



Março de 2023

# Instruções de utilização do QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus ELISA Kit



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Versão 1



Para utilização em diagnóstico in vitro

Para utilização com os QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus Blood Collection  
Tubes



622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha



1123669PT



# Conteúdo

Utilização prevista .....	5
Utilizador previsto .....	5
Descrição e princípio .....	6
Informações sobre agentes patogénicos .....	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 .....	14
Informações de segurança.....	14
Informações para casos de emergência .....	15
Precauções .....	16
Armazenamento e manuseamento de reagentes.....	18
Estabilidade na utilização .....	18
Reagentes reconstituídos e não utilizados.....	18
Armazenamento e manuseamento de espécimes .....	19

Protocolo: Executar o ELISA .....	20
Resultados (cálculos) .....	26
Geração de curva-padrão e valores da amostra .....	26
Controlo de qualidade do teste .....	28
Interpretação de resultados .....	30
Limitações .....	32
Características de desempenho .....	33
Estudos clínicos .....	33
Sensibilidade .....	35
Valores previstos .....	43
Resumo de segurança e desempenho .....	49
Características de desempenho do ensaio .....	50
Desempenho analítico .....	50
Eliminação .....	63
Referências .....	64
Guia de resolução de problemas .....	66
Símbolos .....	69
Anexo A: Informações técnicas .....	72
Resultados indeterminados .....	72
Amostras de plasma coaguladas .....	72
Amostras de plasma lipémicas .....	72
Apêndice B: Procedimento abreviado do teste ELISA .....	73
Informações de encomenda .....	75
Histórico de revisões do documento .....	77

## Utilização prevista

O ensaio QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) é um teste de diagnóstico *in vitro* que usa um cocktail de péptidos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10 para estimular células em sangue total heparinizado. A deteção do interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é utilizada para identificar respostas *in vitro* aos antígenos péptidos associados com a infeção por *Mycobacterium tuberculosis*.

O QFT-Plus é um teste indireto para infeção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e destina-se a utilização conjunta com a avaliação de riscos, radiografia e outras avaliações médicas e de diagnóstico.

## Utilizador previsto

Este kit destina-se a utilização profissional.

O ensaio QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) destina-se a ser utilizado por pessoal com a devida formação num ambiente de laboratório.

# Descrição e princípio

## Informações sobre agentes patogénicos

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por infeção por organismos do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, e *M. caprae*), que tipicamente se espalha para novos hospedeiros através de núcleo de gotículas transportado por via aérea a partir de pacientes com tuberculose pulmonar. Um indivíduo recém-infetado pode ficar doente com tuberculose em poucas semanas ou meses, mas a maioria dos indivíduos infetados permanece bem. A infeção tuberculosa latente (LTBI), uma doença não infecciosa assintomática, persiste em alguns, que poderão desenvolver tuberculose meses ou anos mais tarde. O principal objetivo de diagnosticar LTBI é o de considerar tratamento médico para prevenir a tuberculose. Durante mais de 100 anos, o teste cutâneo de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) foi o único método disponível para diagnosticar a LTBI (4). A sensibilidade cutânea à tuberculina desenvolve-se entre 2 a 10 semanas após a infeção. Contudo, alguns indivíduos infetados, incluindo aqueles com uma série de patologias que prejudiquem as funções imunitárias, mas também outros que não as tenham, não respondem à tuberculina. Por outro lado, alguns indivíduos com baixa probabilidade de estarem infetados com *M. tuberculosis* apresentam sensibilidade à tuberculina e denotam testes cutâneos de tuberculina (Tuberculin Skin Test, TST) positivos após a vacinação com bacilo Calmette-Guérin (BCG), infeção com outra micobactéria que não do complexo *M. tuberculosis*, ou por outros fatores indeterminados.

Deve distinguir-se a LTBI da tuberculose, uma doença de notificação obrigatória que normalmente envolve os pulmões e o trato respiratório inferior, embora outros sistemas orgânicos também possam ser afetados. A tuberculose é diagnosticada através de resultados de historial clínico, físico, radiológico e micobacteriano.

## Resumo e explicação

O teste QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) é a quarta geração na tecnologia de testes QuantiFERON-TB que avaliam a resposta mediada por células através de uma medição quantitativa de IFN- $\gamma$  numa amostra de sangue total. O QFT-Plus é um teste qualitativo que mede as respostas imunitárias mediadas por células (CMI) a antígenos péptidos que simulam proteínas micobacterianas. Estas proteínas, ESAT-6 e CFP-10, estão ausentes de todas as estirpes de BCG e da maioria das micobactérias não tuberculosas à exceção de *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1). Normalmente, os indivíduos infetados com organismos do complexo *M. tuberculosis* possuem linfócitos no sangue que reconhecem estes e outros antígenos micobacterianos. Este processo de reconhecimento envolve a produção e secreção da citocina IFN- $\gamma$ . A deteção e subsequente quantificação de IFN- $\gamma$  constitui a base deste teste.

Os testes cutâneos de tuberculina e os testes de IGRA são úteis, mas insuficientes para diagnosticar a infeção do complexo *M. tuberculosis* em pacientes doentes – um resultado positivo pode apoiar o diagnóstico de tuberculose, contudo, infeções de outras micobactérias (por ex., *M. kansasii*) também podem levar a resultados positivos. São necessárias outras avaliações clínicas ou de diagnóstico para confirmar ou excluir a tuberculose.

Os antígenos utilizados no QFT-Plus são um cocktail de péptidos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10. Vários estudos demonstram que estes antígenos péptidos estimulam a resposta de IFN- $\gamma$  nas células T de indivíduos infetados com *M. tuberculosis*, mas, normalmente não em pessoas não infetadas ou vacinadas com BCG, sem a doença ou risco de LTBI (1,2,6,9). Porém, os tratamentos médicos ou as doenças que prejudicam as funções imunitárias podem potencialmente reduzir as respostas de IFN- $\gamma$ . Os pacientes com certas infeções micobacterianas poderão também responder a ESAT-6 e CFP-10, uma vez que os genes que codificam estas proteínas estão presentes em *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1, 3,7).

A população a ser testada com os testes QFT-Plus são pacientes com tuberculose ativa confirmada clinicamente e pacientes com risco de infeção tuberculosa ou infeção tuberculosa latente (LTBI). Não se aplicam limitações de idade, género, etc.

Na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) as células T CD4<sup>+</sup> desempenham um papel fundamental no controlo imunológico através da secreção de citocina IFN- $\gamma$ . As evidências atuais suportam um papel das células T CD8<sup>+</sup> na defesa do hospedeiro contra a MTB produzindo IFN- $\gamma$  e outros fatores solúveis, que ativam macrófagos para suprimir o crescimento da MTB, destruir células infetadas ou lisar a MTB intracelular diretamente. Foram detetados IFN- $\gamma$  que produzem células CD8<sup>+</sup> específicas de MTB em indivíduos com LTBI e com TB ativa. Além disso, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos de ESAT-6 e CFP-10 são descritos como sendo detetados mais frequentemente em indivíduos com TB ativa comparativamente a infecção tuberculosa latente (LTBI) e podem estar associados a exposição recente a MTB (8, 10–12). Foram ainda detetadas células T CD8<sup>+</sup> específicas de MTB produtoras de IFN- $\gamma$  em indivíduos com TB ativa com coinfeção por HIV (13, 14) e em crianças com tuberculose (15).

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

Os fatores de risco da infecção por *M. tuberculosis* incluem indicadores históricos, médicos ou epidemiológicos da tuberculose ou exposição à doença. Consulte a orientação mais recente da OMS <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment> para obter recomendações detalhadas sobre o diagnóstico da infecção por *M. tuberculosis* (incluindo a doença) e sobre a seleção de pessoas para teste (16). O QFT-Plus foi testado em alguns grupos de pacientes indicados para o rastreio de infecção por TB de acordo com a orientação atual da OMS (16), incluindo: pessoas que testaram positivo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), contactos recentes de pacientes com TB e residentes em ambientes de altas concentrações que tenham sido expostos a adultos com alto risco de TB (5).



## Princípios do ensaio

O QFT-Plus é um ensaio qualitativo que utiliza tubos de colheita de sangue especializados com antígenos péptidos que simulam proteínas de *M. tuberculosis*, que são utilizados para recolher sangue total. A incubação do sangue ocorre em tubos durante 16 a 24 horas, após as quais o plasma é colhido e testado para presença de IFN- $\gamma$  produzido em resposta aos antígenos péptidos.

Em primeiro lugar, o sangue total é colhido para cada um dos QFT-Plus Blood Collection Tubes, que incluem um tubo Nil, um tubo TB1, um tubo TB2 e um tubo Mitogen. Em alternativa, o sangue pode ser colhido num único tubo de colheita de sangue que contenha heparina de lítio ou heparina de sódio como anticoagulante e, em seguida, transferido para QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Os QFT-Plus Blood Collection Tubes são agitados para misturar o antígeno com o sangue e devem, logo que possível, ser incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  no prazo de 16 horas após a colheita. Após um período de incubação de 16 a 24 horas, os tubos são centrifugados, o plasma é processado e a quantidade de IFN- $\gamma$  (UI/ml) é medida pelo ELISA. O QFT-Plus ELISA utiliza uma solução-padrão IFN- $\gamma$  humano recombinante que foi testada em relação a uma preparação de IFN- $\gamma$  de referência (Ref. NIH: Gxg01-902-535). Os resultados das amostras de teste são indicados em Unidades Internacionais por ml (UI/ml) relativamente a uma curva-padrão preparada testando a diluição da solução-padrão fornecida com o kit.

Anticorpos heterófilos (por ex., anticorpo anti-rato humano) em soro ou plasma de certos indivíduos são uma causa conhecida de interferência com imunoensaios. O efeito dos anticorpos heterófilos no QFT-Plus ELISA é minimizado pela adição de soro normal de rato no Green Diluent (diluinte verde) e a utilização de fragmentos de anticorpo monoclonal F(ab')<sub>2</sub> como o anticorpo de captura do IFN- $\gamma$  no revestimento dos poços de microplacas.

Um ensaio QFT-Plus é considerado positivo para uma resposta de IFN- $\gamma$  a qualquer dos tubos de antígeno de TB que esteja significativamente acima do valor Nil de IFN- $\gamma$  em UI/ml. A amostra de plasma do tubo Mitogen serve como um controlo positivo de IFN- $\gamma$  para cada espécime testado. Uma resposta baixa ao Mitogen (<0,5 UI/ml) indica um resultado indeterminado quando uma amostra de sangue tem também uma resposta negativa aos antígenos de TB. Este padrão pode ocorrer com linfócitos insuficientes, atividade reduzida dos linfócitos devido a manuseamento inadequado do espécime, enchimento/mistura do tubo Mitogen ou incapacidade de os linfócitos do paciente gerarem IFN- $\gamma$ . Níveis elevados de IFN- $\gamma$  na amostra de Nil podem ocorrer com a presença de anticorpos heterófilos ou para a secreção de IFN- $\gamma$  intrínseca. O tubo Nil ajusta-se aos efeitos de fundo (por ex., níveis elevados de IFN- $\gamma$  circulante ou presença de anticorpos heterófilos). O nível de IFN- $\gamma$  do tubo Nil é subtraído ao nível de IFN- $\gamma$  dos tubos de antígeno de TB e do tubo Mitogen. O intervalo de medição do QFT-Plus ELISA é de 10 UI/ml, no máximo.

# Materiais fornecidos

## Conteúdo do kit

<b>Componentes do ELISA</b>	<b>Kit de 2 placas</b>	<b>Pacote de laboratório de referência</b>
<b>N.º de catálogo</b>	<b>622120</b>	<b>622822</b>
Microplate Strips (Tiras da microplaca) (12 x 8 poços) revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$ humano murino	2 conjuntos de tiras da microplaca 12 x 8	20 conjuntos de tiras da microplaca 12 x 8
IFN- $\gamma$ Standard (Solução-padrão de IFN- $\gamma$ ) liofilizado (contém IFN- $\gamma$ humano recombinante, caseína bovina, timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (8 UI/ml quando reconstituído)	10 x frascos (8 UI/ml quando reconstituído)
Green Diluent (dilúente verde) (contém caseína bovina, soro normal de rato, timerosal a 0,01% p/v)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Conjugado concentrado 100x), liofilizado (HRP de anti-IFN- $\gamma$ humano murino, contém timerosal a 0,01%)	1 x 0,3 ml (quando reconstituído)	10 x 0,3 ml (quando reconstituído)
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampão de lavagem concentrado 20x) (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 de enzimas) (contém H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Tetrametilbenzidina 3,3', 5,5')	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solução de paragem de enzimas) (contém 0,5 M de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 x 15 ml	10 x 15 ml
<i>Instruções de utilização do QuantiFERON TB-Gold Plus ELISA Kit</i>	1	1

## Componentes do kit

### Controlos e calibradores

O QFT-Plus ELISA utiliza uma solução-padrão IFN- $\gamma$  humano recombinante que foi testada em relação a uma preparação de IFN- $\gamma$  de referência (Ref. NIH: Gxg01-902-535).

### Plataforma e software

O QFT-Plus Analysis Software é opcional e pode ser utilizado para analisar dados não processados e para calcular resultados. Está disponível para transferência em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Materiais necessários, mas não fornecidos

## Reagentes adicionais

- QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- Água desionizada ou destilada, 2 litros

## Consumíveis

- Tampa de placa para placa de 96 poços
- Opcional: Microtubos de 1 ml com tampas em suportes com formato de 96 poços, ou microplacas sem revestimento com vedações de plástico para armazenamento de plasma (22 pacientes/suporte ou placa)
- Reservas de reagente

## Equipamento\*

- Incubadora a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  (com ou sem  $\text{CO}_2$ )
- Pipetas de volume calibrado variável para fornecimento de  $10\ \mu\text{l}$  a  $1000\ \mu\text{l}$  com pontas descartáveis
- Pipeta multicanal calibrada, capaz de fornecer  $50\ \mu\text{l}$  e  $100\ \mu\text{l}$  com pontas descartáveis
- Agitador de microplacas com capacidade para velocidades entre 500 e 1000 rpm
- Lavadora de microplacas (recomenda-se a utilização de uma lavadora de placas automática para garantir a segurança no manuseamento de amostras de plasma)
- Leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e filtro de referência de 620 nm a 650 nm
- Vórtex de velocidade variável
- Centrífuga capaz de centrifugar os tubos de colheita de sangue até, pelo menos, 3000 RCF (g)
- Proveta graduada, 1 ou 2 litros

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

## Avisos e precauções

Tenha em atenção que poderá ser necessário consultar os regulamentos locais para comunicar incidentes graves, que possam ocorrer em relação ao dispositivo, ao fabricante e/ou ao representante autorizado e à autoridade reguladora do local onde o utilizador e/ou paciente se encontram.

Para utilização em diagnóstico in vitro.

## Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheet, SDS) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF prático e compacto em [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a FDS de cada kit QIAGEN e respetivos componentes.

- Os espécimes e as amostras são potencialmente infecciosos. Elimine os resíduos de amostras e dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.
- Um resultado QFT-Plus negativo não exclui a possibilidade de infeção por *M. tuberculosis* ou de tuberculose: os falsos-negativos podem ocorrer devido ao estágio da infeção (por ex., espécime obtido antes do desenvolvimento da resposta imunitária celular), manuseamento incorreto dos tubos de colheita sanguínea após a punção venosa, execução incorreta do ensaio, ou outras variáveis imunológicas individuais, incluindo as relacionadas com quaisquer comorbidades. A produção de IFN- $\gamma$  não específico ou anticorpos heterófilos a partir de outras condições inflamatórias poderá mascarar respostas específicas aos péptidos do ESAT-6 ou do CFP-10.
- Um resultado QFT-Plus positivo não deve ser a base única ou definitiva para determinar a infeção por *M. tuberculosis*. A execução incorreta do ensaio pode causar resultados falsos-positivos do QFT-Plus.


- Um resultado QFT-Plus positivo deve ser seguido por uma avaliação médica mais aprofundada de tuberculose ativa (por ex., esfregaço e cultura de bacilos álcool-ácido resistentes, radiografia ao peito).
- Embora as proteínas ESAT-6 e CFP-10 estejam ausentes de todas as estirpes 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, dever-se-ão aplicar métodos alternativos.
- Um resultado falso-negativo do QFT-Plus pode resultar de uma colheita incorreta da amostra de sangue ou de um manuseamento inadequado do espécime, afetando a função dos linfócitos. Consulte "Protocolo: Executar o ELISA", página 20, para obter informações sobre o correto manuseamento de amostras de sangue. O atraso na incubação pode levar a resultados indeterminados ou falsos-negativos, e outros parâmetros técnicos podem afetar a capacidade de detecção de uma resposta significativa do IFN- $\gamma$ .

## Informações para casos de emergência

CHEMTREC

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

## Precauções

<p><b>CUIDADO</b></p> 	<p>Manuseie o sangue humano como se se tratasse de sangue potencialmente infeccioso.</p> <p>Cumpra todas as diretrizes relevantes para o manuseamento de sangue. Elimine as amostras e os materiais que entrem em contacto com sangue ou respetivos produtos em conformidade com a legislação local.</p>
---	--

### QuantifERON Enzyme Stopping Solution



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

### QuantifERON Enzyme Substrate Solution

Aviso! Provoca uma ligeira irritação da pele. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

### QuantifERON Green Diluent



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

### QuantifERON Wash Buffer 20x Concentrate

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](http://www.qiagen.com/safety)

- O timerosal é utilizado como um conservante em alguns reagentes do QFT-Plus. Pode ser tóxico em caso de ingestão, inalação ou contacto com a pele.
- Divergências em relação às *Instruções de utilização do QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus)* podem produzir resultados errados. Leia as instruções cuidadosamente antes da utilização.
- Não utilize o kit se qualquer um dos frascos de reagente apresentar sinais de dano ou fuga antes da utilização.
- **Importante:** Inspeccione os frascos antes da utilização. Não utilize os frascos de conjugado ou de solução-padrão de IFN- $\gamma$  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. Recomenda-se a utilização de um dispositivo próprio para abrir os frascos de conjugado ou de solução-padrão de IFN- $\gamma$ , para minimizar o risco de ferimentos com a tampa metálica.
- Não misture nem utilize as tiras da microplaca, a solução-padrão de IFN- $\gamma$ , o Green Diluent (diluyente verde) ou o conjugado concentrado 100x de diferentes lotes de kits QFT-Plus. Os outros reagentes (tampão de lavagem concentrado 20x, 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 em vigor.
- Não utilize o QFT-Plus ELISA Kit após o prazo de validade.
- É necessário cumprir sempre os procedimentos laboratoriais corretos.
- Certifique-se de que o equipamento laboratorial, por ex., as lavadoras e os leitores de placas, se encontra calibrado/validado para utilização.

# Armazenamento e manuseamento de reagentes

Devem ser observados os prazos de validade e as condições de armazenamento impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilize componentes fora do prazo de validade ou armazenados de forma incorreta.

## Estabilidade na utilização

- Armazene o kit ELISA a 2–8 °C.
- Mantenha a solução de substrato de enzimas sempre protegida da luz solar direta.

## Reagentes reconstituídos e não utilizados

- Para obter instruções sobre como reconstituir os reagentes, consulte "Protocolo: Executar o ELISA", página 20.
- A solução-padrão reconstituída do kit pode ser guardada durante um máximo de 3 meses, se armazenada entre 2–8 °C.

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

- O conjugado concentrado 100x reconstituído tem de ser novamente armazenado entre 2–8 °C e também 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 no prazo de 6 horas após a preparação.
- O tampão de lavagem funcional pode ser armazenado à temperatura ambiente durante um máximo de 2 semanas.
- As tiras da microplaca são apenas de utilização única. As tiras não utilizadas podem ser removidas da estrutura da placa e armazenadas para utilizar futuramente.

## Armazenamento e manuseamento de espécimes

Consulte as *Instruções de utilização dos QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes* (1123668) para obter detalhes sobre o fluxo de trabalho de colheita de sangue para o teste QFT-Plus.

# Protocolo: Executar o ELISA

## Pontos importantes antes de começar

### Configuração (tempo necessário para executar o ensaio)

- De forma a obter resultados válidos do ensaio QFT-Plus, o operador precisa de executar tarefas específicas dentro de tempos definidos. Antes da utilização do ensaio, recomenda-se que o operador planeie cuidadosamente cada fase do ensaio para permitir o tempo adequado para cada fase. O tempo necessário é estimado abaixo; o tempo de teste de várias amostras quando em lote também é indicado.
  - Aproximadamente 3 horas para uma placa do ELISA
  - <1 hora de trabalho
  - Adicionar 10 a 15 minutos para cada placa extra

### IFN- $\gamma$ ELISA

- Consulte "Conteúdo do kit" (Conteúdos dos kits), página 11, e Materiais necessários, mas não fornecidos (Materiais necessários, mas não fornecidos), página 13, para saber quais os materiais necessários para executar o ELISA.

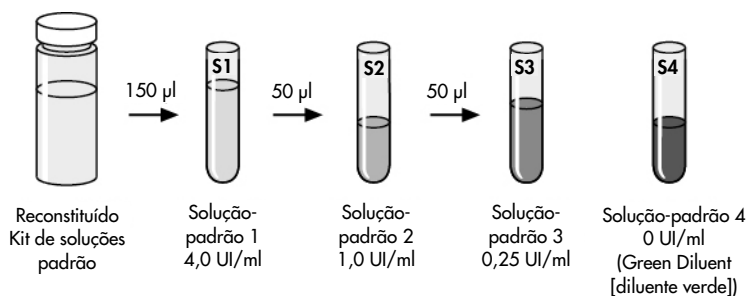
### Procedimento

1. Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o conjugado concentrado 100x, têm de ser colocados à temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) antes de serem utilizados. Aguarde, no mínimo, 60 minutos para alcançar o equilíbrio térmico.
2. Remova da estrutura as tiras de placa do ELISA que não são necessárias, sele a bolsa de alumínio e volte a colocar no frigorífico para conservação até serem necessárias.

3. Deixe, pelo menos, 1 tira para as soluções-padrão QFT-Plus e tiras suficientes para o número de indivíduos a serem testados (consulte a Figura 2 para obter o formato recomendado da placa). Após a utilização, conserve a estrutura e a tampa para utilizar com as tiras restantes.
  - 3a. Reconstitua a solução-padrão IFN- $\gamma$  com o volume de água desionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco. Misture suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir que todo o conteúdo do frasco é completamente dissolvido. A reconstituição da solução-padrão de IFN- $\gamma$  com o volume correto produzirá uma solução com uma concentração de 8,0 UI/ml.
  - 3b. Utilizando a solução-padrão reconstituída, prepare uma série de diluição de 4 concentrações de IFN- $\gamma$  (consulte a Figura 1).
  - 3c. Deverá ser gerada uma curva-padrão com as seguintes concentrações de IFN- $\gamma$ :
    - 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 diluente verde [Green Diluent, GD]).
  - 3d. As soluções-padrão têm de ser testadas, pelo menos, em duplicado.
  - 3e. Prepare novas diluições da solução-padrão do kit para cada sessão do ELISA.

### Procedimento

A	Rotular os 4 tubos: S1, S2, S3, S4
B	Adicionar 150 $\mu$ l de GD a S1, S2, S3, S4
C	Adicionar 150 $\mu$ l da solução-padrão do kit a S1 e misturar bem
D	Transferir 50 $\mu$ l de S1 para S2 e misturar bem
E	Transferir 50 $\mu$ l de S2 para S3 e misturar bem
F	Apenas GD serve como solução-padrão zero (S4)



**Figura 1. Preparação da série de diluição da curva-padrão.**

4. Reconstitua o conjugado concentrado 100x liofilizado com 0,3 ml de água desionizada ou destilada. Misture suavemente para minimizar a formação de espuma e garantir que todo o conteúdo do frasco é completamente dissolvido.
  - 4a. O conjugado funcional é preparado diluindo a quantidade necessária de conjugado concentrado 100x reconstituído em Green Diluent [diluyente verde] (Tabela 1).
  - 4b. O conjugado funcional deve ser utilizado no prazo de 6 horas após a preparação.
  - 4c. Volte a colocar qualquer Conjugado Concentrado 100x não utilizado entre 2 e 8 °C imediatamente após a utilização.

Tabela 1. Preparação de conjugado (funcional)

Número de tiras	Volume de conjugado (concentrado 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 de sangue e subsequentemente armazenadas (refrigeradas ou congeladas), misture bem a amostra armazenada antes de adicionar ao poço ELISA. As amostras de plasma podem ser armazenadas em QFT-Plus Blood Collection Tubes centrifugados durante um máximo de 28 dias a 2–8 °C. As amostras de plasma colhidas podem ser armazenadas durante um máximo de 28 dias a 2–8 °C. As amostras de plasma colhidas também podem ser armazenadas abaixo de –20 °C (preferencialmente até –70 °C) durante períodos prolongados.

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

Importante: Se pretender transferir as amostras de plasma diretamente a partir dos QFT-Plus Blood Collection Tubes centrifugados, deve evitar misturar, seja de que forma for, o plasma. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.

6. Adicione 50 µl de conjugado funcional recém-preparado a cada poço da placa do ELISA.

7. Adicione 50 µl de amostra de plasma para teste aos poços adequados (consulte o esquema recomendado da placa do ELISA na Figura 2).
8. Por fim, adicione 50 µl de cada solução-padrão 1 a 4 aos poços da placa adequados (consulte o esquema recomendado da placa do ELISA na 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. Esquema recomendado da placa do ELISA.** S1 (Solução-padrão 1), S2 (Solução-padrão 2), S3 (Solução-padrão 3), S4 (Solução-padrão 4). 1N (Amostra 1. Plasma de controlo de Nil), 1 TB1 (Amostra 1. Plasma de TB1), 1 TB2 (Amostra 1. Plasma de TB2), 1 M (Amostra 1. Plasma de Mitogen).

9. Cubra a placa do ELISA com uma tampa e misture bem o conjugado e as amostras de plasma/soluções-padrão, utilizando um agitador de microplacas durante 1 minuto entre 500 a 1000 rpm. Evite salpicos.
10. Cubra a placa do ELISA com uma tampa e incube à temperatura ambiente ( $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante  $120 \pm 5$  minutos. Durante a incubação, a placa do ELISA não deve ser exposta à luz solar direta. Desvios do intervalo de temperaturas especificado podem dar origem a resultados errados.
11. Durante a incubação da placa do ELISA, prepare o tampão de lavagem funcional. Dilua uma parte do tampão de lavagem concentrado 20x com 19 partes de água desionizada ou destilada, e misture bem. É fornecido tampão de lavagem concentrado 20x suficiente para preparar 2 litros de tampão de lavagem funcional.



12. Assim que a incubação da placa do ELISA estiver concluída, lave os poços da placa do ELISA com 400 µl de tampão de lavagem funcional. Execute o passo de lavagem, no mínimo, 6 vezes. Por questões de segurança, recomenda-se a utilização de uma lavadora de placas automática durante o manuseamento de amostras de plasma.

A 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 até ao topo do poço em cada um dos ciclos de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo.

Deve ser adicionado desinfetante normal de laboratório ao reservatório de efluente, e devem ser seguidos os procedimentos estabelecidos para a descontaminação de material potencialmente infeccioso.

13. Bata na placa do ELISA, virada para baixo sobre uma toalha absorvente (com libertação reduzida de pelos), para remover o tampão de lavagem residual. Adicione 100 µl de solução de substrato de enzimas a cada poço da placa, cubra a placa com uma tampa e misture bem durante 1 minuto a 500–1000 rpm, utilizando um agitador de microplacas.
14. Cubra a placa do ELISA com uma tampa e incube à temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos. Durante a incubação, a placa do ELISA não deve ser exposta à luz solar direta.
15. Após a incubação de 30 minutos, adicione 50 µl da solução de paragem de enzimas a cada poço da placa, pela mesma ordem de adição do substrato, e misture bem entre 500 a 1000 rpm, utilizando um agitador de microplacas.
16. Meça a densidade ótica (Optical Density, OD) dos poços da placa do ELISA no prazo de 5 minutos após a paragem da reação, utilizando um leitor de microplacas equipado com um filtro de 450 nm e com um filtro de referência de 620 nm a 650 nm. Os valores de OD são utilizados para calcular os resultados.

## Resultados (cálculos)

O QFT-Plus Analysis Software pode ser utilizado para analisar dados não processados e para calcular resultados. Está disponível em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Certifique-se de que é utilizada a versão mais recente do QFT-Plus Analysis Software.

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 em "Interpretação de resultados" (Interpretação dos resultados), página 30. O software indica todas as concentrações superiores a 10 UI/ml como ">10", uma vez que esses valores ultrapassam o intervalo linear validado do ELISA.

Como alternativa à utilização do QFT-Plus Analysis Software, é possível determinar os resultados segundo o seguinte método.

### Geração de curva-padrão e valores da amostra

#### Se o QFT-Plus Analysis Software não for utilizado

A determinação da curva-padrão e dos valores da amostra UI/ml requer um programa de folhas de cálculo, como o Microsoft® Excel®, se não for utilizado o QFT-Plus Analysis Software.

#### Utilização de um programa de folhas de cálculo

1. Determine os valores médios de OD das réplicas de solução-padrão do kit de cada placa.
2. Construa uma curva-padrão de  $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ , traçando o  $\log_{(e)}$  da OD média (eixo Y) em função do  $\log_{(e)}$  da concentração de IFN- $\gamma$  das soluções-padrão em UI/ml (eixo X), omitindo destes cálculos a solução-padrão zero. Calcule a linha de correlação da curva-padrão através de análise de regressão.

3. Utilize a curva-padrão para determinar a concentração de IFN- $\gamma$  (UI/ml) de cada uma das amostras de plasma do teste, utilizando o valor de OD de cada amostra.
4. Estes cálculos podem ser efetuados utilizando pacotes de software disponibilizados com os leitores de microplacas e com o software padrão de folha de cálculo ou estatístico (tal como o Microsoft Excel). Recomendamos que sejam utilizados estes pacotes para calcular a análise de regressão, o coeficiente de variação (Coefficient of Variation, %CV) das soluções-padrão e o coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva-padrão.

## Cálculo da amostra

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

Tabela 2. Curva-padrão

Solução-padrão	UI/ml	Valores a e b de OD	OD média	%CV	$\log_{10}$ UI/ml	$\log_{10}$ médio (Optical Density, 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. Este valores são utilizados na equação  $X = (Y-c)/m$  para obter o valor de X. Com base na curva-padrão, o coeficiente de correlação calculado é ( $r$ ) = 1,000. NA: Não aplicável.

A validade do ensaio é determinada utilizando os critérios especificados em "Controlo de qualidade do teste", página 28.

A curva-padrão (Tabela 2) é utilizada para converter as respostas de OD do antigénio para unidades internacionais (UI/ml).

Tabela 3. Cálculo da amostra

Antigénio	Valor de OD	Log <sub>(e)</sub> valor de OD	X	e <sup>x</sup> (UI/ml)	Antigénio – 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- $\gamma$  (em UI/ml) para TB1, TB2 e Mitogen são corrigidos quanto ao fundo ao subtrair o valor em UI/ml obtido pelo respetivo controlo Nil. Estes valores corrigidos são utilizados para a interpretação dos resultados do teste.

## Controlo de qualidade do teste

A exatidão dos resultados de teste está dependente da geração de uma curva-padrão precisa. Por conseguinte, os resultados derivados das soluções-padrão devem ser examinados antes de se poder interpretar os resultados das amostras do teste.

Para que o ELISA seja válido:

- O valor de OD média da Solução-padrão 1 tem de ser  $\geq 0,600$ .
- O %CV dos valores replicados da Solução-padrão 1 e da Solução-padrão 2 tem de 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 ótica da respetiva média.
- O coeficiente de correlação ( $r$ ) calculado a partir dos valores médios de absorvância das soluções padrão tem de ser  $\geq 0,98$ .
- Se os critérios acima não forem satisfeitos, a execução é inválida e tem de ser repetida.
- O valor de OD média da Solução-padrão zero (Green Diluent [diluyente verde]) deve ser  $\leq 0,150$ . Se o valor de OD média for  $> 0,150$ , o procedimento de lavagem da placa deverá ser investigado.

O QFT-Plus Analysis Software calcula e relata estes parâmetros de controlo de qualidade.

Cada laboratório deve determinar os tipos de materiais de controlo e a frequência de testes apropriados de acordo com a legislação em vigor ou outras organizações de acreditação aplicáveis. Devem ser considerados procedimentos externos alternativos de avaliação da qualidade e validação.

Nota: Os plasmas enriquecidos com IFN- $\gamma$  recombinante demonstraram reduções de até 50% na concentração quando armazenados tanto a 2–8 °C como –20 °C. O IFN- $\gamma$  recombinante não é recomendado para a definição de soluções padrão de controlo.

# Interpretação de resultados

Os resultados do QFT-Plus são interpretados utilizando os seguintes critérios (Tabela 4).

Importante: Diagnosticar ou excluir a tuberculose, e avaliar a probabilidade de infecção tuberculosa latente (Latent Tuberculosis Infection, LTBI), requer uma combinação de resultados epidemiológicos, históricos, médicos e de diagnóstico que devem ser tidos em conta ao interpretar os resultados de QFT-Plus. Consulte a orientação geral sobre o diagnóstico e tratamento de TB e LTBI:

(<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	Relatório/Interpretação
≤8,0	≥0,35 e ≥25% de Nil	Qualquer	Qualquer	Positivo <sup>†</sup>	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> provável
	Qualquer	≥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	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> IMPROVÁVEL
	<0,35 ou ≥0,35 e <25% de Nil	<0,35 ou ≥0,35 e <25% de Nil	<0,50	Indeterminado <sup>‡</sup>	Não é possível determinar a probabilidade de infecção por <i>M. tuberculosis</i>
> 8,0 <sup>§</sup>	Qualquer				

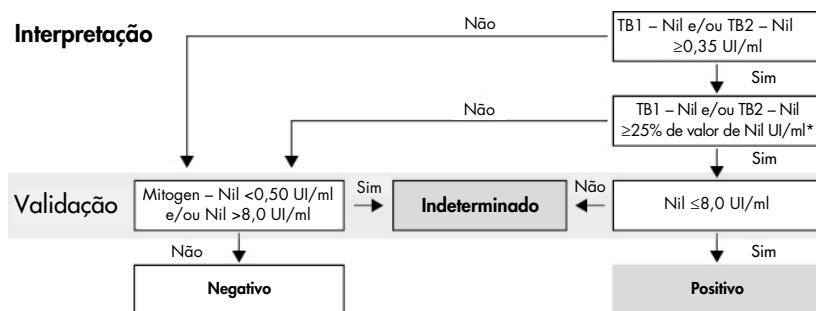
\* Respostas ao controlo positivo de Mitogen (e, ocasionalmente, de antígeno de TB) podem ficar fora do alcance do leitor de microplacas. Isto não tem qualquer impacto nos resultados do teste. Os valores >10 UI/ml são indicados pelo software QFT-Plus como >10 UI/ml.

<sup>†</sup> Quando não houver suspeitas 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 o teste de repetição de um ou mais duplicados for positivo, o resultado do teste é considerado positivo.

<sup>‡</sup> Consulte a secção “Guia de resolução de problemas” (Guia de resolução de problemas), página 66, para saber quais são as causas prováveis.

<sup>§</sup> Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos indivíduos possuíam níveis de IFN-γ >8,0 UI/ml do valor de Nil.

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



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

## Limitações

Os resultados dos testes QFT-Plus têm de ser utilizados em conjunto com o historial epidemiológico, o estado clínico atual e outras avaliações de diagnóstico de cada um dos indivíduos.

Os indivíduos com valores de Nil superiores a 8 UI/ml são classificados como "Indeterminado", uma vez que uma resposta 25% mais elevada aos antígenos de TB pode ficar fora do intervalo de medição do ensaio.

- O valor preditivo de um resultado positivo do QFT-Plus no diagnóstico de infeção por *M. tuberculosis* depende da probabilidade da infeção, que é avaliada por indicadores históricos, epidemiológicos, de diagnóstico e outras descobertas.
- Um diagnóstico de LTBI requer que a tuberculose seja excluída da avaliação médica a incluir uma avaliação dos testes médicos e de diagnóstico atuais para a doença mencionada.
- Um resultado negativo tem de ser considerado com os dados médicos relevantes e o historial clínico do indivíduo para a probabilidade de infeção por *M. tuberculosis* e potencial risco de progredir para a doença de tuberculose, particularmente para indivíduos com função imunitária comprometida.

Podem ocorrer resultados duvidosos ou indeterminados devido a:

- Desvios do procedimento descrito nas Instruções de utilização
- Transporte/manuseamento incorreto de amostras de sangue
- Níveis elevados de IFN- $\gamma$  em circulação ou presença de anticorpos heterófilos
- Ultrapassagem dos tempos de sangue validados desde a colheita de sangue até à incubação. Consulte as *Instruções de utilização dos QFT-Plus Blood Collection Tubes* (1123668).



# Características de desempenho

## Estudos clínicos

Uma vez que não existe um teste padrão definitivo para confirmar ou excluir o diagnóstico de infecção por LTBI, não é possível avaliar, na prática, uma estimativa de sensibilidade e especificidade para o QFT-Plus. A especificidade do QFT-Plus foi calculada de forma aproximada, avaliando as taxas de falsos-positivos em pessoas com baixo risco (sem fatores de risco conhecidos) de infecção por tuberculose. A sensibilidade foi calculada de forma aproximada, avaliando os grupos de indivíduos de estudo com TB ativa confirmada por cultura. Para além disso, o desempenho do ensaio foi avaliado quanto às taxas positivas e negativas numa 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 avalia a especificidade clínica do QFT-Plus que incluiu 733 indivíduos de estudo que foram considerados ter um risco baixo de infecção por *M. tuberculosis* ou nenhum fator de risco de exposição à infecção ou à doença. As informações demográficas e os fatores de risco de exposição a TB foram determinados utilizando um inquérito padronizado aquando do teste. O estudo foi conduzido em quatro locais independentes, incluindo um nos Estados Unidos, dois no Japão e um na Austrália. O teste de QFT-Plus foi comparado com o teste QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). Na Tabela 5 é possível observar um resumo dos dados de desempenho de especificidade clínica, estratificado por local do estudo e região. Os resultados de desempenho são baseados no número total de testes válidos. Não ocorreram resultados indeterminados.

Tabela 5. Especificidade do QFT-Plus numa 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									
(#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									
(#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)
(#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 no 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									
(#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 global 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 global do QFT foi de 98,09% (719/733).

A distribuição dos resultados por tipo de tubo de antígeno de TB e respectivas combinações é apresentada para servir como exemplo dos resultados esperados numa população de baixo risco (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados do estudo de especificidade do QFT-Plus por tubo de antígeno de TB

<b>Interpretação com base em antígeno-Nil da TB</b>				
<b>UI/ml em</b>	<b>TB1</b>	<b>TB2</b>	<b>QFT-Plus (positivo para TB1 e/ou TB2)*</b>	<b>TB1 e TB2 positivos para concordante (análise alternativa)†</b>
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 num valor de antígeno – Nil de TB  $\geq 0,35$  UI/ml em ambos (TB1 e TB2) ou qualquer um dos tubos de TB para se encaixarem nos critérios de interpretação do QFT-Plus (TB1 ou TB2) a serem determinados positivos.

† Análise alternativa fornecida apenas para informação.

Nos indivíduos com baixo risco de infeção por TB, um total de 20/733 obteve um resultado positivo. Destes, apenas oito indivíduos obtiveram um valor de  $>0,35$  UI/ml em ambos os tubos TB1 e TB2. Os ensaios QFT e QFT-Plus foram comparados no grupo de baixo risco e essa comparação mostrou uma concordância geral de 97,5% (715/733) e uma concordância na percentagem de negativos de 98,3% (707/719).

## Sensibilidade

Embora não exista um teste padrão definitivo para LTBI, um substituto adequado é a cultura microbiológica de *M. tuberculosis*, uma vez que a infeção por TB é um precursor necessário para a doença.

Foi realizado um estudo multicêntrico que avaliou a sensibilidade clínica do QFT-Plus e incluiu 434 indivíduos de estudo que apresentaram sinais e sintomas da doença de *M. tuberculosis* ativa, confirmada através de cultura e/ou PCR, e não se encontravam a fazer tratamento para TB nem com  $\leq 14$  dias de tratamento antes da colheita de sangue. O estudo foi realizado em sete locais independentes, incluindo três nos Estados Unidos, três no Japão e um na Austrália. O teste de QFT-Plus foi comparado com o teste QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT). Na Tabela 7 é possível observar um resumo dos dados de desempenho de sensibilidade clínica, estratificado por local do estudo e país. Os resultados de desempenho são baseados no número total de testes válidos. A frequência de resultados indeterminados do QFT e do 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 global

Local	N	Positivo		Negativo		Indeterminado		Sensibilidade (IC de 95%)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Estados Unidos									
(#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)
(#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)
(#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 nos 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									
(#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)
(#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)

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

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

Local	N	Positivo		Negativo		Indeterminado		Sensibilidade (IC de 95%)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(#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 no 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									
(#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 da 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 global 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 global do QFT foi de 94,81% (402/424).

A distribuição dos resultados por tipo de tubo de antigénio de TB e de combinações de tubos é apresentada para servir como exemplo dos resultados esperados numa população com infeção por tuberculose confirmada (Tabela 8).

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

Interpretação com base em antígeno- Nil da TB em UI/ml			QFT-Plus (positivo para 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.

A comparação entre os ensaios QFT e QFT-Plus foi avaliada no grupo com TB ativa confirmada por cultura (grupos do estudo de sensibilidade) e essa comparação mostrou uma concordância geral de 95,9% e uma concordância na percentagem de positivos de 97,3% (391/402).

Tabela 9. Rácios de verossimilhança do QFT-Plus

Local*	Sensibilidade	Especificidade	LR+	LR-
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 por uma infecção por MTB (indivíduos com risco misto)

Um grupo de 601 indivíduos com fatores de risco misto para infecção por TB (por ex., positivo para HIV, historial de tratamento para TB ativa ou latente, exposição a um caso ativo de TB, estado do HCW, etc.) foi avaliado com ambos os testes QFT e QFT-Plus. Os fatores de risco foram identificados utilizando um inquérito padronizado e indivíduos que não apresentaram sintomas associados a TB ativa na altura do recrutamento. Os dados demográficos e os fatores de risco estão comunicados na Tabela 10. Nesta população, 68/601 (11,3%) dos indivíduos obteve um resultado positivo com o QFT-Plus, tendo uma concordância na percentagem de positivos (Positive Percent Agreement, PPA) de 98,44% e uma concordância na percentagem de negativos (Negative Percent Agreement, NPA) de 99,07% (Tabela 11). Neste grupo de 68 indivíduos positivos para o QFT-Plus, um total de 62 indivíduos revelaram-se positivos nos tubos TB1 e TB2, 2 indivíduos revelaram-se positivos apenas no tubo TB1 e 4 revelaram-se positivos apenas no tubo TB2. Não foram observados resultados indeterminados (0/601).



**Tabela 10. Dados demográficos e fatores associados ao risco de infecção por TB num grupo misto**

Total de indivíduos (601)		Número	Percentagem
Sexo	Masculino	539	89,7%
	Feminino	62	10,3%
Idade (anos)	Intervalo	18-70	–
	Média	46,7	–
Vacinação com BCG	Sim	15	2,5%
	Não	586	97,5%
HIV positivos ou testados positivo para vírus HTLV	Sim	12	2,0%
	Não	589	98%
Previamente diagnosticados com TB ativa	Sim	11	1,8%
	Não	590	98,2%
Teve um teste cutâneo de tuberculina (TST)/teste de Mantoux para TB positivo	Sim	47	7,8%
	Não	554	92,2%
Nunca foi tratado para TB ativa ou latente	Sim	35	5,8%
	Não	566	94,2%
Viveu, trabalhou, fez voluntariado (>1 mês) numa cadeia ou prisão	Sim	373	62,1%
	Não	228	37,9%
Viveu, trabalhou, fez voluntariado (>1 mês) num abrigo para sem-abrigos	Sim	525	87,4%
	Não	76	12,6%
Profissional de saúde	Sim	8	1,3%
	Não	593	98,7%
Contacto próximo com alguém com suspeitas de TB ativa ou com a mesma já confirmada	Sim	9	1,5%
	Não	592	98,5%

**Tabela 11. Resumo do desempenho do QFT-Plus versus o QFT em indivíduos com fatores de risco conhecidos para infecções por TB latente**

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

\*Todas as seis amostras discordantes tinham níveis de IFN- $\gamma$  dos tubos de antígeno de TB que se aproximaram do cut-off do ensaio.

A concordância na percentagem de positivos (Positive Percent Agreement, PPA) e a concordância na percentagem de negativos (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 quando comparado com o teste QFT em indivíduos de estudo vacinados com BCG.

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

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

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

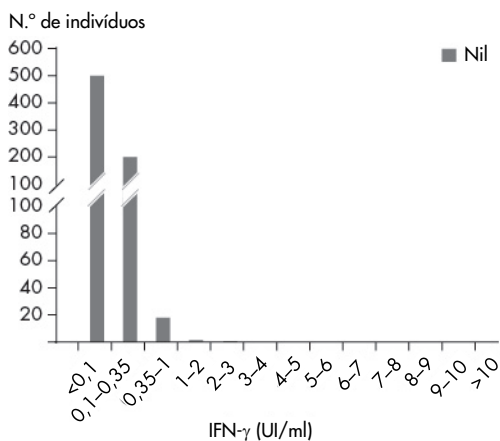
- PPA = 95,6% (66/69) IC de 95% (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2% (268/273) IC de 95% (95,79, 99,22)

## Valores previstos

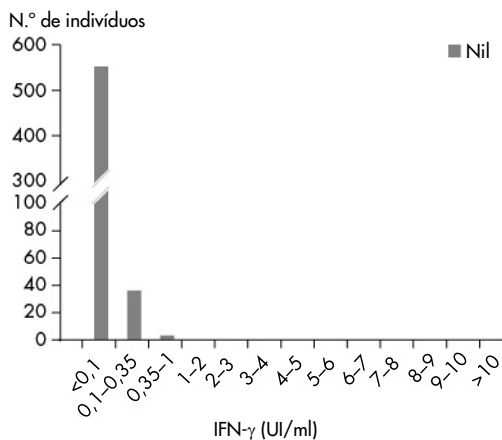
### Distribuições de respostas observadas — estratificadas por risco

Observou-se uma gama de respostas de IFN- $\gamma$  aos tubos TB1, TB2 e de controlo em ensaios clínicos, sendo as mesmas estratificadas por risco de infeção com *M. tuberculosis* (Figura 4 até à Figura 7). O grupo de risco misto consiste em indivíduos representativos de uma população de teste geral, incluindo indivíduos com e sem fatores de risco de exposição a TB, em que presença de tuberculose ativa é improvável (ou seja, infeção tuberculosa latente [Latent Tuberculosis Infection, LTBI]).

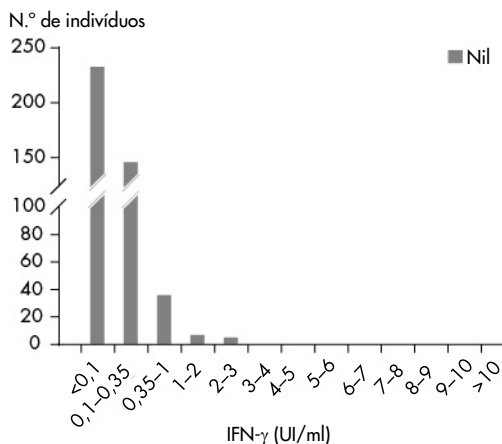
A



B

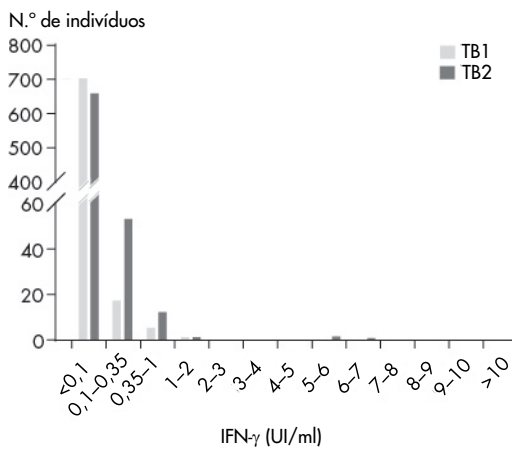


C

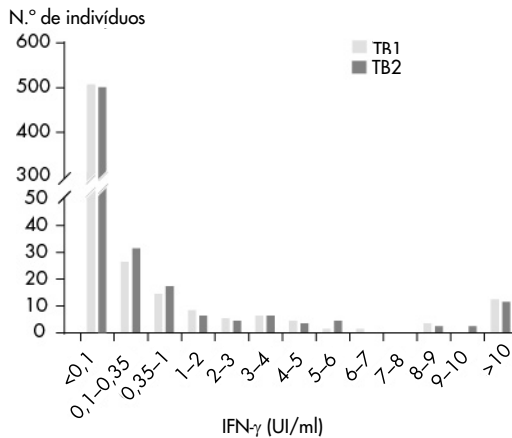


**Figura 4. Distribuição de Nil.** A Distribuição de valores de Nil em população de baixo risco (n = 744). B Distribuição de valores de Nil em população de risco misto (n = 601). C Distribuição de valores de Nil em população com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n=416).

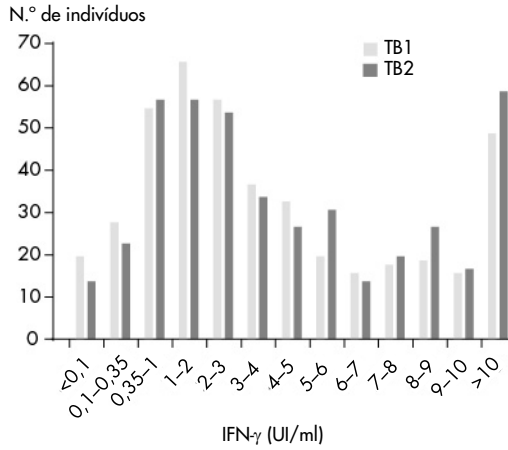
A



B

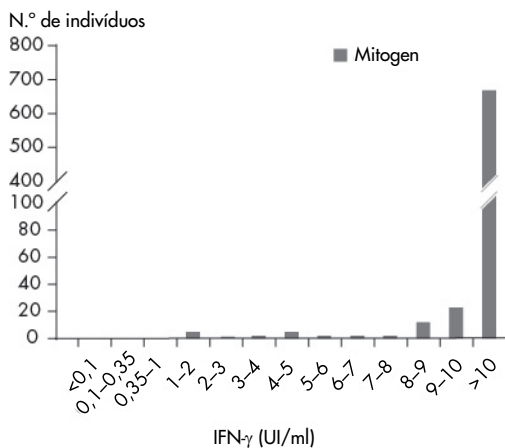


C

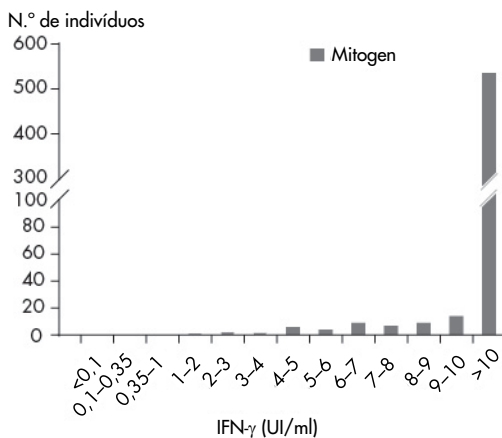


**Figura 5. Distribuição de TB1 e TB2 (Nil subtraído).** A Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em população de baixo risco (n = 744). B Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em população de risco misto (n = 601). C Distribuição de valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído) em população com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n=416).

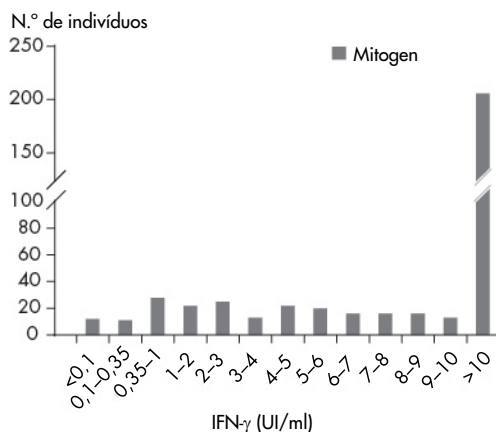
A



B

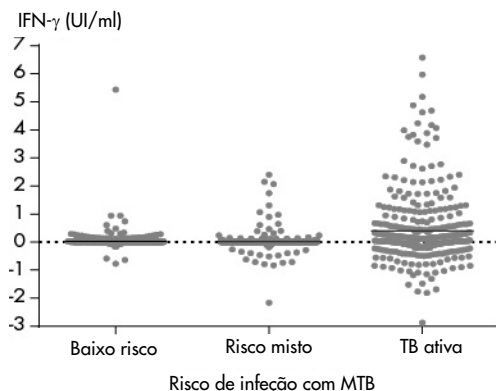


C



**Figura 6. Distribuição de Mitogen (Nil subtraído).** A Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em população de baixo risco (n = 744). B Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em população de risco misto (n = 601). C Distribuição de valores de Mitogen (Nil subtraído) em população com infecção por *M. tuberculosis* confirmada por cultura (n=415).





**Figura 7. Diferença observada entre valores de TB1 e TB2 (Nil subtraído), estratificados por risco.** Inclui dados do grupo de estudo de risco misto para mostrar as diferenças entre grupos de risco baixo, risco ativo e risco misto. Esta análise de dados incluiu um grupo de risco misto com fatores de risco conhecidos. Logo, do grupo de risco baixo  $n = 733$ , do grupo de risco misto  $n = 588$  e do grupo de TB ativa  $n = 357$ . A diferença quantitativa em UI/ml para cada indivíduo foi obtida ao subtrair o valor de TB1 do valor de TB2.

## Resumo de segurança e desempenho

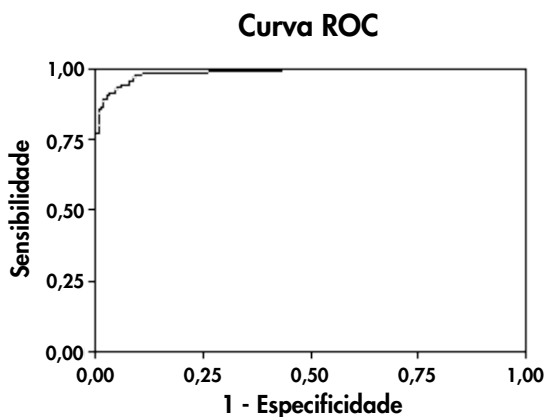
O resumo de segurança e desempenho pode ser encontrado no site da EUDAMED.

# Características de desempenho do ensaio

## Desempenho analítico

### Cut-off do ensaio

O cut-off do ensaio QFT-Plus foi determinado com dados de 216 indivíduos sem fatores de risco de exposição à TB identificados, que foram vacinados com BCG e assumidos como 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 com a análise ROC demonstraram que o cut-off ideal do ELISA foi 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 os vários cut-offs do ELISA**

Cut-off UI/ml IFN- $\gamma$	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

Continuação da tabela na página seguinte

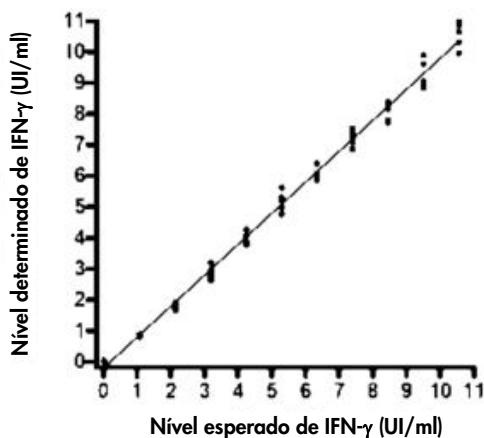
Continuação da tabela da página anterior

**Tabela 13. Valores de sensibilidade e especificidade para os vários cut-offs do ELISA**

Cut-off UI/ml IFN- $\gamma$	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 5 réplicas de 11 pools de plasma de concentrações conhecidas de IFN- $\gamma$  na placa do ELISA. A linha de regressão linear apresenta 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 esperada do pool elevado =  $-0,24 + 0,9964$ .**

## Reprodutibilidade

Foi realizado um estudo de reprodutibilidade multicêntrico para avaliar o desempenho do QFT-Plus entre locais de estudo com múltiplos operadores. Este foi um estudo prospectivo realizado em três locais de testagem externos e um local de colheita. Estavam inscritos um total de 32 e 34 indivíduos de estudo positivos e negativos, respectivamente, (determinados pelo teste de QFT). Os indivíduos de estudo eram profissionais de saúde nos Estados Unidos. Os indivíduos de estudo representaram grupos com risco misto de exposição à TB devido à sua profissão ou como profissionais de saúde nascidos num local estrangeiro com uma taxa de TB que excede os 50/100 000.

Três tubos de colheita de sangue de heparina de lítio foram colhidos de cada indivíduo de estudo no local de colheita. Os tubos de colheita de sangue de heparina de lítio foram, então, transferidos para cada um dos três locais de testagem onde foram aliqüotados em dois conjuntos de QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen e Nil) e, em seguida, foram testados de acordo com o procedimento do ensaio QFT-Plus. Em cada local, pelos menos dois operadores executavam dois testes por indivíduo de estudo de forma independente. Nenhum operador tinha conhecimento dos resultados obtidos pelo outro operador, nem do resultado do teste QFT do indivíduo de estudo.

Foram gerados seis resultados nos três locais de teste por cada um dos 66 indivíduos de estudo, o que resultou num total de 396 pontos de dados. É apresentado um resumo dos resultados do estudo de reprodutibilidade na Tabela 14.

**Tabela 14. Resumo dos resultados do estudo de reprodutibilidade – consoante a concordância na % dos resultados qualitativos entre operadores; 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 concordância na percentagem qualitativa em todos os locais de estudo é 94,7% (375/396). Neste cálculo, o número total de resultados de teste em concordância (375) inclui as instâncias onde existe uma concordância de todos os 6 resultados, concordância de 5 em 6 resultados, concordância de 4 em 6 resultados e concordância de 3 em 6 resultados, combinadas.

## Repetibilidade interlote

Foi realizado um estudo para determinar a variabilidade interlote dos QFT-Plus Blood Collection Tubes quando comparados com os tubos QFT. Foram testados um total de 30 indivíduos (15 confirmados positivos para TB e 15 confirmados negativos para TB, determinados pelo teste de QFT). Foram incluídos neste estudo três lotes separados de cada um dos QFT-Plus TB1, TB2 e QFT TB Blood Collection Tubes. Foram testadas três réplicas por dador por lote de tubos de colheita de sangue. Foram testados tubos de Nil e Mitogen com uma réplica cada.

O sangue de cada indivíduo foi colhido em tubos de colheita de sangue de heparina de lítio e, em seguida, 1 ml de sangue foi transferido para cada um dos QFT-Plus e QFT Blood Collection Tubes e testado de acordo com o procedimento de ensaio. Para cada grupo de amostras positivo e negativo, a variância total dos resultados do tubo do QFT-Plus não pode ser significativamente maior do que a variância total dos resultados do tubo do QFT. Isto foi determinado a partir do valor-p dado pelo teste de Levene da igualdade das variâncias (HOV). Se o valor-p não tiver sido significativo ( $p > 0,05$ ) e/ou a variação dos tubos do QFT-Plus TB foi inferior à do tubo do QFT TB, então, ocorreu uma variância entre os tubos do QFT-Plus e do QFT TB.

**Tabela 15. Comparação de variâncias entre os Blood Collection Tubes de TB do QFT-Plus e do QFT utilizando o teste HOV de Levene**

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

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

**Tabela 16. Desvio padrão para variações residuais e com intervalo de confiança de 95% para indivíduos positivos**

Tipo de amostra	Sub tipo	Estimativa do desvio padrão	LCL de 95%	UCL de 95%
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 intra-lote

Foi realizado um estudo para avaliar a reprodutibilidade intra-lote dos QFT-Plus Blood Collection Tubes ao comparar a concentração de IFN- $\gamma$  da réplica de sangue dos QFT-Plus TB Blood Collection Tubes.

Foram executadas seis alíquotas de uma amostra de sangue dos mesmos indivíduos com uma infecção por TB confirmada. Foram utilizadas seis repetições em tubos de colheita de sangue de um lote cada de ambos os tubos do QFT-Plus (TB1 e TB2). A testagem foi efetuada em 13 indivíduos. O %CV foi calculado para cada dador e por todos os dadores para gerar um %CV médio, tal como mostrado na Tabela 17.

**Tabela 17. O %CV para média, desvio padrão, mínimo, mediana e máximo em cada QFT-Plus TB Blood Collection Tube em indivíduos positivos para TB**

QFT-Plus Tube	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 %CV média para TB1 e TB2 foi de ~13%, cumprindo com os critérios de aceitação  $\leq 30\%$  e demonstrando repetibilidade intra-lote.

### Limite de branco (Limit of Blank, LoB)

O limite de branco (LoB) foi avaliado para o ensaio QFT-Plus. Duas réplicas, cada uma de 14 amostras de plasma humano individuais normais (os brancos), foram testadas com 2 lotes do QFT-Plus ELISA por 3 operadores em 3 dias de teste, um operador por dia de teste para um total de 84 réplicas de cada lote do kit ELISA.

Os valores de LoB (UI/ml) para os 2 lotes do kit ELISA foram calculados em separado, conforme apresentado na Tabela 18.

**Tabela 18. Valores de LoB (UI/ml) para os 2 lotes do QFT-Plus ELISA Kit**

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

O valor de LoB mais elevado, 0,040 UI/ml, em ambos os lotes do QFT-Plus ELISA Kit, foi relatado 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 ao combinar 14 amostras de plasma individuais. Cada um dos 3 operadores preparou um stock padrão de referência IFN- $\gamma$  a 1,0 UI/ml diluído em tampão. Foi efetuada uma série de diluição de 8 concentrações. O estudo foi realizado durante 3 dias, por 3 operadores que se alternavam, utilizando 2 lotes do QFT-Plus ELISA Kit. Para cada dia de teste, foram testadas 5 réplicas de cada concentração dentro de cada conjunto da série de diluição em sequência, para um total de 45 réplicas para cada diluição da concentração de IFN- $\gamma$  para cada lote do QFT-Plus ELISA Kit.

O valor de LoD para cada um dos lotes do QFT-Plus ELISA Kit testados foi calculado em separado, conforme apresentado na Tabela 19.

**Tabela 19. Valores de LoD estimados (UI/ml) para os 2 lotes do QFT-Plus ELISA Kit**

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

O valor de LoD mais elevado, 0,065 UI/ml, calculado em ambos os lotes do QFT-Plus ELISA Kit, foi relatado como o valor de LoD final.

### Substâncias interferentes

Foi realizado um estudo para determinar os efeitos de potenciais substâncias interferentes no desempenho da detecção do IFN- $\gamma$  do QFT-Plus ELISA. Os interferentes incluídos neste teste foram: triglicéridos (total), hemoglobina, proteína (soro total), bilirrubina (conjugada), bilirrubina (não conjugada), sulfato de abacavir, ciclosporina e prednisolona. Cinco pools de plasma com concentrações de IFN- $\gamma$  conhecidas foram preparados utilizando diferentes concentrações de interferentes. O nível de pool de IFN- $\gamma$  base foi preparado previamente com uma quantidade pré-determinada do IFN- $\gamma$  presente (aproximadamente 0,21, 0,45 e 1,4 UI/ml). Este pool foi então utilizado para preparar os pools de interferentes. As concentrações de interferentes testadas foram de 0 mg/dL, 5 mg/dL, 10 mg/dL, 15 mg/dL e 20 mg/dL. As concentrações de interferentes alvo foram baseadas em intervalos de referência, valores patológicos, intervalos terapêuticos e tóxicos, ou conforme recomendado pelo fornecedor ou níveis clínicos gerais. Foram testadas seis réplicas para cada nível de concentração da amostra interferente.

Para cada concentração da amostra, foi realizado um teste T de duas amostras, comparando a diferença em log<sub>10</sub> médio (UI/ml) do nível do interferente primário com o controle (ou seja, nível livre de interferentes), conforme apresentado na Tabela 20 e Tabela 21. A diferença estimada na resposta média, juntamente com os respectivos limites de confiança de 95% bilaterais e o valor p também foram relatados.

**Tabela 20. Log10 UI/ml: Tabela de resumo do teste T para as diferenças médias entre o controlo e o nível do interferente primário para cada nível de concentração de IFN- $\gamma$  e interferente**

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Variâncias	Diferença média	IC inferior a 95%	IC superior a 95%	Valor-p	Aprovado
Triglicéridos	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

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 20. Log10 UI/ml: tabela de resumo do teste T para as diferenças médias entre o controle e o nível do interferente primário para cada nível de concentração de IFN- $\gamma$  e interferente

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Variâncias	Diferença média	IC inferior a 95%	IC superior a 95%	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 médias entre o controlo e o nível do interferente elevado para cada nível de concentração de IFN- $\gamma$  e interferente**

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Variâncias	Diferença média	IC inferior a 95%	IC superior a 95%	Valor-p	Aprovado
Triglicéridos	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

Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela da página anterior

Tabela 21. Log10 UI/ml: tabela de resumo do teste T para as diferenças médias entre o controlo e o nível do interferente elevado para cada nível de concentração de IFN- $\gamma$  e interferente

Interferente	Nível de interferente	Concentração da amostra (UI/ml)	Variâncias	Diferença média	IC inferior a 95%	IC superior a 95%	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 significativas entre o nível do interferente primário e o controlo (nível livre de interferentes) e para o nível do interferente elevado, exceto para o nível de concentração de triglicéridos de 0,45 UI/ml. A diferença média foi determinada como estando dentro do intervalo de desvio-padrão de +/- 2. Isto demonstra que a diferença está dentro da variabilidade esperada do ensaio e que os triglicéridos não tiveram um efeito interferente no QFT-Plus ELISA.

## Eliminação

Cumpra todas as diretrizes relevantes para o manuseamento de sangue. Elimine as amostras e os materiais que entrem em contacto com sangue ou respetivos produtos em conformidade com a legislação local.

# 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 resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver quaisquer problemas que possam surgir. Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Apoio Técnico em [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) (para obter informações de contacto, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Comentários e sugestões

---

### Resolução de problemas ELISA

#### Desenvolvimento cromático não específico

- |  |   |
|--|---|
| a) Lavagem incompleta da placa   | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem, dependendo do dispositivo de lavagem que estiver a ser utilizado. Deve existir um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Contaminação cruzada dos poços ELISA                                    | Tome cuidado ao pipetar e misturar as amostras para minimizar os riscos.  |
| c) O prazo de validade do kit/dos componentes expirou                      | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de três meses a contar a partir da 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 QFT-Plus Blood Collection Tubes antes da colheita | Após a centrifugação, evite pipetar ou misturar o plasma, seja de que modo for, antes da colheita. Tenha sempre cuidado para não perturbar o material na superfície do gel.   |

## Comentários e sugestões

---

### Leituras de densidade ótica baixas para as soluções-padrão

- |   |  |
|---|--|
| a) Erro de diluição da solução-padrão                 | Certifique-se de que as diluições da solução-padrão do kit são preparadas corretamente conforme as presentes Instruções de utilização.   |
| 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 efetuada à temperatura ambiente ( $22 \pm 5$ °C).  |
| d) Tempo de incubação demasiado curto                 | A incubação da placa com o conjugado, com as soluções-padrão e com as amostras deve durar $120 \pm 5$ minutos. A solução de substrato de enzimas deve ser incubada na placa durante 30 minutos.                                    |
| e) Filtro incorreto de leitor de placas utilizado     | 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, excetuando o Conjugado concentrado 100x, têm de ser colocados à temperatura ambiente antes do início do ensaio. Isso leva, aproximadamente, 1 hora.  |
| g) O prazo de validade do kit/dos componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado antes da data de validade. Certifique-se de que a solução-padrão reconstituída e o conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de 3 meses a contar a partir da data de reconstituição. |

### Fundo elevado

- |                                |  |
|--------------------------------|--|
| a) Lavagem incompleta da placa | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/ poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem. Deve existir um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo. |
|--------------------------------|--|

## Comentários e sugestões

---















- |   |  |
|---|--|
| b) Temperatura de incubação demasiado elevada         | A incubação do ELISA deve ser efetuada à temperatura ambiente ( $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ).   |
| c) O prazo de validade do kit/dos componentes expirou | Certifique-se de que o kit é utilizado até à data de validade. Certifique-se de que a solução padrão reconstituída e o Conjugado concentrado 100x são utilizados dentro de três meses a contar a partir da 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

- |   |   |
|---|---|
| a) Lavagem incompleta da placa  | Lave a placa, no mínimo, 6 vezes com 400 µl/poço de tampão de lavagem. Poderão ser necessários mais de 6 ciclos de lavagem. Deve existir um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo. |
| b) Erro de diluição da solução-padrão   | Certifique-se de que as diluições da solução-padrão são preparadas corretamente conforme as presentes Instruções de utilização.   |
| c) Mistura mal efetuada   | 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 soluções-padrão deve ser efetuada de um modo contínuo. Todos os reagentes devem ser preparados antes de iniciar o ensaio.   |

# Símbolos

Os seguintes símbolos aparecem nas instruções de utilização ou na embalagem e nos rótulos:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Prazo de validade
	Este produto cumpre os requisitos do Regulamento europeu 2017/746 para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.
	Representante autorizado na Comunidade Europeia/União Europeia
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material (por ex., rotulagem do componente)
	Componentes
	Contém
	Número
	Número global de item comercial
	R refere-se à revisão das Instruções de utilização e n é o número da revisão
	Limitação de temperatura

## Símbolo

## Definição do símbolo



Fabricante



Consultar as instruções de utilização



Proteger da luz



Aviso/cuidado ou Cuidados, consultar a documentação adjunta

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

É um teste de diagnóstico in vitro que usa um cocktail de péptidos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10 para estimular células em sangue total heparinizado



Contém material biológico de origem animal



Contém material biológico de origem humana



Identificação única 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 com o estado imunitário do indivíduo testado (5), mas também com um número de fatores técnicos (por ex., armazenamento/manuseamento incorreto dos tubos de colheita de sangue, lavagem incompleta da placa do ELISA), caso as instruções de utilização anteriormente descritas não sejam seguidas.

Se suspeitar de problemas técnicos no armazenamento de reagente, na colheita de sangue ou no manuseamento das amostras sanguíneas, repita todo o teste QFT-Plus com novas amostras sanguíneas. É possível repetir o teste ELISA de plasmas estimulados no caso de suspeitar de lavagem inadequada ou de qualquer outro desvio processual ao teste ELISA. Os médicos podem optar por colher um novo espécime ou efetuar outros procedimentos conforme acharem adequado.

## 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.

## Amostras de plasma lipémicas

Deve ter-se cuidado ao pipetar amostras lipémicas, uma vez que os depósitos de gordura podem bloquear as pontas de pipeta.



## Apêndice B: Procedimento abreviado do teste ELISA

1. Eleve a temperatura dos componentes do ELISA até à temperatura ambiente, à exceção do conjugado concentrado 100x, durante pelo menos 60 minutos.

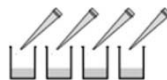


2. Reconstitua a solução-padrão do kit a 8,0 UI/ml com água destilada ou desionizada. Prepare quatro (4) diluições de solução-padrão.



3. Reconstitua o conjugado concentrado 100x liofilizado com água destilada ou desionizada.

4. Prepare conjugado funcional em Green Diluent [diluyente verde] e adicione 50 µl a todos os poços.



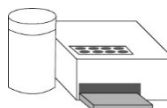
5. Adicione 50 µl de amostras de plasma de teste e 50 µl de soluções-padrão aos poços adequados. Misture utilizando um agitador.



6. Incube durante 120 minutos à temperatura ambiente.



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



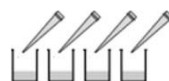
8. Adicione 100  $\mu$ l de solução de substrato de enzimas aos poços. Misture utilizando um agitador.



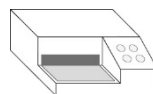
9. Incube durante 30 minutos à temperatura ambiente.



10. Adicione 50  $\mu$ 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.



# Informações de encomenda

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
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
<b>Related products</b>		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 tubos (50 de Nil, 50 de TB1, 50 de TB2 e 50 de Mitogen)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 tubos (25 de Nil, 25 de TB1, 25 de TB2 e 25 de Mitogen)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 tubos (1 de Nil, 1 de TB1, 1 de TB2 e 1 de Mitogen/pacote), pacote de 10	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 tubos (50 de Nil, 50 de TB1, 50 de TB2 e 50 de Mitogen)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 tubos (50 de Nil, 50 de TB1, 50 de TB2 e 50 de Mitogen)	623423
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Single Patient Pack	40 tubos (1 de Nil, 1 de TB1, 1 de TB2 e 1 de Mitogen/pacote), pacote de 10	623222

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidade específicas do produto, consulte as instruções de utilização do respectivo kit QIAGEN. As instruções de utilização do kit QIAGEN estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitadas aos Serviços de Assistência da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

## Histórico de revisões do documento

<b>Data</b>	<b>Alterações</b>
R2, junho de 2021	<p>Informação incluída sobre a Embalagem individual para paciente</p> <p>Tabelas 10 e 11 revistas para distinguir os dados do QFT-GIT e do QFT-Plus</p> <p>Secção de Descrição e princípio atualizada para ser adicionada informação sobre a população testada e o intervalo de medição</p> <p>Tabela 9 adicionada para acrescentar dados sobre o rácio de verosimilhança do QFT-Plus</p>
R3, outubro de 2021	<p>Número de catálogo revertido para os números de catálogo originais</p> <p>Declaração de utilização única adicionada para as tiras de microplaca nos conteúdos do kit</p>
R4, março de 2023	Correções de formatação

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

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

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

1. O produto deverá ser utilizado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com estas instruções de utilização e recorrendo à utilização exclusiva dos componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para utilizar ou incluir os componentes incluídos neste kit com quaisquer componentes não incluídos neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, nestas instruções de utilização e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://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 otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou a sua utilização ou utilizações não infrinjam os direitos de terceiros.
3. Este painel e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do painel concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas judiciais 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 atualizados, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group) Proclin®. Os nomes registados, as marcas comerciais etc., utilizados neste documento, mesmo quando não assinalados como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

03-2023 L1123669 1123669PT © 2023 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Assistência técnica [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)