitativa e quantitativa da função imunitária mediada por células.

Princípios do ensaio

O ensaio QFM utiliza estimulantes liofilizados (QFM LyoSpheres™), que são adicionadas a sangue total heparinizado. A incubação do sangue ocorre durante 16 a 24 horas, após as quais o plasma é colhido e testado para presença de IFN- γ produzido em resposta aos estimulantes.

O teste QFM é desempenhado por etapas. Em primeiro lugar, o sangue total é colhido para o tubo de colheita sanguínea QFM. Em seguida, é adicionada uma QFM LyoSphere ao tubo, que é depois incubado a 37 °C assim que possível e em menos de 8 horas após a colheita. Após um período de incubação entre 16 e 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é removido e a quantidade de IFN- γ (reportada em Unidades internacionais por mililitro, UI/ml) é medida pelo ELISA e comparada a uma gama de valores previstos para caracterizar a resposta imunitária do indivíduo.

O QFM é um ensaio que fornece uma medição qualitativa e quantitativa da função imunitária. Os resultados do QFM podem não quantificar directamente o nível de supressão imunitária.

A quantidade de IFN- γ em amostras de plasma pode estar frequentemente acima dos limites superiores da maioria dos leitores ELISA, mesmo quando os indivíduos estão moderadamente imunossuprimidos. Recomenda-se que as amostras de plasma sejam diluídas 1:10 e/ou 1:100 em Diluente Verde e testadas no ELISA, em conjunto com plasma não diluído.

Nota: o limiar do ensaio QFM pode variar em função do nível de imunossupressão do indivíduo e do cenário de transplantação individual.

Consulte “Interpretação de resultados” na página 25 da presente bula para obter um esboço de como os resultados QFM são interpretados.

Tempo necessário para execução do ensaio

O tempo necessário para executar o ensaio QFM é estimado abaixo. É ainda indicada a duração de teste de várias amostras em lote.

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

ELISA: Aproximadamente 3 horas para uma placa ELISA
(até 88 amostras)

< 1 hora de trabalho

Adicione 10 a 15 minutos para cada placa extra

Componentes e armazenamento

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
Ref.º	0650-0701
Número de preparações	10
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 frascos
<i>Bula do QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
Tubos de colheita sanguínea QuantiFERON Monitor	
Ref.º	0650-0101
Número de preparações	100
Tubos de colheita sanguínea QuantiFERON Monitor (tampa branca, anel branco)	100 tubos
<i>Bula dos tubos de colheita sanguínea QuantiFERON Monitor</i>	1

Componentes do Kit ELISA de 2 placas QuantiFERON Monitor	Kit ELISA de 2 placas
Ref. ^a	0650-0201
Tiras de microplaca, 12 x 8 poços (revestidos com anticorpo monoclonal de murino anti-humano IFN- γ)	2 conjuntos Tiras de microplaca de 12 x 8 poços
IFN- γ Standard, lyophilized (Padrão IFN- γ liofilizado; contém IFN- γ humano recombinante, caseína bovina, Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (Diluyente Verde; contém caseína bovina, soro normal de rato, Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x 30 ml frasco
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Concentrado 100x de Conjugado liofilizado; HRP de IFN- γ murino anti-humano, contém Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x 0,3 ml quando reconstituído
Wash Buffer 20x Concentrate (Concentrado 20x de tampão de lavagem; pH 7,2, contém fracção volúmica de 0,05% de ProClin [®] 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solução de substrato de enzimas; contém H ₂ O ₂ , Tetrametilbenzidina 3,3', 5,5')	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de paragem de enzimas; contém 0,5 M de H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
Bula do QuantiFERON Monitor ELISA	1

* Contém ácido sulfúrico. Consulte a página 11 para precauções.

Materiais necessários mas não fornecidos

- Incubadora a 37 °C*; CO₂ não necessário
- Pipetas de volume variável calibradas*
- Pipetas calibradas multicanal† com capacidade para fornecer entre 50 µl e 100 µl com pontas descartáveis
- Agitador de microplacas†
- Água desionizada ou destilada, 2 litros
- Lavadora de microplacas (recomendada lavadora automática)
- Leitor de microplacas† equipado com filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 a 650 nm
- Proveta
- Toalhas absorventes que não deixem resíduos

Armazenamento e manuseamento

Tubos de colheita sanguínea

Armazene os tubos de colheita sanguínea QFM entre 4 e 25 °C. Os tubos de colheita sanguínea QFM devem estar entre 17 e 25 °C aquando do enchimento e mistura.

LyoSpheres

Armazene as QFM LyoSpheres entre 2 e 8 °C.

Reagentes do kit ELISA

Armazene os reagentes do kit ELISA entre 2 e 8 °C.

Mantenha a solução de substrato de enzimas sempre protegida de luz solar directa.

* Certifique-se de que os equipamentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Reagentes do ELISA reconstituídos e não utilizados

Para instruções sobre como reconstituir os reagentes do ELISA, consulte "Etapa 2 – ELISA IFN- γ ", página 18.

- O padrão reconstituído do kit pode ser guardado durante 3 meses, se a temperatura for de 2 a 8 °C.

Anote a data na qual o padrão do kit foi reconstituído.

- Uma vez reconstituído, o Concentrado 100x de Conjugado não utilizado tem de ser novamente armazenado entre 2 e 8 °C e tem de ser utilizado no prazo de 3 meses.

Anote a data na qual o conjugado foi reconstituído.

- O conjugado funcional tem de ser utilizado num prazo de 6 horas após a preparação (consulte Tabela 1).
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) durante 2 semanas.

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (SDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as SDS de cada kit QIAGEN e componente do kit.

Advertências

- O QFM é um ensaio que fornece uma medição qualitativa e quantitativa da função imunitária. Os resultados do QFM podem não quantificar directamente o nível de supressão imunitária.
- Os resultados do ensaio QFM devem ser utilizados em conjunto com apresentação clínica, historial clínico e outros indicadores clínicos ao estabelecer o estado imunológico de um paciente.
- o limiar do ensaio QFM pode variar em função do nível de imunossupressão do indivíduo e do cenário de transplantação individual.

Precauções

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.



ATENÇÃO: manuseie o sangue e o plasma humanos como sendo potencialmente infecciosos. Respeite as directrizes relevantes relativas ao manuseamento de sangue e de seus produtos. Elimine as amostras e os materiais que entrem em contacto com sangue ou seus produtos em conformidade com a legislação local.

As seguintes advertências de precaução e de perigo aplicam-se aos componentes do ELISA QuantiFERON Monitor.

Advertências de perigo



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(Solução de paragem de enzimas QuantiFERON)

Contém: ácido sulfúrico. Atenção! Pode ser corrosivo para os metais. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(Solução de substrato de enzimas QuantiFERON)

Atenção! Causa uma irritação suave da pele. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.



QuantiFERON Green Diluent (Diluyente verde QuantiFERON)

Contém: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Contém: tartrazine. Atenção! Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.



QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate
(Concentrado 20x de tampão de lavagem QuantiFERON)

Contém: mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Evitar a libertação para o ambiente.

Informações adicionais

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

- Divergências em relação à *bula do ELISA QuantiFERON Monitor (QFM)* podem produzir resultados errados. Leia as instruções cuidadosamente antes da utilização.
- **Importante:** Inspecione os frascos antes da utilização. Não utilize frascos de Conjugado, IFN- γ Standard ou QFM LyoSphere que apresentem sinais de danos ou se o vedante de borracha não estiver em perfeitas condições. Não manuseie frascos partidos. Tome as precauções adequadas para eliminar os frascos em segurança. Recomendação: utilize o dispositivo próprio para abrir os frascos de Conjugado, IFN- γ Standard ou QFM LyoSphere de modo a minimizar o risco de lesões provocadas pelo selo metálico.
- Não utilize o kit ELISA se qualquer um dos frascos de reagente apresentar sinais de dano ou fuga antes da utilização.
- Não misture nem utilize as tiras de microplaca, o IFN- γ padrão, o Diluente Verde, ou o Concentrado 100x de Conjugado de diferentes lotes de kits QFM ELISA. Os outros reagentes (concentrado 20x de tampão de lavagem, solução de substrato de enzimas e solução de paragem de enzimas) podem ser trocados entre kits contanto que os reagentes estejam dentro do seu período de validade e que os detalhes do lote sejam registados.
- Elimine os reagentes e amostras biológicas não utilizados em conformidade com a legislação local e nacional e com a regulamentação ambiental em vigor.
- Não utilize os tubos de colheita sanguínea QFM, as QFM LyoSpheres ou o ELISA QFM após a data de validade.
- Certifique-se de que o equipamento laboratorial foi calibrado e homologado para utilização.

Colheita e manuseamento de amostras

O ensaio QFM deve ser executado apenas com sangue total colhido num tubo de colheita sanguínea com heparina de lítio ou directamente num tubo de colheita sanguínea QFM; é necessário 1 ml de sangue total por teste. Os tubos de colheita sanguínea têm de ser devidamente rotulados e de incluir a hora da colheita sanguínea.

Importante: tanto a estimulação das amostras de sangue QFM (ou seja, a adição de uma QFM LyoSphere a uma alíquota com 1 ml de sangue) como a sua subsequente incubação a 37 °C têm de ocorrer em menos de 8 horas após a colheita.

Antes da incubação, conserve as amostras de sangue à temperatura ambiente (22 ± 5 °C).

Para resultados otimizados, devem ser respeitados os seguintes procedimentos:

1. Rotule os tubos adequadamente.
Certifique-se de que cada tubo de colheita sanguínea QFM é devidamente rotulado com as informações do indivíduo e a hora da colheita sanguínea.
2. Colha 1 ml de sangue por indivíduo através de punção venosa directamente para dentro de um tubo de colheita sanguínea QFM. Este procedimento deve ser desempenhado por um flebotomista qualificado.

Aviso importante: os tubos devem encontrar-se a uma temperatura entre 17 e 25 °C aquando do enchimento.

Os tubos de colheita sanguínea QFM podem ser utilizados até uma altitude de 810 metros acima do nível do mar.

Uma vez que os tubos de 1 ml colhem sangue relativamente devagar, mantenha o tubo na agulha durante 2 a 3 segundos após o tubo aparentar estar cheio. Isto irá garantir que é colhido o volume correto.

A marca negra na parte lateral do tubo de colheita sanguínea QFM indica um volume de 1 ml. Os tubos de colheita sanguínea QFM são fabricados para colher $1 \text{ ml} \pm 10\%$ e ter um desempenho óptimo dentro deste intervalo. Se o nível de sangue estiver fora do intervalo da linha indicadora, deve ser obtida uma nova amostra sanguínea.

Se for utilizada uma agulha escalpe para colher sangue, utilize um tubo de "purga" para garantir que a tubagem é enchida com sangue antes da utilização do tubo de colheita sanguínea QFM.

Se utilizar tubos de colheita sanguínea QFM a uma altitude superior a 810 metros, ou se ocorrer um baixo volume sanguíneo, colha sangue

com uma seringa e transfira imediatamente 1 ml de sangue para o tubo de colheita sanguínea QFM. Por razões de segurança, recomenda-se executar este procedimento removendo a agulha da seringa, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo a tampa do tubo de colheita sanguínea QFM e adicionando 1 ml de sangue (até ao centro da marca preta na parte lateral do rótulo do tubo). Volte a colocar a tampa em segurança e misture conforme descrito em baixo.

Em caso de utilização de um torniquete, afrouxe-o assim que a agulha é introduzida na veia, de modo a evitar variações de tensão arterial, que podem afectar o volume de sangue.

Em alternativa, o sangue pode ser colhido num tubo genérico para colheita de sangue contendo heparina de lítio como anticoagulante e, em seguida, transferido para um tubo de colheita sanguínea QFM. Utilize apenas a heparina de lítio como anticoagulante sanguíneo, uma vez que os outros anticoagulantes interferem com o ensaio. Encha um tubo de colheita sanguínea (volume mínimo de 3 ml) e misture suavemente invertendo o tubo várias vezes para dissolver a heparina. O sangue deve ser mantido à temperatura ambiente ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) antes da transferência para os tubos de colheita sanguínea QFM para estimulação com uma QFM LyoSphere. Certifique-se de que o tubo é bem misturado invertendo-o suavemente imediatamente antes da transferência. Transfira uma alíquota de 1,0 ml de sangue para um tubo de colheita sanguínea QFM. A transferência deve ser executada em condições assépticas, assegurando os procedimentos de segurança adequados, removendo a tampa do tubo de colheita sanguínea QFM e adicionando 1 ml de sangue (até ao centro da marca preta na parte lateral do rótulo do tubo). Volte a colocar as tampas dos tubos em segurança e misture conforme descrito em baixo.

3. Imediatamente após encher os tubos, inverta-os cuidadosamente várias vezes para dissolver a heparina.

Importante: uma agitação demasiado vigorosa poderá causar ruptura do gel e levar a resultados anómalos.

4. Antes de utilizar, coloque as QFM LyoSpheres à temperatura ambiente ($22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$).
5. Adicione assepticamente uma QFM LyoSphere a 1 ml de sangue.

Destape o tubo de colheita sanguínea.

Bata com o frasco de QFM LyoSphere levemente numa superfície dura para certificar-se de que a QFM LyoSphere se encontra no fundo do frasco. Destape o frasco de QFM LyoSphere removendo, em primeiro lugar, o selo metálico e, em segundo lugar, a rolha de borracha.

Deixe a QFM LyoSphere cair cuidadosamente na amostra de 1 ml de sangue alinhando o gargalo do frasco de vidro com a boca do tubo de colheita sanguínea QFM e, em seguida, invertendo o frasco com cuidado para transferir a QFM LyoSphere para o tubo de colheita sanguínea QFM (consulte a Figura 1).

Importante: caso a QFM LyoSphere caia para fora do tubo de colheita sanguínea QFM, elimine-a e abra outro frasco de QFM LyoSphere.

Importante: não deixe o frasco de QFM LyoSphere aberto durante longos períodos de tempo. A QFM LyoSphere deve ser adicionada ao sangue logo após a abertura do frasco.

Caso as QFM LyoSpheres sejam adicionadas a sangue colhido em tubos de colheita sanguínea QFM, certifique-se de que coloca as tampas dos tubos nas amostras corretas.

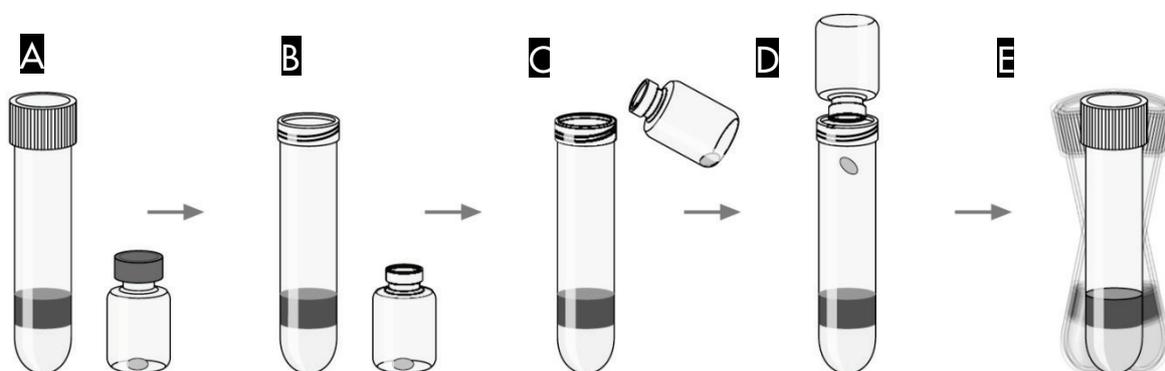


Figura 1. Adição da QFM LyoSphere. **A** Tubo de colheita sanguínea QFM e frasco QFM LyoSphere. **B** Remova a tampa do tubo de colheita sanguínea QFM e remova o selo metálico e a rolha de borracha do frasco de QFM LyoSphere. **C** Adicione a QFM LyoSphere ao sangue imediatamente alinhando o gargalo do frasco de vidro com a boca do tubo de colheita sanguínea. **D** Em seguida, invertendo o frasco com cuidado para transferir a LyoSphere para o tubo. **E** Tape novamente o tubo de colheita sanguínea QFM e agite entre 5 e 10 vezes.

6. Tape o tubo de colheita sanguínea QFM e agite-o entre 5 e 10 vezes, com firmeza suficiente para se certificar que a QFM LyoSphere se dissolve totalmente.

É possível dissolver uma QFM LyoSphere que esteja colada à superfície interna do tubo cobrindo-a com sangue ao inverter o tubo.

Certifique-se de que a tampa é colocada no tubo assim que a QFM LyoSphere é adicionada, de modo a evitar a adição acidental de uma segunda LyoSphere ao mesmo tubo.

Nota: uma vez que a QFM LyoSphere é branca, após se ter dissolvido, deixará de ser visível no sangue.

Importante: uma agitação demasiado vigorosa poderá causar ruptura do gel e levar a resultados anómalos.

7. Após adicionar e dissolver a QFM LyoSphere, é necessário transferir os tubos de colheita sanguínea QFM para uma incubadora a 37 ± 1 °C assim que possível e em menos de 8 horas após a colheita.

Indicações de utilização

Etapa 1 — incubação do sangue e colheita do plasma

Materiais fornecidos

- Tubos de colheita sanguínea QFM (consulte “Componentes e armazenamento”, página 6)

Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Consulte “Materiais necessários mas não fornecidos”, página 8

Procedimento

1. Incube os tubos de colheita sanguínea QFM com alíquotas de 1 ml de sangue com QFM LyoSphere VERTICALMENTE a 37 ± 1 °C durante 16 a 24 horas.
Nota: a incubadora não necessita de CO₂ nem de humidificação.
Após a incubação, os tubos de colheita sanguínea QFM poderão ser mantidos entre 4 e 27 °C durante até 3 dias antes da centrifugação.
2. Após a incubação, a colheita de plasma é facilitada pela centrifugação dos tubos de colheita sanguínea QFM durante 15 minutos entre 2000 a 3000 × *g* (RCF). O tampão de gel separará as células do plasma. Caso isso não ocorra, dever-se-á centrifugar novamente os tubos.
É possível colher o plasma sem centrifugação, contudo, são necessários cuidados adicionais para remover o plasma sem perturbar as células.
3. As amostras de plasma apenas devem ser colhidas utilizando uma pipeta.
Importante: após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.

As amostras de sangue podem ser carregadas directamente dos tubos de colheita sanguínea QFM centrifugados para dentro da placa QFM ELISA, inclusive quando forem utilizadas as estações de trabalho automatizadas ELISA.

As amostras de plasma podem ser armazenadas durante 28 dias a uma temperatura entre 2 e 8 °C ou, se colhidas, inferior a -20 °C para períodos mais prolongados. As alíquotas de amostras de plasma colhido devem ser seladas antes de armazenadas.

Ao colher amostras de plasma, colha pelo menos 150 µl para permitir a repetição do teste, se necessário.

A quantidade de IFN- γ em amostras de plasma pode estar frequentemente acima dos limites superiores da maioria dos leitores ELISA, mesmo quando os indivíduos estão moderadamente imunossuprimidos. Recomenda-se que as amostras de plasma sejam diluídas 1:10 e/ou 1:100 em Diluente Verde e testadas no ELISA, em conjunto com plasma não diluído (consulte “Etapa 2 – ELISA IFN- γ ”).

Etapa 2 – ELISA IFN- γ

Materiais fornecidos

- Kit ELISA de 2 placas QuantiFERON Monitor (consulte “Componentes e armazenamento”, página 6)

Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Consulte “Materiais necessários mas não fornecidos”, página 8

Preparação

O IFN- γ no plasma pode estar frequentemente acima dos limites superiores da maioria dos leitores ELISA, mesmo quando os indivíduos estão moderadamente imunossuprimidos. Recomendação: dilua as amostras de plasma 1:10 e/ou 1:100 em Diluente Verde e teste no ELISA, em conjunto com plasma não diluído.

Em situações em que o paciente possa estar altamente imunossuprimido, a preparação e a execução de testes apenas em plasma não diluído pode ser suficiente para obter um resultado quantitativo.

Nota: os resultados de amostras que estejam dentro do intervalo do ELISA QFM (até 10 UI/ml) devem ser utilizadas na interpretação de resultados. A diluição mais baixa que gere um resultado dentro do intervalo do ELISA QFM deve ser utilizada como o resultado reportado (considerando o factor de diluição) caso o plasma não diluído esteja acima do intervalo do ELISA QFM.

Procedimento

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, excepto o Concentrado 100x de Conjugado, têm de ser colocados à temperatura ambiente (22 ± 5 °C) antes de utilizados. Aguarde, no mínimo, 60 minutos para alcançar o equilíbrio térmico.

2. Remova da estrutura de microplacas as tiras que não sejam necessárias, sele a bolsa de folha de alumínio e volte a colocar no frigorífico para armazenar até ser necessária.

Deixe pelo menos 1 tira para os padrões QFM e tiras suficientes para o número de indivíduos a ser testados. Após a utilização, conserve a estrutura e a tampa para utilizar com as tiras restantes.

3. Reconstitua o padrão IFN- γ liofilizado com o volume de água desionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco padrão. Misture suavemente para minimizar a espuma e para garantir a solubilização completa. A reconstituição do padrão com o volume declarado produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/ml.

Importante: o volume de reconstituição do padrão de IFN- γ é diferente de lote para lote. Consulte o rótulo do frasco padrão para se certificar de que utiliza o volume correto de água desionizada ou destilada.

Utilize o padrão reconstituído do kit para produzir uma diluição 1 em 2 seguida de uma série de diluição 1 em 4 de IFN- γ em Diluente Verde (GD) (consulte a Figura 2). P1 (Padrão 1) contém 4,0 UI/ml, P2 (Padrão 2) contém 1,0 UI/ml, P3 (Padrão 3) contém 0,25 UI/ml, e P4 (Padrão 4) contém 0 UI/ml (apenas GD). Os padrões devem ser testados em duplicado. Prepare novas diluições do padrão do kit para cada sessão do ELISA.

Procedimento recomendado para padrões em duplicado

- Rotule os 4 tubos "P1", "P2", "P3", "P4".
- Adicionar 150 μ l de GD a P1, P2, P3 e P4.
- Adicionar 150 μ l do padrão do kit a P1 e misturar bem.
- Transferir 50 μ l de P1 para P2 e misturar bem.
- Transferir 50 μ l de P2 para P3 e misturar bem.
- Apenas Diluente Verde (GD) serve como padrão zero (P4).

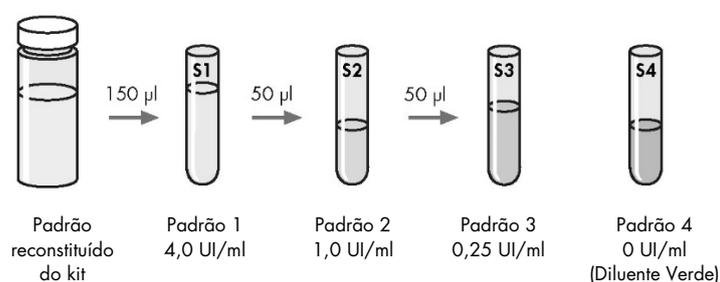


Figura 2. Preparação de curva padrão.

- Reconstitua o Concentrado 100x de Conjugado liofilizado com 0,3 ml de água desionizada ou destilada. Misture suavemente para minimizar a espuma e para garantir a solubilização completa do conjugado. O conjugado funcional é preparado diluindo a quantidade necessária de Concentrado 100x de Conjugado reconstituído em Diluente Verde (Tabela 1. Preparação de conjugado). Volte a colocar qualquer Concentrado 100x de Conjugado não utilizado entre 2 e 8 °C imediatamente após a utilização. Utilize apenas Diluente Verde.

Tabela 1. Preparação de conjugado

Número de tiras	Volume de Concentrado de conjugado 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. Relativamente às amostras de plasma colhidas dos tubos de colheita sanguínea e subsequentemente congeladas ou armazenadas, misture bem antes de adicionar ao poço ELISA.

Importante: se adicionar as amostras de plasma directamente a partir dos tubos QFM centrifugados, deve evitar misturar, de modo algum, o plasma. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.

6. Recomendação: dilua as amostras de plasma 1:10.
- Adicione 90 µl de Diluente Verde (GD) a um tubo rotulado com as informações do paciente e "1:10".
 - Em seguida, adicione 10 µl de amostras de plasma misturado (consulte o passo 5 para obter detalhes das amostras de plasma misturado em comparação com as adicionadas directamente de tubos CFM centrifugados).
 - Misture bem através de pipetagem, minimizando a formação de espuma.

7. Recomendação: dilua as amostras de plasma 1:100.
 - Prepare uma diluição 1:10 (consulte o passo 6 acima).
 - Adicione 90 µl de Diluente Verde a um tubo rotulado com as informações do paciente e "1:100".
 - Adicione 10 µl da diluição 1:10.
 - Misture bem através de pipetagem, minimizando a formação de espuma.

Recomendação: teste as amostras seguintes em paralelo e segundo a ordem seguinte:

- Não diluídas, 1:10, 1:100

As seguintes opções de amostras de indivíduos são também suportadas pelo software de análise QFM:

- Não diluídas
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Não diluídas, 1:10

8. Adicione 50 µl de conjugado funcional recém-preparado aos poços ELISA necessários utilizando uma pipeta multicanal.
9. Adicione 50 µl de amostra de plasma para teste aos poços adequados utilizando uma pipeta multicanal. Em seguida, adicione 50 µl de cada um dos Padrões 1 a 4. Teste os padrões em duplicado.
10. Cubra cada placa com uma tampa e misture bem o conjugado e as amostras/padrões de plasma utilizando um agitador de microplacas, durante 1 minuto. Evitar salpicos.
11. Incube à temperatura ambiente (22 ± 5 °C) durante 120 ± 5 minutos. Durante a incubação, as placas não devem estar expostas a luz solar directa.
12. Durante a incubação, dilua 1 parte de Concentrado 20x de tampão de lavagem com 19 partes de água desionizada ou destilada, e misture bem. É fornecido Concentrado 20x de tampão de lavagem suficiente para preparar 2 litros de tampão de lavagem funcional.
Lave os poços com 400 µl de tampão de lavagem funcional durante pelo menos 6 ciclos numa lavadora de microplacas. Recomenda-se uma lavadora de placas automática.

Uma lavagem exaustiva é muito importante para o desempenho do ensaio. Certifique-se de que cada um dos poços está completamente cheio com tampão de lavagem em cada um dos ciclos de lavagem. Recomendação: imerja os poços durante pelo menos 5 segundos entre cada ciclo para obter o melhor resultado.

Adicione desinfetante normal de laboratório ao reservatório efluente e siga os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.

13. Bata nas placas, viradas para baixo sobre uma toalha absorvente e com poucos fiapos, para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100 µl de solução de substrato de enzimas e cubra placa com uma tampa e misture bem, utilizando um agitador de microplacas.
14. Incube à temperatura ambiente (22 ± 5 °C) durante 30 minutos.
Durante a incubação, as placas não devem estar expostas a luz solar directa.
15. Após a incubação, adicione 50 µl de solução de paragem de enzimas e misture bem, utilizando um agitador de microplacas.
A solução de paragem de enzimas deve ser adicionada aos poços na mesma ordem e, aproximadamente, à mesma velocidade que a solução de substrato de enzimas no passo 13.
16. Meça a absorvância (OD) até no máximo 5 minutos após a paragem da reacção utilizando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e um filtro de referência de 620 a 650 nm. Os valores de OD são utilizados para calcular os resultados.

Cálculos e interpretação de testes

O software de análise QuantiFERON Monitor é utilizado para analisar dados não processados e para calcular resultados. Está disponível em www.QuantiFERON.com. Certifique-se de que é utilizada a versão mais recente do software de análise QuantiFERON Monitor.

O software executa uma avaliação de controlo de qualidade do ensaio, gera uma curva padrão, e fornece um resultado de teste para cada indivíduo, conforme detalhado na secção Interpretação de resultados.

Caso o plasma não diluído esteja acima do intervalo superior (> 10 UI/ml) do ELISA QFM, o software de análise QuantiFERON Monitor reporta a diluição mais baixa que gere um resultado dentro do intervalo do ELISA QFM, considerando o factor de diluição.

Como alternativa à utilização do software de análise QuantiFERON Monitor, é possível determinar os resultados segundo o seguinte método.

Geração de curva padrão

(Se o software de análise QuantiFERON Monitor não for utilizado)

Determine os valores médios de OD das réplicas de padrão de kit de cada placa.

Construa uma curva padrão de $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$ traçando o $\log_{(e)}$ da OD média (eixo Y) de encontro ao $\log_{(e)}$ da concentração de IFN- γ dos padrões em UI/ml (eixo X), omitindo destes cálculos o padrão zero. Calcule a linha de melhor adequação da curva padrão através de análise de regressão.

Utilize a curva padrão para determinar a concentração de IFN- γ (UI/ml) de cada uma das amostras de plasma do teste, utilizando o valor de OD de cada amostra.

Estes cálculos podem ser efectuados utilizando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas, e com software padrão de folha de cálculo ou estatístico (tal como o Microsoft® Excel®). Recomendamos que se utilize estes pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (%CV) dos padrões e o coeficiente de correlação (r) da curva padrão.

O resultado reportado deve ser considerado a partir da diluição mais baixa que gere um resultado dentro do intervalo do ELISA QFM (considerando o factor de diluição), caso o plasma não diluído esteja acima do intervalo do ELISA QFM.

Controlo de qualidade do teste

A exactidão dos resultados de teste está dependente da geração de uma curva padrão precisa. Por conseguinte, os resultados derivados dos padrões têm de ser examinados antes que os resultados da amostra de teste possam ser interpretados.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de OD médio do Padrão 1 tem de ser $\geq 0,600$.
- A %CV dos valores de OD replicados do Padrão 1 e do Padrão 2 tem de ser $\leq 15\%$.
- Os valores de OD replicados do Padrão 3 e do Padrão 4 não podem variar mais do que 0,040 valores de absorvância desde a média.
- O coeficiente de correlação (r) calculado a partir dos valores médios de absorvância dos padrões tem de ser $\geq 0,98$.

O software de análise QuantiFERON Monitor calcula e relata estes parâmetros de controlo de qualidade.

Se os critérios acima não forem satisfeitos, a execução é inválida e tem de ser repetida.

O valor de OD médio do 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.

Interpretação de resultados

Os resultados de QFM são interpretados com base na resposta de IFN- γ a estimulantes imunitários inatos e adaptativos. O ensaio QFM fornece uma medição qualitativa e quantitativa da função imunitária. Os resultados do QFM podem não quantificar directamente o nível de supressão imunitária.

Importante: ao estabelecer o estado imunológico de um indivíduo, o nível medido de IFN- γ deve ser utilizado em conjunto com a apresentação clínica, o historial clínico e outras avaliações de diagnóstico (Tabela 2). O limiar do teste QFM pode variar em função do nível de imunossupressão do indivíduo e do cenário de transplantação individual.

Tabela 2. Interpretação de resultados

IFN- γ de resultados do QFM (UI/ml)	Classificação	Interpretação
< 15	Baixo	O indivíduo possui uma resposta baixa de IFN- γ a estimulantes imunitários inatos e adaptativos
15–1000	Moderado	O indivíduo possui uma resposta moderada de IFN- γ a estimulantes imunitários inatos e adaptativos
> 1000	Alto	O indivíduo possui uma resposta alta de IFN- γ a estimulantes imunitários inatos e adaptativos

Caso o nível medido de IFN- γ de uma amostra de plasma não diluído for inferior a 0,1 UI/ml:

- Certifique-se de que a QFM LyoSphere foi adicionada à amostra de sangue e de que o tubo foi incubado conforme indicado na presente bula.
- Certifique-se de que o resultado IFN- γ corresponde ao estado clínico actual do indivíduo.

Se suspeitar de problemas técnicos na colheita ou manuseamento das amostras sanguíneas, repita todo o ensaio QFM com uma nova amostra sanguínea. Repita o teste ELISA de amostras de plasma estimulado caso suspeite de que o teste original se desviou do procedimento descrito na presente bula (consulte a secção Controlo de qualidade do teste para obter mais detalhes).

O médico poderá desejar repetir o teste caso os resultados sejam inconsistentes com o estado clínico actual do indivíduo.

Limitações

Os resultados dos testes QFM têm de ser utilizados em conjunto com o historial clínico, o estado clínico actual e outras avaliações de diagnóstico de cada um dos indivíduos. Os laboratórios podem optar por estabelecer os seus próprios intervalos para o ensaio.

Os laboratórios podem ainda optar por testar uma amostra de controlo externa colhida de um indivíduo saudável paralelamente às amostras dos pacientes.

Podem ocorrer resultados duvidosos ou imprecisos devido a:

- Anticoagulante sanguíneo incorrecto — utilize apenas heparina de lítio uma vez que outros anticoagulantes interferem com o ensaio.
- Desvios do procedimento descrito na presente bula.
- Níveis excessivos de IFN- γ em circulação ou presença de anticorpos heterófilos.
- Mais de 8 horas entre a colheita da amostra sanguínea e a incubação a 37 °C.
- Enchimento insuficiente ou excessivo dos tubos sanguíneos QFM fora do intervalo entre 0,9 e 1,1 ml.

Características de desempenho

Estudos clínicos

Foram efectuados dois estudos para avaliar as respostas de indivíduos aparentemente saudáveis ($n = 114$) em comparação com receptores de transplante ($n = 30$). Dos receptores de transplante, 18 compunham o grupo pós-transplante recente (Pós-Tx recente, menos de 3 meses após o transplante) e 12 compunham o grupo pós-transplante antigo ou estável (Pós-Tx antigo, mais de 12 meses após o transplante).

- Foram colhidas amostras em até 5 ocasiões de cada indivíduo de Pós-Tx recente (grupo de 3 meses após transplante, $n = 64$ amostras).
- Foi colhida 1 amostra de cada indivíduo de Pós-Tx antigo ($n = 12$ amostras)
- Foi colhida 1 amostra de cada indivíduo do grupo aparentemente saudável ($n = 114$)

As respostas de QFM foram de baixas a moderadas em ambos os grupos de amostras pós-transplante, seja Pós-Tx recente e Pós-Tx antigo. Pós-Tx recente

teve uma percentagem superior (93,8%) de respostas na gama baixa e uma percentagem inferior de respostas (6,3%) na gama moderada em comparação com as respostas de Pós-Tx antigo, com 25% das respostas na gama baixa e 66,7% na gama moderada (Tabela 3). Nenhuma resposta de Pós-Tx recente estava na gama de resposta alta, e apenas 1 (8,3%) resposta de Pós-Tx antigo estava na mesma gama. As respostas de QFM do grupo aparentemente saudável situaram-se principalmente na gama moderada (83,3%) e na gama alta (15,8%) (Tabela 3).

Tabela 3. Gama de respostas de QFM em indivíduos aparentemente saudáveis em comparação com receptores de transplante

IFN- γ (UI/ml)	Categoria de resultados	% de Pós-Tx recente * IC de 95% n	% de Pós-Tx antigo * IC de 95% n	% de saúde aparente * IC de 95% n	Resultados totais
< 15	Baixo	93,8% 85,0–97,5 n = 60	25,0% 8,9–53,2 n = 3	0,9% 0,2–4,8 n = 1	64
15–1000	Moderado	6,3% 2,5–15,0 n = 4	66,7% 39,1–86,2 n = 8	83,3% 75,4–89,1 n = 95	107
> 1000	Alto	0,0% 0-5,7 n = 0	8,3% 1,5–35,4 n = 1	15,8% 10,2–23,6 n = 18	19
Amostras totais		64	12	114	190

* As percentagens indicam a proporção de amostras de cada grupo de doadores que se insere dentro de uma determinada gama de resposta.

Valores previstos

A distribuição de respostas de IFN- γ ao QFM em pacientes de pós-transplante recente (até 3 meses após o transplante) foi determinada a partir de 64 amostras colhidas de 18 receptores de transplante utilizando o ELISA QFM (Figura 3).

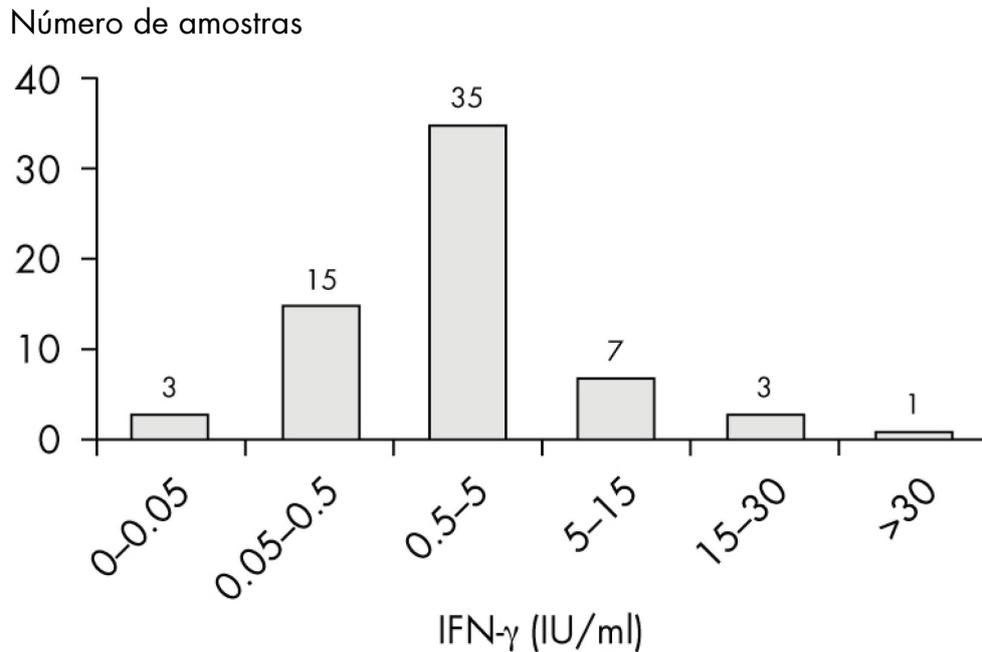


Figura 3. Distribuição de respostas de IFN- γ ao QFM em pacientes de pós-transplante recente (n = 64; mediana = 1,5 UI/ml).

A distribuição de respostas de IFN- γ ao QFM em pacientes de pós-transplante antigo (mais de 12 meses após o transplante) foi determinada a partir de 12 amostras utilizando o ELISA QFM (Figura 4).

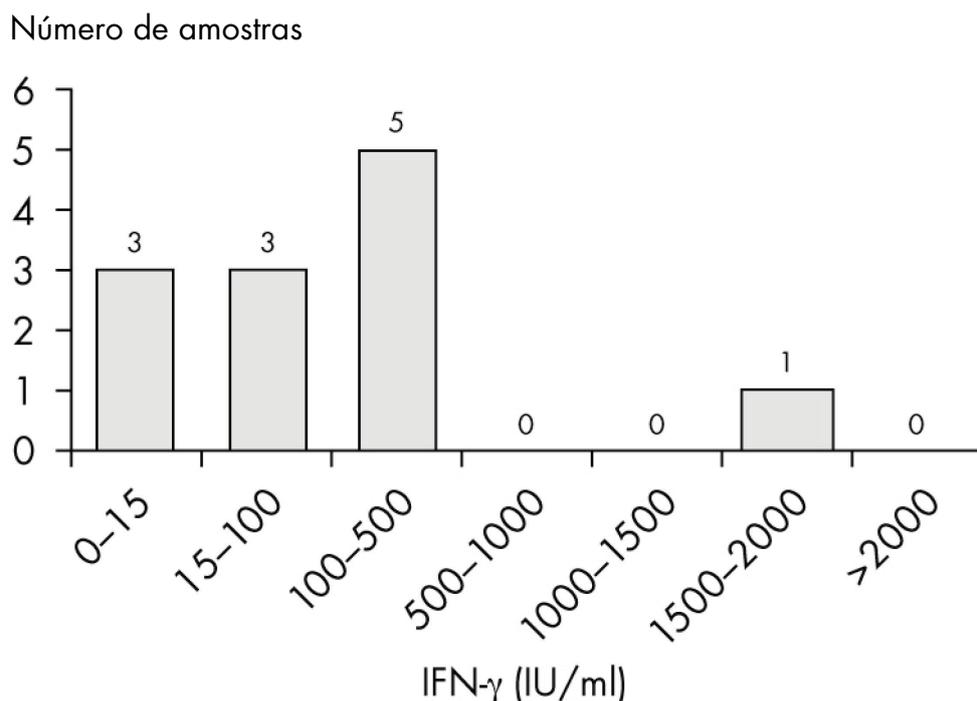


Figura 4. Distribuição de respostas de IFN- γ ao QFM em pacientes de pós-transplante antigo (n = 12; mediana = 98,8 UI/ml).

A distribuição de respostas de IFN- γ ao QuantiFERON Monitor em indivíduos aparentemente saudáveis foi determinada a partir de 114 amostras utilizando o ELISA QFM (Figura 5).

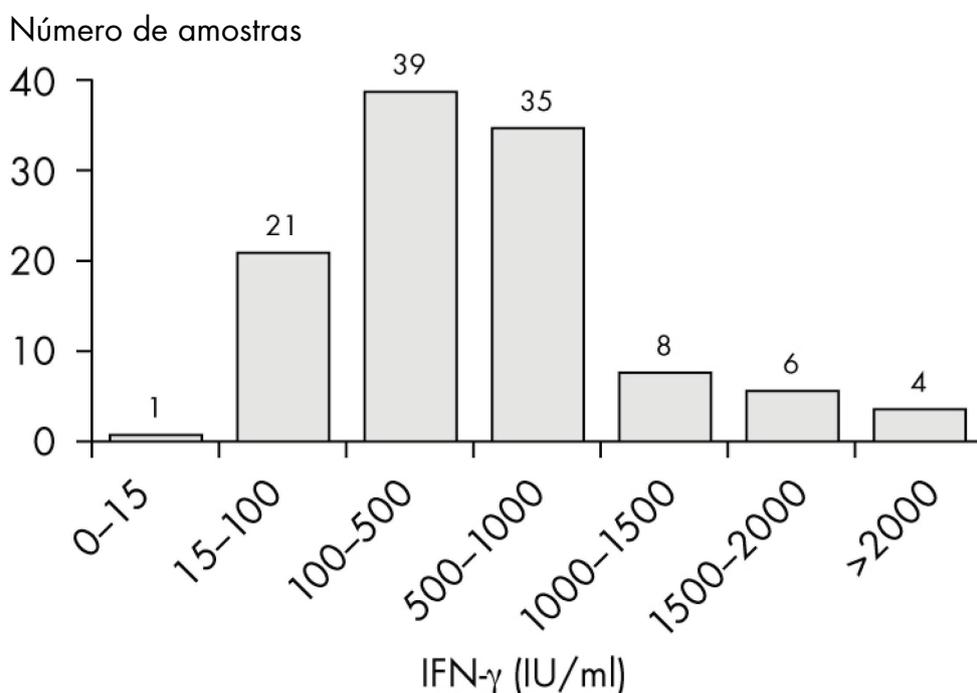


Figura 5. Distribuição de respostas de IFN- γ ao QFM em indivíduos aparentemente saudáveis (n = 114; mediana = 400,5 UI/ml).

Respostas ao QFM em pacientes de transplante de órgãos

O QFM foi avaliado num estudo de observação e transversal de pacientes de transplante de órgãos (4). O estudo incluiu: 212 indivíduos saudáveis com um subgrupo de 30 controlos agrupados por idade e sexo, 30 pacientes pré-transplante, 18 pacientes de pós-transplante recente (66 amostras, mediana do tempo pós-transplante = 21 dias) e 11 pacientes de pós-transplante antigo (mediana do tempo pós-transplante = 2290 dias). A produção média de IFN- γ foi de 555,2 UI/ml nos controlos saudáveis e de 614,6 UI/ml nos controlos agrupados por idade e por sexo. Foi demonstrado que a produção média de IFN- γ é significativamente inferior tanto em pacientes pré-transplante (IFN- γ = 89,3 UI/ml) como em pacientes de pós-transplante recente (IFN- γ = 3,76 UI/ml) em comparação com os controlos agrupados por idade e por sexo ($p < 0,001$). O restauro da função imunitária nos pacientes de pós-transplante antigo (média de IFN- γ = 256,1 UI/ml) foi observado e demonstrado como significativamente superior ao dos pacientes de pós-transplante recente ($p < 0,05$). Este estudo demonstra que o QFM pode ser utilizado para avaliar a função imunitária mediada por células na população de transplante de órgãos sólidos imunossuprimida.

Características de desempenho dos ensaios

Demonstrou-se que o QFM ELISA é linear colocando aleatoriamente 5 réplicas de 11 pools de plasma de concentrações conhecidas de IFN- γ placa do ELISA. A linha regressão linear possui uma inclinação de $1,002 \pm 0,011$ e um coeficiente de correlação de 0,99 (Figura 6).

O limite de detecção do QFM ELISA é de 0,065 UI/ml, não existindo evidências de um efeito de prozona com concentrações de IFN- γ até 10 000 UI/ml.

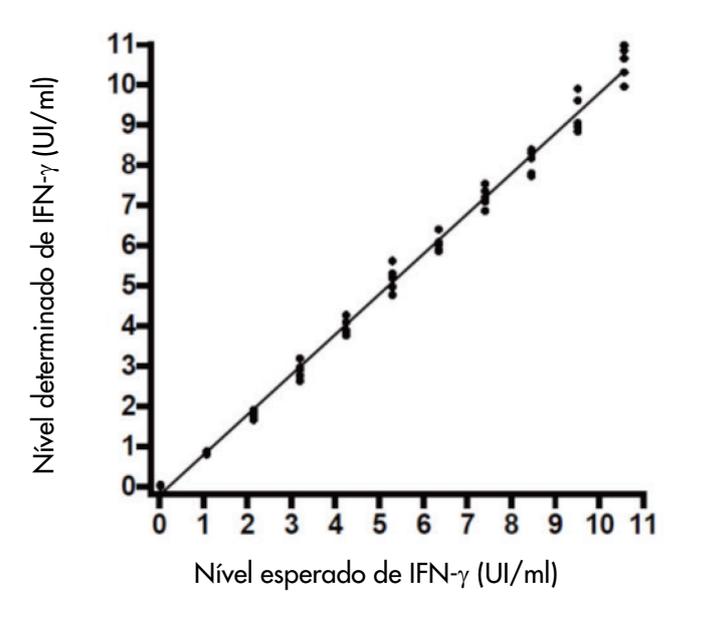


Figura 6. O perfil de linearidade do ELISA QFM determinado pelo teste de 5 réplicas de 11 amostras de plasma com concentrações de IFN- γ conhecidas.

A reprodutibilidade do ensaio QFM (Etapa 1) foi determinada utilizando amostras de sangue de 20 indivíduos saudáveis. Foram avaliados três operadores, três lotes de QFM LyoSphere e três conjuntos de equipamento. O coeficiente médio da variação dos nível de resposta de IFN- γ determinado utilizando o ELISA QFM nos três lotes de QFM LyoSpheres e nas três situações testadas foi de 22,22% (IC de 95%: 17,20–27,25).

A repetibilidade do ensaio QFM (Etapa 1) foi avaliada medindo a variabilidade de 5 a 6 estimulações sanguíneas com QFM LyoSphere repetidas do mesmo grupo de dadores em 14 indivíduos. O coeficiente médio de variação nos 14 indivíduos testados foi de 14,7% (IC de 95%: 10,2–19,2). A %CV dos indivíduos foi inferior a 30%.

A reprodutibilidade do ELISA QFM (Etapa 2) foi estimada testando 20 amostras de plasma com concentrações variáveis de IFN- γ em réplicas de 3, em

3 laboratórios, em 3 dias não consecutivos e realizados por 3 operadores. Deste modo, cada amostra foi testada 27 vezes em 9 execuções de ensaio independentes. Uma amostra era um controlo Nil e tinha uma concentração calculada de IFN- γ de 0,08 UI/ml (CI de 95%: 0,07–0,09). Das 19 amostras de plasma restantes, o intervalo de concentrações estava entre 0,33 (IC de 95%: 0,31–0,34) e 7,7 UI/ml (IC de 95%: 7,48–7,92).

A imprecisão dentro da execução ou intraensaio foi estimada calculando a média de %CV para cada teste de plasma contendo IFN- γ de cada execução da placa (n = 9), estando a imprecisão entre 4,1 e 9,1% CV. A %CV média dentro da corrida (\pm IC de 95%) foi de $6,6 \pm 0,6\%$. A média do plasma com zero IFN- γ foi de 14,1% CV.

A imprecisão total ou interensaio foi determinada através da comparação de 27 concentrações calculadas de IFN- γ por cada amostra de plasma. A imprecisão interensaio estava entre 6,6 e 12,3% CV. A %CV média geral (\pm IC de 95%) foi de $8,7 \pm 0,7\%$. O plasma com zero IFN- γ apresentou 26,1% CV. Este nível de variação é expectável uma vez que a concentração calculada de IFN- γ é baixa e a variação em torno de uma estimativa baixa de concentração será maior de que para concentrações mais altas.

Informações técnicas

Amostras de plasma coaguladas

Se ocorrerem coágulos de fibrina nas amostras de plasma de armazenamento de longo-prazo, centrifugue as amostras para sedimentar o material coagulado e facilitar a pipetagem do plasma.

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para mais informações, consulte também as informações técnicas disponibilizadas em: www.QuantiFERON.com.

Para informações de contacto, consulte a contracapa.

Resolução de problemas ELISA

Desenvolvimento cromático não específico

Causa possível	Solução
a) Lavagem incompleta da placa	Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, em função da lavadora utilizada. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo.
b) Contaminação cruzada dos poços ELISA	Tome cuidado ao pipetar e a misturar as amostras para minimizar os riscos.
c) O prazo de validade do kit/componentes expirou	Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Concentrado 100x de Conjugado são utilizados antes de 3 meses após a data de reconstituição.
d) A solução de substrato de enzimas está contaminada	Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos.
e) Mistura do plasma nos tubos QFM antes da colheita	após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.

Leituras baixas da absorvância dos padrões

Causa possível	Solução
a) Erro de diluição do padrão	Certifique-se de que as diluições do padrão do kit são preparadas correctamente conforme a presente bula.

Resolução de problemas ELISA

- | | |
|---|--|
| b) Erro de pipetagem | Certifique-se de que as pipetas estão calibradas e de que são utilizadas de acordo com as instruções do fabricante. |
| c) Temperatura de incubação demasiado baixa | A incubação do ELISA deve ser efectuada a temperatura ambiente (17 a 27 °C). |
| d) Tempo de incubação demasiado curto | Incube a placa com o conjugado, com os padrões e com as amostras durante 120 ± 5 minutos. Incube a solução de substrato de enzimas durante 30 minutos. |
| e) Utilizado um filtro de leitor de placas incorrecto | A placa deve ser lida a 450 nm com um filtro de referência entre 620 e 650 nm. |
| f) Os reagentes estão demasiados frios | Todos os reagentes, exceptuando o Concentrado 100x de Conjugado, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isso leva, aproximadamente, uma hora. |
| g) O prazo de validade do kit/componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Concentrado 100x de Conjugado são utilizados antes de 3 meses após a sua data de reconstituição. |

Plano de fundo alto

Causa possível

Solução

- | | |
|---|---|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, em função da lavadora utilizada. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Temperatura de incubação demasiado elevada | A incubação do ELISA deve ser efectuada a temperatura ambiente (17 a 27 °C). |

Resolução de problemas ELISA

- | | |
|---|---|
| c) O prazo de validade do kit/componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que o padrão reconstituído e o Concentrado 100x de Conjugado são utilizados antes de três meses após a data de reconstituição. |
| d) A solução de substrato de enzimas está contaminada | Elimine o substrato se existir coloração azulada. Certifique-se de que são utilizados reservatórios de reagentes limpos. |

Curva padrão não linear e variabilidade de duplicados

Causa possível	Solução
a) Lavagem incompleta da placa	Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais do que 6 ciclos de lavagem, em função da lavadora utilizada. Deve existir um período de imersão de 5 segundos entre cada ciclo.
b) Erro de diluição do padrão	Certifique-se de que as diluições do padrão são preparadas correctamente conforme a presente bula.
c) Mistura mal efectuada	Misture bem os reagentes, invertendo ou misturando suavemente em vórtex, antes de os adicionar à placa.
d) Técnica inconsistente ou interrupção da pipetagem durante a preparação do ensaio	A adição de amostras e de padrões deve ser efectuada de um modo contínuo. Todos os reagentes devem ser preparados antes de iniciar o ensaio.

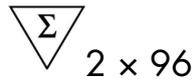
As informações dos produtos e os guias técnicos são disponibilizados gratuitamente pela QIAGEN, através do seu fornecedor, ou visitando www.QuantiFERON.com.

Bibliografia

Encontra uma lista exaustiva de referências de QFM na Gnowee — a biblioteca de referências QuantiFERON, disponível em www.gnowee.net.

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2012) *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Sanders.
2. Fernández-Ruiz, M., Kumar, D., and Humar, A. (2014) Clinical immune-monitoring strategies for predicting infection risk in solid organ transplantation. *Clin. Transl. Immunol.* 3, e12.
3. Sood, S. and Testro, A.G. (2014) Immune monitoring post liver transplant. *World J. Transplant.* 4, 30.
4. Sood, S. (2014) A novel biomarker of immune function and initial experience in a transplant population. *Transpl. J.* 97, e50.

Símbolos



Suficiente para 2 x 96 preparações de amostra



Fabricante legal



Assinalado com o símbolo CE-IVD



Para utilização em diagnóstico *in vitro*



Código do lote



Ref.º



Prazo de validade



Limites de temperatura



Consultar instruções de utilização



Não reutilizar



Manter afastado da luz solar



Representante autorizada na Comunidade Europeia

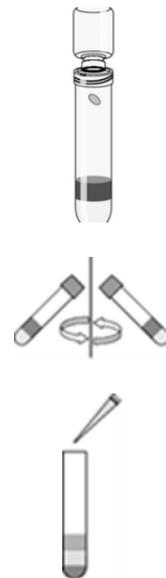
Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, contacte-nos gratuitamente através do número 00800-22-44-6000, consulte o nosso Centro de Assistência Técnica em www.qiagen.com/contact ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica (consulte a contracapa ou visite www.qiagen.com).

Procedimento abreviado do teste

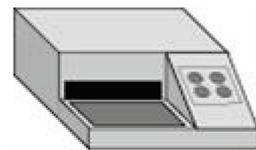
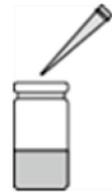
Etapa 1 — incubação do sangue

1. Colha o sangue do paciente para um tubo de colheita sanguínea QFM ou para um tubo de colheita sanguínea com heparina de lítio. Rotule os tubos com as informações do paciente e a hora da colheita sanguínea e, em seguida, transporte-os para o laboratório à temperatura ambiente em menos de 8 horas após a colheita.
 - a. Caso o sangue tenha sido colhido para um tubo com heparina de lítio, transfira 1 ml de sangue para um tubo de colheita sanguínea QFM e rotule o mesmo com as informações do paciente e a hora da colheita sanguínea
2. Adicione 1 QFM LyoSphere a cada tubo de colheita sanguínea QFM com 1 ml de sangue, dissolva a LyoSphere e, em seguida, incube os tubos assim que possível (e em menos de 8 horas após a colheita.) verticalmente durante 16 a 24 horas a 37 °C.
3. Após a incubação, centrifugue os tubos durante 15 minutos a 2000 a 3000 × g (RCF) para separar o plasma e os glóbulos vermelhos.
4. Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma de modo algum antes da colheita. Tomar cuidado, em todos os momentos, para não perturbar o material na superfície do gel.



Etapa 2 – ELISA IFN- γ

1. Coloque os componentes do ELISA, à exceção do Concentrado 100x de Conjugado, à temperatura ambiente durante, no mínimo, 60 minutos.
2. Reconstitua o padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou desionizada. Prepare 4 diluições padrão.
3. Reconstitua o Concentrado 100x de Conjugado liofilizado com água destilada ou desionizada.
4. Prepare conjugado funcional em Diluente Verde e adicione 50 μ l a todos os poços.
5. Adicione 50 μ l de amostras de plasma para teste (não diluídas e diluições 1:10 e 1:100 conforme adequado) e 50 μ l de padrão aos poços adequados. Misture utilizando um agitador.
6. Incube durante 120 \pm 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Lave os poços, no mínimo, 6 vezes com 400 μ l/poço de tampão de lavagem.
8. Adicione 100 μ l de solução de substrato de enzimas aos poços. Misture utilizando um agitador.
9. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.
10. Adicione 50 μ l de solução de paragem de enzimas a todos os poços. Misture utilizando um agitador.
11. Leia os resultados a 450 nm com um filtro de referência de 620 a 650 nm.
12. Analise os resultados.



Notas

Alterações significativas

As alterações significativas da presente edição da bula do QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA estão resumidas na tabela abaixo:

Secção	Página	Alterações
Precauções	11	Novas informações de GHS
Precauções	12	Foram adicionadas instruções de segurança relativas a frascos que têm selo metálico.

Marcas registadas: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (Grupo QIAGEN); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLymph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Acordo de licenciamento limitado para o Kit QuantiFERON Monitor

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual, e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou optimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. Salvo em licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não presta qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringam os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados nem ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir ou facilitar quaisquer dos actos proibidos acima mencionados. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença actualizados, consulte www.qiagen.com.

© 2014 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

