



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS



AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE IMPLEMENTAÇÃO DE UM ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO INTERFERON-GAMA EM CENTROS DE RASTREAMENTO E DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO LATENTE POR *Mycobacterium tuberculosis* NO BRASIL

BRENDA KAROLINE SOUZA CARVALHO

MANAUS

2021



BRENDA KAROLINE SOUZA CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE IMPLEMENTAÇÃO DE UM ENSAIO DE
LIBERAÇÃO DO INTERFERON-GAMA EM CENTROS DE RASTREAMENTO
E DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO LATENTE POR *Mycobacterium
tuberculosis* NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas*.

Orientador (a): **Profª Dr. Allyson Guimarães da Costa**

Co-orientador (a): **Profª Dr. Marcelo Cordeiro dos Santos**

MANAUS

2021

FOLHA DE JULGAMENTO

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE IMPLEMENTAÇÃO DE UM ENSAIO
DE LIBERAÇÃO DO INTERFERON-GAMA EM CENTROS DE
RASTREAMENTO E DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO *Mycobacterium
tuberculosis* NO BRASIL**

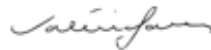
BRENDA KAROLINE SOUZA CARVALHO

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:



Prof. Allyson Guimarães da Costa, Dr.



Profª. Valéria Saraceni, Dra.



Profª. Aya Sadahiro, Dra.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus amados pais Inês Souza e Antônio Carlos, e minha irmã Letícia Karoline, minha base, minha fortaleza, meus amores incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde e sabedoria para que eu chegasse a este momento incrível na minha vida, pelos desafios e vitórias.

Aos meus amados pais Inês Souza e Antônio Carlos por estarem comigo, me apoiando em todos os momentos, pelo seu amor e amparo incondicional, obrigada por estarem sempre ao meu lado me incentivando a ser cada dia melhor. A confiança e o amor que vocês depositam em mim foram essenciais para que eu me tornasse quem sou hoje. Amo vocês!

A minha irmã Letícia, minha “filha” como costume chamá-la, por estar sempre comigo, tornando meus dias felizes, com sua alegria, por estar sempre me acompanhando nesta jornada de estudos, ficando comigo até altas horas, para não me deixar “sozinha”. Amo você, minha princesa!

Aos meu avôs Pedro Angelim e Antônio Carlos “vô Carlito”, por estarem sempre contente e orgulhosos de mim. As minhas avós Sebastiana (*in memoriam*) e Etelvina (*in memoriam*), que apesar de não estarem comigo fisicamente, estará sempre em meu coração, e sei que sempre tiveram muito orgulho de mim e sempre acreditaram que eu poderia almejar o que sempre desejei. Amo vocês!

Ao meu orientador, Dr. Allyson Costa, pelo exemplo de pesquisador, pelo exemplo de ser humano, meu professor, coordenador, orientador, amigo “Príncipe Allyson”. Por todos os conhecimentos compartilhados, por confiar em mim e no meu trabalho. Por estar sempre à disposição de ajudar no que fosse necessário. Serei grata eternamente, reizinho da imuno. Obrigada por todo o carinho.

Ao Dr. Marcelo Cordeiro, meu coorientador, pelo grandioso pesquisador que és, um dos mentores desse projeto. Agradeço por toda a oportunidade, ensinamentos ao longo desses anos, exemplo de pesquisador, agradeço por fazer parte desta equipe sensacional.

A Alexandra Brito, coordenadora do RePORT- Manaus, por todos os conhecimentos compartilhados. Em 2015 me entrevistou junto ao Dr. Marcelo e me deram a oportunidade de fazer parte desta equipe de excelentes profissionais.

A Amanda Araújo, que esteve neste processo de crescimento profissional comigo, inicialmente éramos duplas do laboratório, e depois nos tornamos amigas na vida pessoal. Obrigada por cada momento compartilhado, dias tensos, cansativos, tranquilos, e claro nossas saídas para o momento de diversão, pois ninguém é de ferro, né Princesa!? Amiga, agradeço por todo carinho, palavras amigas, apoio, obrigada por tudo!

A Bruna Loiola, que entrou na equipe de imunologia para fortalecer ainda mais o nosso grupo, e com seu jeitinho incrível de ser, logo nos tornamos amigas, e o que era dupla da imuno, virou trio da imuno, “princesas da imuno”. Amiga, obrigada por todo apoio dado a mim, sei o quanto torce pela minha felicidade. Grata por todos os dias compartilhados e por me aturar o tempo todo rsrs!

Ao Najibe, pela amizade construída ao longo desses anos, és uma pessoa incrível e inteligentíssima, um exemplo de profissional pra mim, obrigada por sempre estar disponível em me ajudar, as nossas reuniões via meet as 23h (risos) para discussão do projeto, escrita, artigo (dias de lutas e dias de glória)! Obrigada por todo o apoio, pode contar comigo sempre!

A equipe RePORT-Brasil, a base para que este projeto fosse realizado. Agradeço em especial a equipe Manaus, que me acolheu, acreditou que eu poderia superar os desafios, lembro-me que ao iniciar o projeto, tivemos que organizar todo o laboratório, em busca de equipamentos, insumos, elaboração de muitos POPs e protocolos, dias bem cansativos, que foram essenciais para minha experiência profissional.

A todo o grupo CIPEM (Centro Internacional de Pesquisa em Micobacterioses), por cada um que colaborou diretamente ou indiretamente para que eu conseguisse executar esse trabalho. Grata por todos os momentos de trabalho e de confraternizações.

A equipe MONSTER da Bahia, que se dispôs a nos ajudar, em especial ao Dr. Bruno e Mariana que nos auxiliaram na elaboração das figuras de excelente qualidade e com todo o cuidado e detalhes desta dissertação/artigo.

A Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HV), que permitiram condições para que este projeto fosse realizado. E a todos os funcionários que fizeram parte para que esta pesquisa fosse executada.

A coordenação do Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical (PPGMT) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) que sempre deram apoio em todos os momentos durante o meu mestrado. Em especial, a Dona Conceição e Iza, por toda paciência, ajuda e carinho sempre.

A todos os professores da PPGMT pelos ensinamentos repassados a mim e a todos os alunos, uma equipe de profissionais de excelência, que contribuíram muito na minha jornada acadêmica e profissional.

A Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de cursar o mestrado em Doença Tropicais e Infecciosas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo auxílio financeiro através da bolsa de mestrado.

Aos colegas da turma PPGMT 2018, pela companhia durante as disciplinas e as comemorações, todos vocês foram muito importantes para que essa caminhada acontecesse de uma maneira leve e divertida.

A minha amiga Stéphanie Mendes que sempre esteve comigo, me aconselhando, ajudando e acreditando em mim, com sábias palavras, me confortando em momentos difíceis ao longo desta caminhada. Grata por tudo!

A minha amiga Dana Monteiro por todos os momentos compartilhado, pela viagem, amizade desde minha época de Iniciação científica na Fiocruz, sempre esteve presente em minha vida, obrigada por todo carinho e apoio!

A todos os meus amigos que mesmo indiretamente contribuíram para que eu chegasse até este momento.

Agradeço o carinho de todos que me apoiaram nesta jornada!

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Ao National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID - U01-AI069923 e U01-AI115940) e Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) da Secretaria de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde (MS) do Brasil (25029.000507/2013-07), financiaram diretamente essa pesquisa.

O Programa de Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Programa de Pesquisa Intramural da Fundação José Silveira, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), respectivamente, financiaram indiretamente essa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), responsável pelo pagamento da bolsa que colaborou para a realização desse estudo.

EPÍGRAFE

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente”.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde, estima-se que 1,7 bilhão de pessoas, estejam infectadas com *M. tuberculosis*, não significando que todos os indivíduos vão desenvolver forma ativa da doença, mas estima-se que 5 a 10% dos indivíduos com ILTB se não tratados podem progredir pra doença ativa. O ensaio de liberação de interferon-gama (IGRA) para identificação de infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB), vem sendo descrita como um método alternativo para o teste tuberculínico disponível nas redes públicas de saúde, sendo o IGRA um teste mais específico. No entanto, o uso deste ensaio exige uma preparação e adaptação na rotina laboratorial. Um estudo piloto de implementação foi realizado na coorte multicêntrica do consórcio RePORT-Brasil entre 2016 e 2019 em três estados brasileiros. As informações laboratoriais sobre o processo de implementação foram avaliadas com a equipe dos laboratórios das unidades do RePORT-Brasil. Durante o processo de implementação, várias lacunas foram identificadas, mesmo seguindo todas as recomendações do fabricante do ensaio QFT-Plus. Inicialmente, os laboratórios identificaram problemas em relação à aquisição de equipamentos, reagentes e insumos. Os equipamentos tiveram que ser adquiridos através dos sites. Os kits QFT-Plus Tube e QFT-Plus ELISA foram importados e geraram problemas na logística de entrega aos centros participantes do estudo. O treinamento de técnicos de laboratório sem experiência em coleta, transporte e processamento de amostras, ELISA, teve aprendizado rápido, apesar de erros pré-analíticos terem sido identificados após o início do estudo. Assim, indicamos que a expansão do uso de IGRA, como o QFT-Plus, deve ser bem planejada, com negociações com o fabricante quanto à logística de entrega dos kits em áreas de difícil acesso. Além disso, as configurações de coleta, transporte e processamento da amostra devem ser avaliadas, com o objetivo de mitigar erros pré-analíticos que possam interferir nos resultados dos testes. A formação de técnicos de laboratório é extremamente importante, uma vez que a formação regular das partes interessadas desenvolve um sentido de responsabilidade para a comunicação de não conformidades e a comunicação de dados laboratoriais de qualidade semestral contribui para a melhoria da rotina após a implementação. Por fim, acreditamos que os resultados obtidos neste estudo podem auxiliar os laboratórios que pretendem implementar esta técnica, além de auxiliar os fabricantes de IGRA a fornecerem suporte técnico efetivo, aumentando a velocidade na implementação de novas tecnologias por países com elevada carga da tuberculose.

Palavras Chaves: ILTB, IGRA, QFT-Plus *M.tuberculosis*

ABSTRACT

The World Health Organization estimates that 1.7 billion people are infected with *Mycobacterium tuberculosis*, which does not mean that all individuals will develop an active form of the disease, but it is estimated that 5 to 10% of individuals with ILTB if left untreated can progress to active disease. The Interferon Gamma Release Assay (IGRA) assay for the identification of latent tuberculosis infection (ILTB) has been described as an alternative method for the tuberculin test available in public health networks, with IGRA being a more specific test. However, the use of this assay requires preparation and adaptation in the laboratory routine. A pilot implementation study was carried out in the multicenter cohort of the RePORT-Brasil consortium between 2016 and 2019 in three Brazilian states. Laboratory information on the implementation process was evaluated with the laboratory team at the RePORT-Brasil sites. During the implementation process, several gaps were identified, even following all the recommendations of the manufacturer of the QFT-Plus assay. Initially, the laboratories identified problems in relation to acquisition of equipment, reagents and consumables. The equipment had to be purchased through the sites, generating additional costs. QFT-Plus Tube kit and QFT-Plus ELISA kit were imported and generated problems in the logistics of delivery to the sites. The training of laboratory technicians without experience in samples collection, transporting and processing, with ELISA assays, was straight forward and the learning curve was quick, despite preanalytical errors being identified after the start of the study. Thus, we indicate that the expansion of the use of IGRAs, such as the QFT-Plus, must be well planned, with negotiations with the manufacturer regarding the logistics of delivery of the kits in areas of difficult access. In addition, the sample collection, transport and processing settings must be evaluated, with the aim of mitigating pre-analytical errors that may interfere with the test results. Training with laboratory technicians is extremely important, since regular training to stakeholders develops a sense of responsibility towards reporting non-conformities and quality laboratory data reporting semester contribute to the improvement of routine after implementation. Finally, we believe that some of the problems identified in this pilot study can assist laboratories wishing to implement this technique, in addition to helping manufacturers IGRAs to provide effective technical support, increasing the speed in the implementation of new technologies by countries with a high burden of TB.

Keywords: ILTB, IGRA, QFT-Plus *Mycobacterium tuberculosis*

RESUMO LEIGO

As pessoas que convivem com doentes de tuberculose pulmonar correm um risco de se infectar e/ou adoecer. A infecção pode ocorrer inicialmente na forma latente, na qual a pessoa está infectada pela micobactéria causadora da tuberculose, mas não está doente e a tuberculose ativa quando a pessoa já está doente. As duas formas podem ser tratadas, e com isso a importância do diagnóstico laboratorial. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a implementação de um teste de diagnóstico, o ensaio de liberação do interferon-gama (IGRA) em centros de triagem de rastreamento e diagnóstico da infecção latente por *M.tuberculosis* no Brasil. O estudo mostrou que esta técnica para diagnóstico de tuberculose latente pode ser uma boa estratégia e pode ser realizada numa rotina laboratorial, sendo necessário realizar a capacitação dos profissionais para garantir a realização adequada da técnica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação da ILTB em crianças menores de 10 anos de idade	25
Figura 2. Avaliação da ILTB em adolescentes com idade igual ou maiores de 10 anos e Adultos.....	26
Figura 3. Avaliação da ILTB em profissionais de saúde	26

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Interpretação dos resultados do QuantiFERON®-TB Gold Plus	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

BAAR	-	Bacilo álcool ácido resistente
BCG	-	Bacilo de Calmette Guerin
BK	-	Bacilo de Koch
CFP-10	-	Culture Filtrate Protein 10
ELISA	-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESAT-6	-	Early Secretory Antigenic Target 6
FDA	-	<i>Food and Drug Administration (USA)</i>
HIV	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	-	Interferon gama
IGRA	-	<i>Interferon-Gamma Release Assays</i>
ILTB	-	Infecção Latente por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MITOGEN	-	Tubo de sangue com mitógeno (controle mitógeno)
MS	-	Ministério da Saúde
MTB	-	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MNT	-	Micobactérias não causadoras de tuberculose
NIL	-	Tubo de sangue sem estímulo (controle negativo)
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PNCT	-	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PPD	-	Derivado proteico purificado
PVHIV	-	Pessoas vivendo com HIV
QFT [®] -TB	-	QuantiFERON-TB
QFT [®] -G	-	QuantiFERON-TB <i>Gold</i>
QFT [®] -GIT	-	QuantiFERON-TB <i>Gold In Tube</i>
QFT [®] -Plus	-	QuantiFERON-TB Gold Plus
SUS	-	Sistema Único de Saúde
TB	-	Tuberculose
TB1 e TB2	-	Tubos de sangue com antígenos de <i>M. tuberculosis</i>
TPT	-	Terapia preventiva para TB
TST	-	Teste tuberculínico

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Infecção latente por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
1.2. Aspectos epidemiológicos	20
1.3. Agente etiológico	21
1.4. Transmissão e patogênese da Tuberculose	22
1.5. Diagnóstico da ILTB	23
1.5.1. Teste Tuberculínico	23
1.5.2. Ensaio de liberação de interferon-gama	27
1.5.3 Ensaio imunoenzimático T-SPOT®.TB	27
1.5.4 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática QuantiFERON®-TB	28
2 OBJETIVOS	32
2.1 Geral	32
2.2 Específicos	32
3 PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	32
4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS	53
5 CONCLUSÃO	53
6 REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO	54
7 APÊNDICE	59
8 ANEXO	104

1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma das dez principais causas de morte em todo o mundo, sendo estimado que um quarto da população tenha *infecção latente por Mycobacterium tuberculosis* (ILTB). Organizações governamentais e não governamentais vêm trabalhando para diminuir a cada ano a incidência da doença. A identificação das pessoas com maior risco de adoecer, é fundamental para o controle da doença. A Organização Mundial da saúde (OMS) lançou o programa Estratégia pelo Fim da Tuberculose (*End TB Strategy*), que estabelece metas para o fim da TB, no entanto, para alcançar essas metas, é fundamental aumentar o rastreamento, diagnóstico e tratamento da ILTB (1,2).

Quando o indivíduo saudável é exposto ao bacilo da TB pode desencadear a forma ativa da doença ou pode permanecer em estado de latência, a depender de fatores imunológicos individuais dentre outros. Em geral, as pessoas permanecem saudáveis, mas o rastreamento de pacientes com ILTB é importante para tratar a infecção e evitar uma futura cadeia de transmissão caso a pessoa desenvolva a TB ativa (3).

Há uma dificuldade no diagnóstico de ILTB, visto que atualmente não existe um teste padrão ouro para ILTB, os testes mais comumente utilizados para o diagnóstico são o teste tuberculínico (TST - *Tuberculin skin test*) e os ensaios de liberação do interferon-gama (IGRA) (4).

O TST possui uma especificidade menor em relação ao IGRA, em populações que receberam a vacina BCG e em locais onde micobactérias não causadora de tuberculose (MNT) são prevalentes, tornando a técnica menos específica. Outra desvantagem da técnica é que o paciente necessita ir duas vezes a unidade de saúde, para ser realizada a leitura da reação tuberculínica (5,6).

Os IGRAs foram criados para detecção da resposta imune a antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis*. Esta técnica se torna superior ao TST devido ser mais específica devido não ser afetado pela maioria das MNT e vacina BCG, tendo sido recomendado nos últimos anos como potenciais substitutos ou complementares à prova tuberculínica, mas ainda não estão incorporados no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil (7,8).

O Ministério da Saúde (MS) brasileiro vem enfrentando dificuldades no processo de aquisição do TST, por indisponibilidade no mercado, sendo assim, o teste IGRA, disponível comercialmente, vem como uma alternativa para um diagnóstico mais específico para ILTB. Apesar dessas vantagens, os testes IGRA necessitam de uma estrutura laboratorial mínima, além de profissionais treinados para a realização dos ensaios, com rotina laboratorial padrão.

Assim, esse estudo visa descrever as lições aprendidas e experiências obtidas no processo de implementação de um ensaio de liberação do interferon-gama em centros de rastreamento e diagnóstico da *infecção latente por M.tuberculosis* no Brasil. O processo de implementação ocorreu durante a realização de um grande estudo multicêntrico de coorte observacional e pode contribuir para uma possível implementação do teste nos laboratórios do SUS e rede de saúde do mundo.

1.1. Infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis (MTB) ao infectar uma pessoa, pode induzir a forma ativa da doença, ou forma latente. A ILTB ocorre quando uma pessoa está infectada pelo bacilo, no entanto não manifesta a doença ativa, resistindo ao adoecimento após infecção. Os bacilos ficam em estado de latência, podendo permanecer por muitos anos no organismo, como reservatórios, sem que haja a progressão da doença, permanecendo saudáveis por décadas, sendo estes portadores incapazes de transmitir a micobactéria (9).

Mecanismos intrínsecos ao *M. tuberculosis* podem influenciar o processo de infecção e adoecimento levando a diferentes desfechos desde o momento da inalação do Bacilo de Koch (BK) pelo hospedeiro. Nesse contexto, características como virulência e carga infectante (carga bacilar) influenciam de forma direta no processo infeccioso, mas, deve-se levar em consideração também fatores associados ao hospedeiro, a exemplo da imunidade inata e adquirida (10,11).

As características do BK frente a resposta do hospedeiro resulta na instalação ou não da doença, afinal, a probabilidade de infecção evoluir para a doença é diretamente proporcional ao número de bacilos, virulência e a resposta causada (10,12).

Desde o momento da inalação até o processo de resposta da imunidade natural contra o BK, alguns desfechos podem ser descritos, dentre eles, estão:

- A ação eficaz da resposta celular inicial levando ao processo de destruição total de toda a carga bacilar inalada;
- A resposta inicial ineficaz, com falha na eliminação do bacilo e início do processo de multiplicação do MTB, levando a doença ativa;
- O BK pode entrar em estado de latência, tendo como desfecho a infecção latente;
- A reativação desses bacilos latentes, originando o processo de doença ativa.

Tratando-se de um microrganismo intracelular, o BK possuem mecanismos que auxiliam no escape do sistema imune, podendo levar ao processo de doença ativa ou até mesmo à latência. Tais mecanismos contam com a capacidade de inibição do processo de fusão do fagossomo a vesículas lisossomais (formação do fagolisossomo) e inativação de enzimas lisossomais (13–16).

Esses mecanismos de escape podem resultar em um estado de latência, em que, mesmo em um ambiente hostil e com carência de nutrientes, MTB consegue se manter viável através de mudanças metabólicas, com o início do catabolismo lipídico e respiração por nitrato para garantir sua sobrevivência (17–19).

Todavia, o maior risco de adoecer ocorre nos primeiros dois anos após a primo-infecção, mas pode estender-se por muitos anos. O desenvolvimento da forma ativa da doença está relacionado à fatores de competência do sistema imunológico, além de fatores de risco, como comorbidades, destacando-se a população infectada pelo vírus da Imunodeficiência adquirida (HIV) (20).

Paciente com a ILTB carrega um risco de 5-15% de progredir para TB ativa nos primeiros dois anos após a infecção, seguido de cerca de 5% com o risco de desenvolver TB ativa ao longo da vida, geralmente causado pela diminuição da imunidade. Com isso, um indivíduo que se infecta e a micobactéria permanece em estado de latência, representa um reservatório principal para uma futura cadeia de transmissão. A identificação destes pacientes por meios de diagnóstico PT ou IGRA indica um acompanhamento adequado e tratamento correto (21–23).

A indicação da profilaxia para a ILTB depende de vários fatores, tais como resultados do TST ou IGRA, idade da pessoa, probabilidade da ILTB e risco para o desenvolvimento de TB ativa. Apesar de uma ampla distribuição de pacientes infectados com MTB, não há uma investigação eficiente da ILTB. Este rastreamento é preconizado em apenas algumas populações, na qual estes pacientes se beneficiarão da terapia preventiva para TB (TPT), sendo os critérios demonstrado abaixo (24).

- Contatos (nos últimos dois anos) adultos e crianças de TB pulmonar e laríngea;
- PVHIV com células T CD4+ \leq 350 células/mm³;
- Pessoas em uso de inibidores de TNF alfa ou corticosteroides (equivalente a >15mg/dia de prednisona por mais de um mês);
- Pessoas com alterações radiológicas fibróticas sugestivas de seqüela de TB;
- Pré-transplante que irão fazer terapia imunossupressora;
- Pessoas com uso de silicose;
- Neoplasia de cabeça e pescoço, linfomas e outras neoplasias hematológicas;
- Neoplasias em terapia imunossupressora;
- Insuficiência renal em diálise;
- Diabetes mellitus;
- Baixo peso (< 85% do peso ideal);
- Tabagistas (\geq 1 maço por dia);
- Calcificação isolada (sem fibrose) na radiografia de tórax;
- Profissionais de saúde, pessoas que vivem ou trabalham no sistema prisional ou em instituições de longa permanência;

Os contatos de paciente com TB pulmonar ativa possuem risco para progressão da doença ativa, com isso a importância de diagnósticos para o rastreio da ILTB, teste como IGRA e teste tuberculínico são essenciais para o rastreamento e diagnóstico da ILTB.

1.2. Aspectos epidemiológicos

Segundo a OMS, estima-se que 1,7 bilhão de pessoas, ou seja, um quarto da população mundial esteja infectada com *M. tuberculosis*, porém não significa que todos os indivíduos irão desenvolver a forma ativa da doença (1).

A investigação de indivíduos que são contatos de casos novos da doença com diagnóstico laboratorial no Brasil, em 2018, foi de 53,6%, sendo que a região Norte do país investigou apenas 40,8% desses, ficando na última posição em relação a essa investigação. Três estados brasileiros examinaram mais de 75% dos contatos identificados, sendo eles Maranhão (84,3%), Acre (79%) e Pernambuco (76,5%). O Estado do Amazonas só avaliou 49,5%, estando abaixo a média brasileira (25).

A triagem sistemática para TB ativa entre populações específicas pode ajudar a garantir o diagnóstico precoce. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda essa triagem para contatos de casos confirmados bacteriologicamente, pessoas vivendo com HIV, dentre outros indivíduos em risco, baseando-se em uma avaliação epidemiológica da TB em cada local. Por enquanto, em países que estão utilizando este método de triagem, houve poucas avaliações de sua implementação, contudo, espera-se que ajude no monitoramento dos casos e que os profissionais possam ajudar na avaliação do método, além de melhorar a detecção destes casos, dando o devido suporte ao paciente (1,26).

1.3. Agente etiológico

A TB é causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi* e *M. caprae*. Para saúde pública, *M. tuberculosis* é a espécie de maior interesse e importância médica (27,28).

Este agente pertence à ordem das *Actinimetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. São micobactérias aeróbicas estrita em formato de bastonete delgados, fino, levemente curvo, com extremidades arredondadas, mede cerca de 0,5 a 3µm, possuem crescimento lento e que não se desenvolve nos meios utilizados para outras bactérias. A parede celular é rica em lipídeos (ácidos micólicos e arabinogalactano) conferindo baixa permeabilidade, responsável por importantes efeitos biológicos, como a indução de granulomas (29).

O granuloma é formado por células, derivadas dos macrófagos e por linfócitos, que tentam combater a disseminação do MTB. Com o desenvolvimento da imunidade celular, o granuloma sofre um processo de necrose de caseificação, que também pode ser induzido pelo Bacilo de Koch (BK), através da liberação da citocina TNF- α e formação da Linfangioleiomiomatose (LAM), a partir de células musculares no tecido pulmonar. Com essa necrose, o BK pode deprimir sua atividade metabólica e ficar em forma de latência, fazendo com que a micobactéria possa sobreviver por anos, gerando assim a ILTB (30).

Porém, mesmo com todo o mecanismo de defesa de combate e eliminação da infecção, pode ocorrer a reativação do bacilo, principalmente por comprometimento do sistema imunológico do hospedeiro, sendo observado em condições patológicas ou situações imunossupressoras, tais como co-infecção com o HIV, desnutrição, tabagismo dentre outros, fazendo com que o foco latente reative e cause a doença em sua forma ativa (30).

1.4. Transmissão e patogênese da Tuberculose

A transmissão ocorre por vias aéreas, de uma pessoa com TB pulmonar ou laríngea, a qual elimina no ambiente os bacilos através da tosse, espirro ou fala. O indivíduo com doença ativa produz núcleos de gotículas contendo o BK, que podem flutuar por várias horas no ambiente, aumentando assim a chance de disseminação. Assim, observa-se que pacientes com baciloscopia positiva tem maior chance de transmissibilidade do patógeno. A TB acomete principalmente os pulmões, quando ocorre na forma pulmonar, caracteriza-se pela ocorrência de tosse seca, podendo evoluir para expectoração purulenta ou mucoide e em alguns casos pode ser acompanhada de hemoptise, febre vespertina, além de sudorese noturna (31).

Após a inalação da micobactéria, o sistema imune é capaz de interromper a primo-infecção, pois a parede celular do MTB provoca a formação de granulomas, que induzem o recrutando de células polimorfonucleares e posteriormente linfócitos T e fagócitos mononucleares em diferentes níveis de maturação. Os macrófagos alveolares, quando ativados após o reconhecimento do MTB e por ação das citocinas, tais como IFN- γ , podem atuar diretamente na destruição do bacilo, induzindo a formação de fagolisossomos, além da produção de enzimas lisossômicas, lipases, proteases que possuem ação microbicida

(29). O granuloma é formado por células gigantes, derivadas dos macrófagos, e por linfócitos T, que tentam conter a disseminação do BK. No centro do granuloma maduro, observam-se células epitelióides e células gigantes de Langerhans e, em seu envoltório, linfócitos T CD4+ e CD8+. Com o desenvolvimento da imunidade celular, o centro do granuloma sofre um processo de necrose de caseificação, o que também pode ser induzido pelo BK, através do TNF- α e da LAM. O meio necrótico é adverso ao BK, que deprime sua atividade metabólica e fica dormente, condição na qual pode sobreviver por décadas. Mesmo deprimindo seu metabolismo, o bacilo pode proliferar dentro do granuloma, podendo reativar a infecção posteriormente (29).

O mecanismo de defesa é baseado na exposição a micobactéria, onde há um desenvolvimento da resposta imune celular a partir de citocinas Th1, os linfócitos Th1 produzem IFN- γ e Interleucina-2 (IL-2), que estimulam respostas celulares, mediadas principalmente pelos macrófagos, que são essenciais na resistência à infecção destes patógenos (32). Essas citocinas possuem um papel importante no controle de infecções intracelulares no organismo humano, gerando no portador da infecção alguns desfechos, tais como, controle do bacilo logo após a exposição devido sua resposta imune inata, desenvolvimento da forma ativa da doença ou ainda a ILTB (33).

1.5. Diagnóstico da ILTB

1.5.1. Teste Tuberculínico

O TST consiste na inoculação intradérmica do derivado proteico purificado (PPD - *Purified Protein Derivative*) em indivíduos expostos ao MTB. O PPD é um produto obtido através do cultivo de sete cepas selecionadas do *M. tuberculosis* esterilizadas e concentradas. É uma solução líquida incolor ou levemente amarelada e deve ser conservada em uma temperatura de 2°C a 8°C, não podendo ser exposta à luz solar diretamente (34). No Brasil, o PPD utilizado é o RT-23 (RT: *Reset Tuberculin*, 23: número de partículas) (35).

O TST é um teste de diagnóstico da ILTB, sendo aplicado por via intradérmica, no terço médio da face anterior do antebraço esquerdo, em uma dose de 0,1ml, que contém 5 unidades do PPD. Após a inoculação, espera-se que ocorra uma reação de hipersensibilidade cutânea ao PPD em indivíduos que tiveram contato com MTB, sendo

realizada a avaliação e leitura dessa reação após 48 a 72 horas, podendo ser estendido por no máximo 96 horas (8,36).

A inoculação do PPD desencadeia uma reação do tipo antígeno anticorpo, seguida por resposta dependente da reatividade celular de linfócitos T sensibilizados. Acredita-se que após a aplicação do PPD, ocorra uma reexposição ao bacilo de indivíduos que foram infectados pelo MTB, produzindo uma resposta às estruturas antigênicas e, conseqüentemente, esse processo é observado no local da aplicação do PPD (37).

Após a realização do TST, o paciente deverá voltar a unidade de saúde no tempo estipulado, para realização da avaliação e leitura do teste, sendo realizado com a medição do diâmetro transverso da área endurecida palpável, utilizando uma régua milimetrada. O resultado do TST deve ser lido e registrado em milímetros, quanto mais aproximado ao valor de 5mm, indica uma possível infecção pela micobactéria, caso o paciente não tenha tido nenhum tipo de reação, o técnico responsável pela leitura deve registrar com zero milímetro (24,36).

O TST mostra uma reação de hipersensibilidade cutânea, após contato ao MTB. O teste pode sofrer interferências, por meio de micobactérias não causadoras de tuberculose e quando o paciente foi imunizado com a vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guerin) (38). Essas limitações geram grande preocupação na equipe assistencial, visto que grande parte da população brasileira é imunizada com essa vacina (24).

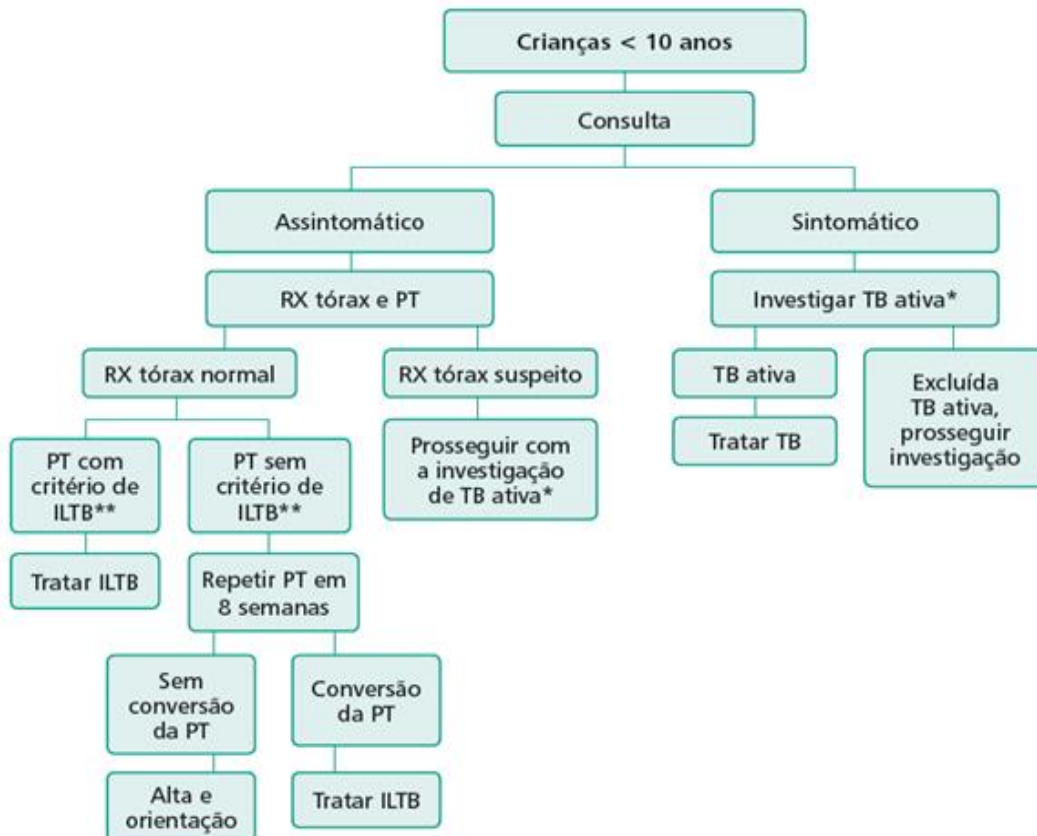
De modo geral, a sensibilidade do TST é em torno de 77%. Reações falso-negativas (pacientes com ILTB, porém negativos no TST) podem ocorrer por conta de alguns fatores, tais como (24,39,40).

- PPD malconservado, exposto à luz direta ou ultravioleta, congelado, desnaturado, contaminado com fungos ou com manutenção em frascos inadequados;
- Leitor inexperiente ou com vício de leitura;
- Presença de TB grave ou disseminada;
- Outras doenças infecciosas agudas virais, bacterianas ou fúngicas;
- Imunossupressão avançada (aids, uso de corticosteroides, outros imunossupressores e quimioterápicos);
- Vacinação com vírus vivos em período menor que 15 dias;
- Neoplasias, especialmente as de cabeça e pescoço e as doenças linfoproliferativas;

- Desnutrição, diabetes mellitus, insuficiência renal e outras condições metabólicas;
- Gravidez;
- Crianças com menos de 3 meses de vida;
- Idosos (> 65 anos);
- Febre durante o período da realização do TST e nas horas que o sucedem.

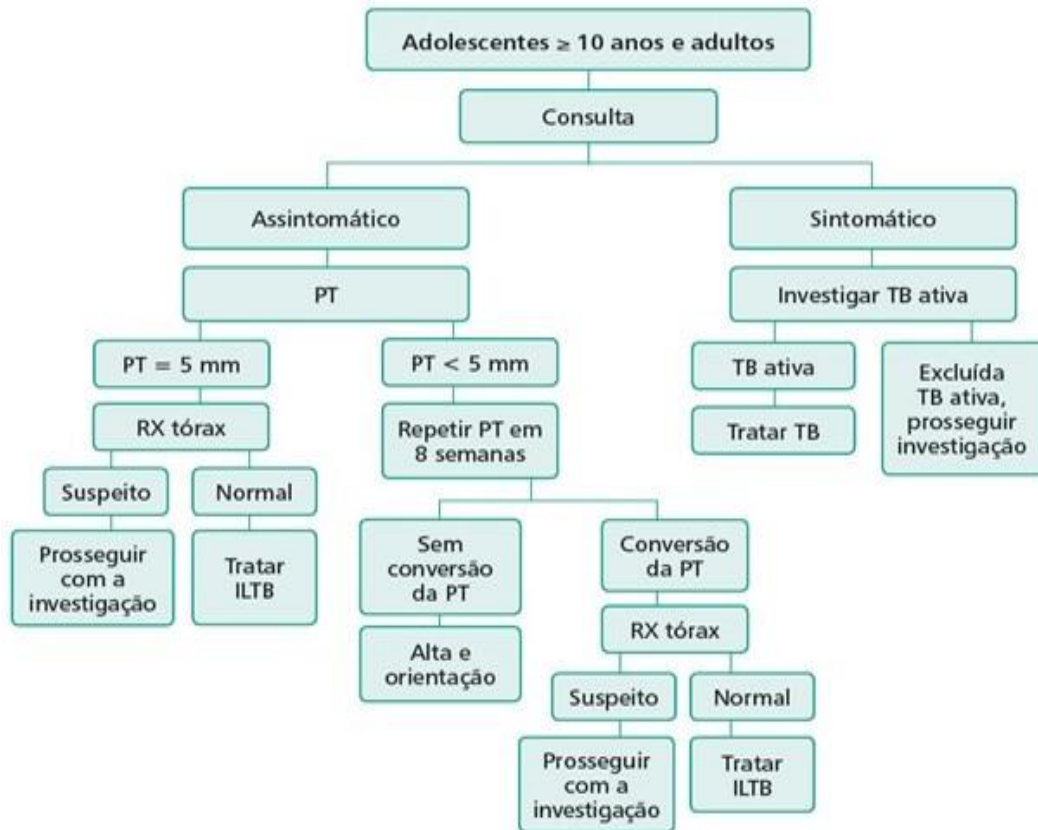
É necessário interpretar corretamente o TST, com o objetivo de fornecer indicadores para a realização da terapia de prevenção para TB (TPT), através do tratamento da ILTB. Atualmente o MS do Brasil, por meio do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) padronizou protocolos de rastreamento, interpretação e conduta para avaliação da ILTB e seu posterior tratamento, devendo ser direcionado pela faixa etária (crianças, adolescentes e adultos) e se o contato é profissional de saúde (14). No total, foram elaborados três fluxogramas, como demonstrado nas Figuras 1, 2 e 3.

Figura 1. Avaliação da ILTB em crianças menores de 10 anos de idade



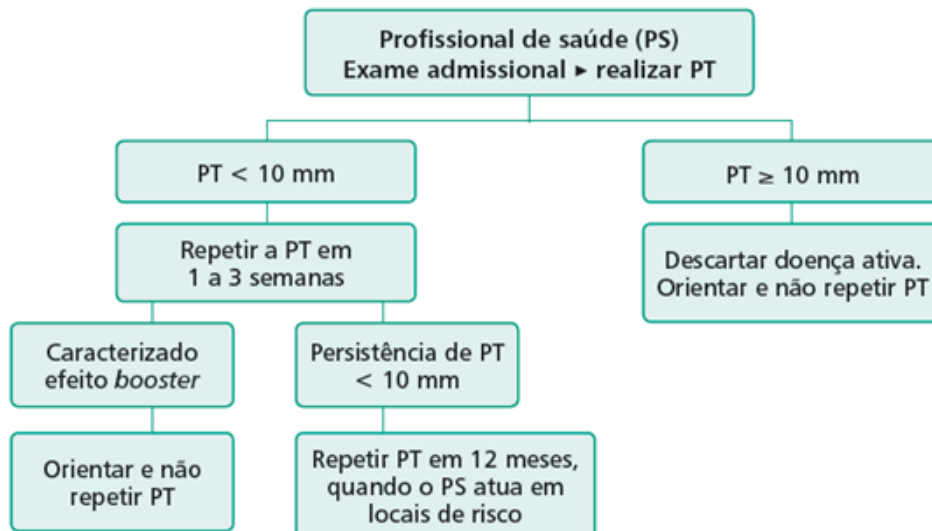
Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, Manual de recomendações do PNCT, 2011 (24).

Figura 2. Avaliação da ILTB em adolescentes com idade igual ou maiores de 10 anos e Adultos.



Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, Manual de recomendações do PCNT, 2011 (24).

Figura 3. Avaliação da ILTB em profissionais de saúde



Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, Manual de recomendações do PNCT, 2011 (24).

Ao realizar o atendimento com o contato de caso de TB, o profissional de saúde precisar ter a sensibilidade de conversar com a pessoa sobre sintomas característicos da doença, tais como tosse seca de três semanas ou mais, sudorese noturna, perda ponderal. Se houver o relato desses sintomas, o indivíduo deve ser encaminhado para investigação de TB ativa, seguindo as normas preconizadas pelo PNCT (31).

1.5.2. Ensaio de liberação de interferon-gama

O ensaio de liberação de interferon-gama (IGRA) é um teste que utiliza sangue total, desenvolvido para quantificar a produção de IFN- γ *in vitro* por células T sensibilizadas após estimulação *in vitro* com antígenos do complexo MTB. Os avanços em análises/seqüências genômicas permitiu identificar antígenos específicos para MTB, tais como ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target 6) e CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10), que induzem a produção específica de IFN- γ por células T sensibilizadas (41,42).

Os antígenos ESAT-6 e CFP-10 são codificados na região de diferenciação 1 (RD1) presente no genoma do *M. tuberculosis* e *M. bovis* e são ausentes na vacina *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) e na maioria das micobactérias não causadoras de tuberculose. A partir disso, foram desenvolvidos testes de diagnóstico para a ILTB, utilizando a combinação desses antígenos com os ensaios imunoenzimáticos. Atualmente, temos dois kits disponíveis no mercado como uma alternativa ao TST para o diagnóstico da ILTB, sendo eles ensaio imunoenzimático T-SPOT-TB (T-SPOT-TB) e ensaio imunoenzimático QuantiFERON-TB (43).

1.5.3 Ensaio imunoenzimático T-SPOT[®].TB

O ensaio imunoenzimático T-SPOT[®].TB (T-SPOT[®].TB) é um ensaio imunoenzimático de diagnóstico *in vitro* para a detecção de células T efectoras que respondem à estimulação dos antígenos ESAT-6 e CFP-10 do *M. Tuberculosis*. Essa técnica é baseada na técnica ELISPOT e foi recomendado pela *National Institute for Health and Clinical Excellence* na Europa. O teste tem sido indicado para utilização em indivíduos que tenha risco de ILTB ou com suspeita de terem contraído a tuberculose, independentemente da idade, sexo, grupo étnico, status imunológico dentre outros (44).

As análises ELIPOST são muito sensíveis uma vez que citocina alvo é diretamente identificada em volta da célula secretora, antes de ser diluída no sobrenadante, capturadas pelos receptores de células adjacentes ou degradadas. Isto torna as análises ELISPOT mais sensíveis que as análises de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) convencionais (45).

O kit comercial do teste contém placas individualizadas compostas de oito poços sensibilizados com anticorpos anti-IFN- γ . Além disso, possui tubos contendo a solução de antígeno ESAT-6 (Painel A) e outro contendo CFP-10 (Painel B), com um tubo contendo uma solução de fitohemoaglutinina (PHA), denominado controle positivo do teste. Os resultados do teste T-SPOT[®].TB são interpretados subtraindo a contagem de pontos no poço do controle negativo à contagem de pontos em cada um dos painéis, de acordo com o seguinte algoritmo (46):

- O resultado do teste é considerado positivo quando os pontos do Painel A menos os pontos do controle negativo e/ou os pontos do Painel B menos os pontos do controle negativo forem ≥ 6 pontos.
- O resultado do teste é considerado negativo quando os pontos do Painel A menos os pontos do controle negativo e/ou os pontos do Painel B menos os pontos do controle negativo forem ≤ 5 pontos. Isso deve incluir também valores inferiores a zero.

Um resultado “positivo” indica que a amostra contém células T efectoras reativas ao *M. tuberculosis*. Um resultado “negativo” indica que a amostra provavelmente não contém células T efectoras reativas ao *M. tuberculosis* (46).

Esta técnica requer um leitor e software caro e profissionais treinados e especializados, restringindo assim sua aplicação clínica em países em desenvolvimento. Embora o ensaio T-SPOT[®].TB e QFT[®]-TB se correlacionem bem, esta técnica tem sido menos utilizada (34, 35, 36).

1.5.4 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática QuantiFERON[®]-TB

O ensaio imunoenzimático QuantiFERON[®]-TB (QFT[®]-TB) foi desenvolvido com base na tecnologia de estimulação in vitro de células T efectoras, oriundas do sangue total, com um coquetel de antígenos do MTB, com posterior quantificação da citocina IFN- γ (47). Foi

aprovado em 2001 pela agência reguladora (FDA - Food and Drug Administration) e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC - Centers for Disease Control) do Estados Unidos da América (EUA), como uma ferramenta de auxílio na detecção da ILTB (8). Devido a algumas desvantagens relacionadas a resultados falso positivos e o estabelecimento de um ponto de corte (cut-off) em unidades internacionais (UI) ou mililitro (ml) (8,48), a segunda geração do teste foi aprovada pela FDA e CDC em 2005, sendo denominada de QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT[®]-G) (8,49).

O QFT[®]-G trouxe inovações com a inclusão de um controle negativo e a utilização de peptídeos sintéticos de duas proteínas do *M. tuberculosis* (ESAT-6 e CFP-10). Inicialmente o teste foi indicado para o diagnóstico da TB, incluindo a ILTB. Este teste foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA em 2005. No entanto, erros na coleta e/ou transporte de amostras de sangue, problemas na execução e interpretação dos ensaios laboratoriais, além de resultados limitados para determinar os indivíduos com ILTB com risco de desenvolver TB criaram barreiras para o uso em grande escala do teste (50).

Em 2007, foi lançado e aprovado pela FDA e CDC, o ensaio QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (QFT[®]-GIT). O novo teste foi formulado com diretrizes para modificar o QFT-G para um sistema de coleta de sangue com três tubos, NIL (controle negativo), Antígeno TB (TB) e Mitógeno (MIT). O QFT-GIT foi comercializado com a proposta de realizar o diagnóstico in vitro da ILTB, através da estimulação de células T CD4 com as proteínas sintéticas ESAT-6, CFP-10 e TB7.7. A coleta de sangue deveria ser realizada em tubos especializados de coleta de sangue, contendo heparina e/ou os peptídeos do complexo MTB. A detecção do IFN- γ era realizada por meio de ELISA de amostras de plasma obtidas após o período de estimulação e centrifugação dos tubos (51).

Embora apresenta-se uma especificidade consistente de 99% em indivíduos de baixo risco e uma sensibilidade de até 92% em indivíduos com doença ativa, dependendo do cenário e extensão da doença, em 2017 foi lançado o QuantiFERON[®]-TB Gold Plus (QFT[®]-Plus) (52). Esse teste contém apenas peptídeos sintéticos ESAT-6 e CFP-10, agora distribuídos em dois tubos de antígeno (TB1 e TB2). O tubo TB1 é igual ao QFT[®]-GIT, com exceção do peptídeo TB7.7, enquanto o tubo TB2 possui adicionalmente peptídeos menores para estimular além das células T CD4 (estimuladas no tubo TB1), células T CD8 (47). Essas proteínas estão ausentes na vacina BCG e da maioria das

micobactérias não causadoras de tuberculose, com exceção da *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* (53).

O QFT[®]-Plus tem sido superior ao TST na identificação de indivíduos com ILTB e tem demonstrado vantagens sobre a técnica utilizada nas unidades de saúde. Um dos pontos positivos desta técnica é que o QFT[®]-Plus não é influenciado pela vacinação BCG e infecção por MNTs, como o TST, conferindo assim uma melhor especificidade ao teste (5,6).

O QFT[®]-Plus utiliza quatro tubos de coleta de sangue, um tubo NIL (controle negativo), dois tubos com antígenos TB distintos: antígeno TB1 e antígeno TB2 e um tubo mitógeno (controle positivo). Ambos os tubos TB contêm antígenos peptídicos dos antígenos associados ao complexo MTB ESAT-6 e CFP-10, o tubo TB1 contém peptídeos ESAT-6 e CFP-10 que são responsáveis em induzir respostas imune celular a partir dos linfócitos T CD4+, enquanto o tubo TB2 contém um conjunto de peptídeos adicionais direcionado para indução além de respostas imunes mediada a partir de linfócitos T CD8+ (7,54,55).

Células T CD4 desempenham um papel importante no sistema imunológico através da secreção da citocina IFN- γ , e linfócitos T CD8 atuando na defesa do hospedeiro, produzindo citocina que ativam os macrófagos para inibir o crescimento do bacilo, eliminando células infectadas com as do complexo MTB. O resultado do QFT[®]-Plus é considerado positivo quando a concentração de IFN- γ do tubo antígeno TB (1 ou 2) for significativamente maior que o valor de NIL mensurado em IU/mL, como demonstrado no quadro 1. O mitógeno serve como controle positivo do teste, um valor <0,5 IU/mL indica resultado indeterminado (7).

Quadro 1. Interpretação dos resultados do QuantiFERON®-TB Gold Plus

Nil* (IU/mL)	Antígeno TB1 menos Nil (IU/mL)	Antígeno TB2 menos Nil (IU/mL)	Mitógeno menos Nil (IU/mL)	Resultado	Interpretação
<= 8,0	> = 0,35 e > = 25% do valor de Nil	> = 0,35 e > = 25% do valor de Nil	Qualquer um	Positivo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> Provável
<= 8,0	< 0,35	< 0,35	> = 0,5	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> NÃO provável
	> = 0,35 e < 25% do valor de Nil	> = 0,35 e < 25% do valor de Nil	> = 0,5		
<= 8,0	< 0,35	< 0,35	< 0,5	Indeterminado	Os resultados da reação ao Antígeno TB são indeterminados
	> = 0,35 e < 25% do valor de Nil	> = 0,35 e < 25% do valor de Nil	< 0,5		
> 8,0	Qualquer um	Qualquer um	Qualquer um		

Assim, como o TST, o QFT®-Plus também não distingue infecção e doença, mas em combinação com avaliações clínicas, biológicas e radiológicas pode fornecer informações importantes para o diagnóstico da ILTB, visto que o teste apresenta uma boa sensibilidade, geralmente não reagindo com outras micobactérias (56).

Para erradicação da TB, o diagnóstico de ILTB é importante para dar início ao tratamento. Os contatos de paciente com a doença pulmonar ativa possuem risco maior para desenvolver TB, assim, nota-se a importância do rastreamento e diagnóstico da ILTB, com o QFT®-Plus ou outro ensaio IGRA. Esses ensaios tem sido recomendado nos últimos anos como potenciais substitutos ou complementares ao TST, mas ainda não estão incorporados no SUS (8). Dessa forma, percebe-se a necessidade de descrever o processo de implementação dessa técnica, visto que o QFT®-Plus necessita de uma estrutura laboratorial mínima, além de profissionais treinados para a realização dos ensaios, com rotina laboratorial padrão.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar a implementação de um ensaio de liberação do interferon-gama (IGRA) em centros de rastreamento e diagnóstico da Infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* (ILTB) no Brasil.

2.2 Específicos

- Descrever o teste piloto para implementação de um Ensaio de Liberação do Interferon-Gama (IGRA) na rotina laboratorial para o rastreio e diagnóstico da Infecção latente por *M.tuberculosis* (ILTB) em centros de referência no Brasil;
- Produzir informações operacionais sobre o processo de implementação de um Ensaio de Liberação do Interferon-Gama (IGRA) na rotina laboratorial para o rastreio e diagnóstico da Infecção latente por *M.tuberculosis* (ILTB) em centros de referência no Brasil.

3 PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Artigo a ser submetido a revista: *Frontiers in Microbiology*.

Lessons learned from implementation of interferon-gamma release assay to screen for latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in a large multicentric observational cohort study in Brazil

Brenda K.S. Carvalho^{1,2}, Allyson G. Costa^{1,2,3,4}, Mariana Araújo-Pereira^{5,6,7,8}, Hiochelson N.S. Ibiapina^{1,2}, Alexandra B. Souza^{1,2}, Adriano Gomes-Silva⁹, Alice M.S. Andrade^{5,6,8}, Elisangela C. Silva^{10,11}, Aline Benjamin⁹, Michael S. Rocha^{5,8}, Adriana S.R. Moreira¹⁰, Jamile G. Oliveira¹², Marina C. Figueiredo¹³, Megan M. Turner¹³, Renata Spener-Gomes^{1,2}, Solange Cavalcante^{9,12}, Afranio L. Kritski¹⁰, Valeria C. Rolla⁹, Bruno B. Andrade^{5,6,7,8}, Timothy R. Sterling¹³, Marcelo Cordeiro-Santos^{1,2,14}, for the RePORT Brazil consortium

1. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus Brazil; 2. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado

do Amazonas, Manaus, Brazil; 3. Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil; 4. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brazil; 5. Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose, Fundação José Silveira, Salvador, Brazil; 6. Laboratório de Inflamação e Biomarcadores, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil; 7. Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil; 8. Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER) Initiative, Salvador, Brazil; 9. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; 10. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; 11. Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brazil; 12. Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; 13. Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA; 14. Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Manaus, Brazil.

Corresponding author: Allyson Guimarães Costa, PhD, Fundação Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Av. Pedro Teixeira, 25, Dom Pedro, Manaus, Amazonas, Brazil, 69040-000. E-mail: allyson.gui.costa@gmail.com

Short title: IGRA implementation for LTBI screening in a large cohort

Keywords: Tuberculosis; IGRA; QuantiFERON; LTBI; diagnosis, quality control.

Words summary: A pipeline for implementation of QuantiFERON-TB for systematic screening of tuberculosis infection in a large cohort of exposed individuals is presented. Logistics and quality control challenges related to different settings of clinical sites are discussed and solutions are proposed.

ABSTRACT

The interferon gamma release assay (IGRA) assay for the identification of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection (ILTBI) has been described as an alternative method for the tuberculin test available in public health networks, with IGRA being a more specific test. However, the use of this assay requires preparation and adaptation in the laboratory routine. A pilot implementation study was carried out in the multicenter cohort of the RePORT-Brasil consortium between 2016 and 2019 in three Brazilian states. Laboratory information on the implementation process was evaluated with the laboratory team at the RePORT-Brasil sites. During the implementation process, several gaps were identified, even following all the recommendations of the manufacturer of the QFT-Plus assay. Initially, the laboratories identified problems in relation to acquisition of equipment, reagents and consumables. QFT-Plus Tube kit and QFT-Plus ELISA kit were imported and generated problems in the logistics of delivery to the sites. The training of laboratory technicians without experience in samples collection, transporting and processing, with ELISA assays, was straight forward and the learning curve was quick, despite preanalytical errors being identified after the start of the study. Thus, we indicate that the expansion of the use of IGRAs, such as the QFT-Plus, must be well planned, with negotiations with the manufacturer regarding the logistics of delivery of the kits in areas of difficult access. In addition, the sample collection, transport and processing settings must be evaluated, with the aim of mitigating pre-analytical errors that may interfere with the test results. Finally, we believe that some of the problems identified in this pilot study can assist laboratories wishing to implement this technique, in addition to helping manufacturers IGRAs to provide effective technical support, increasing the speed in the implementation of new technologies by countries with a high burden of TB.

INTRODUCTION

The World Health Organization estimates that one quarter of the world population is infected with *M. tuberculosis* (Mtb) (1,2). It is thought that the majority of the individuals exposed to Mtb end up developing an asymptomatic condition referred to as latent tuberculosis infection (LTBI). Between 5 to 10% of individuals with LTBI, if not treated with tuberculosis preventive therapy (TPT), can progress to active disease through their lifetime (1,2). Thus, active diagnosis of LTBI is critical to control tuberculosis (TB) transmission, guiding implementation of preventive therapy and reducing the odds of incident active TB.

In several countries endemic for TB, such as Brazil, the screening of LTBI is performed using the tuberculin skin test (TST), which consists in the intradermal inoculation of the TB-purified protein derivative (PPD) and evaluation of the reaction (skin induration) formed. This test has several limitations. A major problem is the requirement of a return visit to read the skin induration within 48-72 hours after PPD inoculation. Additional issues include the possibility of a subjective interpretation of the dermal reaction and a potential interference of BCG vaccination in the cellular immune response that account for the magnitude of the delayed-type hypersensitivity, which underlies the dermal reaction, favoring false-positive results (3,4). Advances in molecular investigations allowed the isolation of Mtb-specific antigens that drive production of interferon (IFN)-gamma by specific T-lymphocytes, enabling the development of new assays based on cellular recall responses, to identify LTBI as an alternative method for the TST (5,6).

The Interferon-gamma release assay (IGRA) has emerged as a very useful tool for identification of LTBI cases. This assay can be performed through two distinct testing platforms, such as the enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay (T-SPOT.TB) and QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus). These in vitro tests have been incorporated by several guidelines worldwide and have recently been considered by the WHO as equivalent for the diagnosis of LTBI (5,6). Of note, the QFT[®]-Plus assay has been shown to be superior to TST in several aspects, including: (i) the assay does not require a follow up visit for reading the results, (ii) the assay uses in vitro stimulation of cells from the peripheral blood with Mtb-derived ESAT-6 and CFP-10 proteins, which are absent in the BCG vaccine as well as in most non-TB mycobacteria, resulting in a higher specificity (7–9).

The above-mentioned advantages of the QFT-Plus over the TST for detection of LTBI indicate that this immunoassay is plausible and affordable alternative to TST. The possibility of systematically implementing the QFT-Plus in centers that perform LTBI screening has been accelerated by the fact that there has been a reduction in availability of TST in several countries, including Brazil (10). Thus, the implementation of QFT-Plus in reference centers for the diagnosis and treatment of TB can facilitate screening and diagnosis of LTBI cases, reducing underreporting, and helping to reduce TB burden.

The present study aimed at providing implementation protocols with information that can increase effectiveness and efficiency of interferon-gamma release assay for screening of LTBI. The study leveraged on the expertise acquired by the laboratory teams of the Regional Prospective Observational Research in Tuberculosis (RePORT)-Brazil consortium during the implementation of routine and protocols for systematic screening of LTBI in close contacts of patients with active pulmonary TB. The RePORT-Brazil protocol included five clinical research sites from three large Brazilian cities and is the largest multicentric cohort of TB close contacts to date in the country. All TB contacts are investigated for LTBI through use of QFT-Plus (11). The operational and logistics challenges of the process of implementing of IGRA in the laboratory routine are also described, together with solutions which led to successful establishment of the laboratory routine.

MATERIAL AND METHODS

Study Design and Laboratory Sites

The present investigation is a pilot implementation study which was performed in cohort multicenter RePORT-Brazil consortium between 2016 to 2019. Was conducted in Fundação Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose (IBIT), Secretaria Municipal de Saúde de Duque de Caxias (SMS-DC), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) and Clínica da Família Rinaldo Delamare, Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (SMS-RJ) (11).

Weather and Humidity Characteristics of Laboratory Sites

The five health units are located in Manaus-AM (FMT-HVD), with equatorial climate, average temperature of 26.4°C and humidity of 85.1%; Salvador-BA (IBIT), with tropical climate,

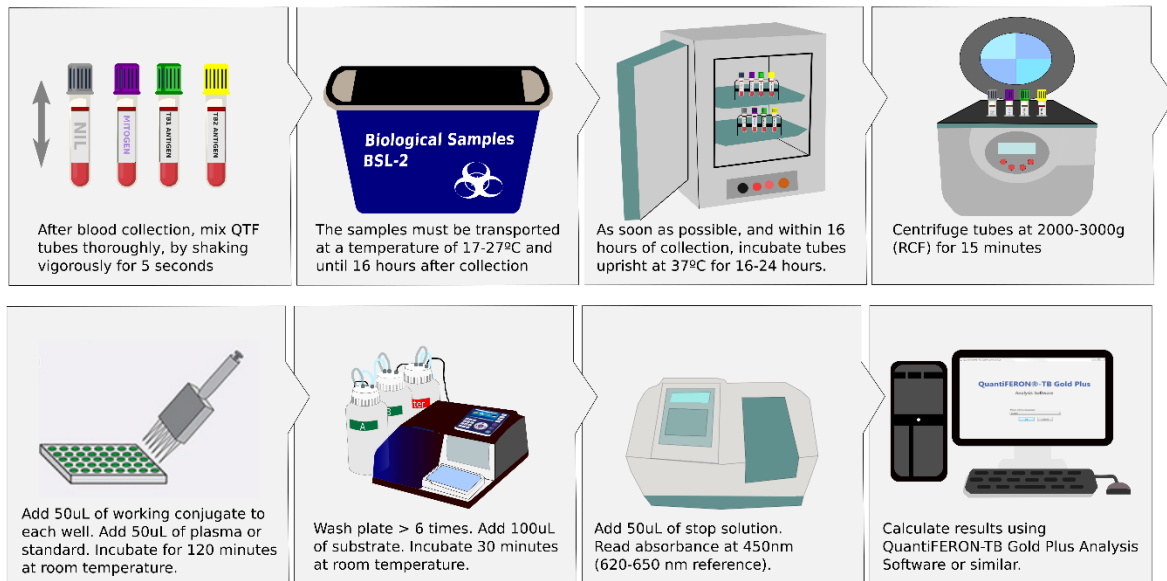
average temperature of 25.6°C and humidity of 79.1%; Duque de Caxias-RJ, with tropical climate, average temperature of 19.9°C and humidity of 77.2%; Rio de Janeiro-RJ, with tropical climate, average temperature of 23.6°C and humidity of 78.8% (12,13).

Maintenance and Biosafety of Laboratory Sites

The standard operating procedures (SOPs), courses of good clinical practice (GCP), good clinical laboratory practices (GCLP) and training were carried out by the project to start the examination routine. All sites provided maintenance out to certify the quality of the equipment, minimizing risks for laboratory technicians who process biologicals on a daily basis. In addition, personal protective equipment to prevent, minimize and eliminate risks for healthcare professionals was supplied.

QuantiFERON-TB Gold Plus

QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) was the Interferon-gamma release assay (IGRA) implemented in the laboratory routine of RePORT-Brazil consortium. Initially, every laboratory received training in sample collecting and processing by QIAGEN corporation (Chatsworth, CA, USA). Supplementary Figure 1 summarize steps of QFT-Plus. Briefly, venous blood for testing was collected in four tubes (Nil, TB1, TB2 and Mitogen) and incubated at 37°C for 20h. After incubation, samples were stored at -20°C until the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed. Interferon-gamma (IFN- γ) levels (international units per milliliter [IU/ml]) were quantified with a 4-point standard curve. QFT-Plus Analysis Software was used to release the results according to the manufacturer's recommendations (14). The software performs a quality control assessment of the assay, generates a standard curve, and provides a quantitative (IU/mL) and qualitative (positive, negative, or indeterminate) result.



Supplementary Figure 1: Steps of the QFT®-Plus in study.

Laboratory data of the QFT-Plus implementation process

Laboratory information on the QFT-Plus implementation process was evaluated with the teams from the laboratories of RePORT-Brazil sites. Data from team training, equipment maintenance, pre-analytical interferences (types of sample collection, place of sample collection and processing), identification (ID) of the tubes, quality control of transports (forms of transport, time and temperature of the samples transported) and samples (presence of hemolysis and clots and volume of the samples) and qualitative results (number of positive, negative and indeterminate tests).

Descriptive and Statistical Analysis

Descriptive analysis was performed to characterize the study labs and quality control measurements. Categorical variables were compared using a two-sided Pearson's chi-square test (Yates correction) or the Fisher's two-tailed test in 2x3 or 2x2 tables, respectively. Continuous variables were tested for Gaussian distribution using the D'Agostino-Pearson test. The median values with interquartile ranges (IQR) were used as measures of central tendency and dispersion, respectively. The comparisons of values between two groups of data were performed using a Mann-Whitney U test. Spearman's correlation test was carried out. Data analysis was performed using SPSS Statistics for Windows (IBM Corp. v.25), GraphPad Prism (Scientific Software, v.8) and JMP Pro (SAS Institute Inc, v. 14). Differences with p-value <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

QuantIFERON-TB Gold Plus Implementation

The QFT-Plus implementation process started with the checklist provided by QIAGEN Corp. The five laboratories proceeded with the acquisition of equipment (micropipettes, 37°C incubator, centrifuge, refrigerator, freezer -20°C, microplate washer, microplate reader and computer), reagents (ultrapure dH₂O and cleaning solutions), consumables (tips, microtubes and solution reservoir), QFT-Plus Tube kit and QFT-Plus ELISA kit. Subsequently, laboratory technicians took the good clinical laboratory practices (GCLP) and were trained on the steps of collecting, transporting, incubating and processing samples for laboratory tests. Finally, QFT-Plus ELISA kit assay was performed, and a pilot test was carried out, with the objective of including improvement strategies to initiate the study protocol (**Figure 1**).

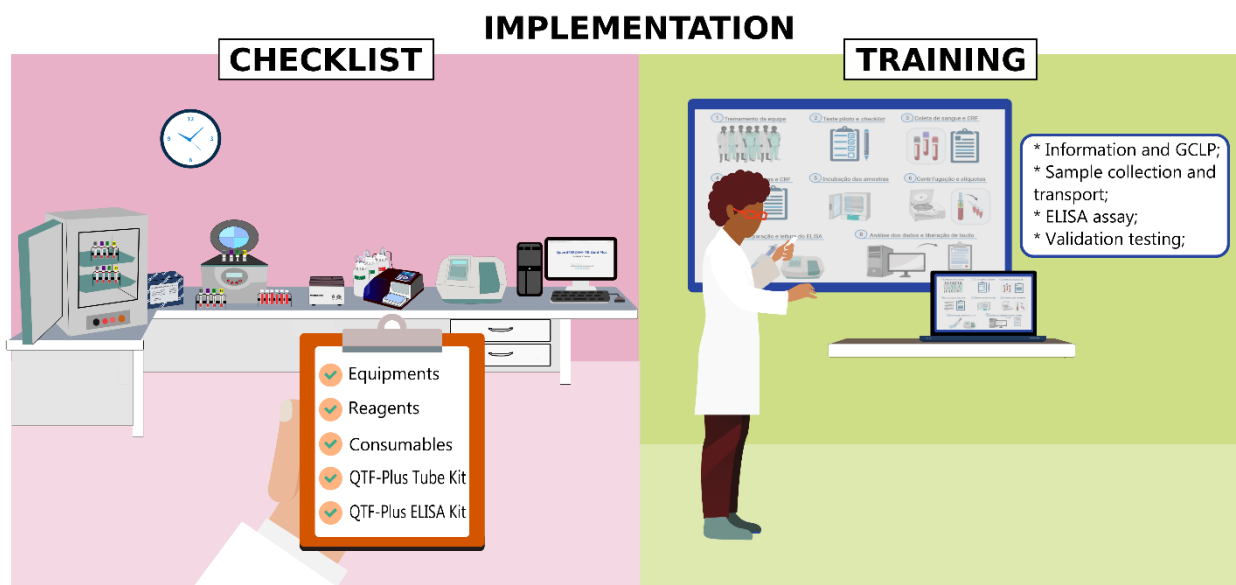


Figure 1: Description from implementation of QFT-Plus / interferon-gamma release assay (IGRA) in the study.

QuantIFERON-TB Gold Plus under routine conditions

The laboratories started recruiting patients and collecting samples under routine conditions. This step occurred prior organization collecting station, taking into account the organization of the environment and the tubes to be used in the QFT-Plus test. These tubes must be stored at a controlled temperature (4°C to 25°C), being removed for immediate use only. In addition, the need to use the tubes is reinforced, following the manufacturer's

recommendations regarding the collection order so that there is no reflection in the results, the Nil tube being collected first, followed by the TB1, TB2 and Mitogen tubes. The tubes containing the samples went through a homogenization process by inversion, where all the biological material collected must come into contact with the inner surface of the tube (L-motion with exactly 10 inversions). Finally, QFT-Plus Tubes must be packed in refrigerated boxes, with temperatures ranging from 17°C to 27°C for transfer to the sample processing site (**Figure 2**).

In our study, two settings collection, transportation and processing of samples were performed. *Setup A*: contains site 1 and 2, characterized by performing the collection and processing of samples in the same place, with collection room and laboratory coexisted within the same site. Thus, the professional responsible for collecting and organizing the samples can transport the sample to the laboratory, without requiring a vehicle (bicycle, motorcycle or car) transport of samples (**Figure 2A**); *Setup B*: contains site 3, 4 and 5, characterized by performing the collection and processing of samples in distinct place, with the need for external transportation and thus greater demand for time, organization and attention so that there is no excessive vibration. This setup requiring a vehicle (bicycle, motorcycle or car) transport of samples (**Figure. 2B**).

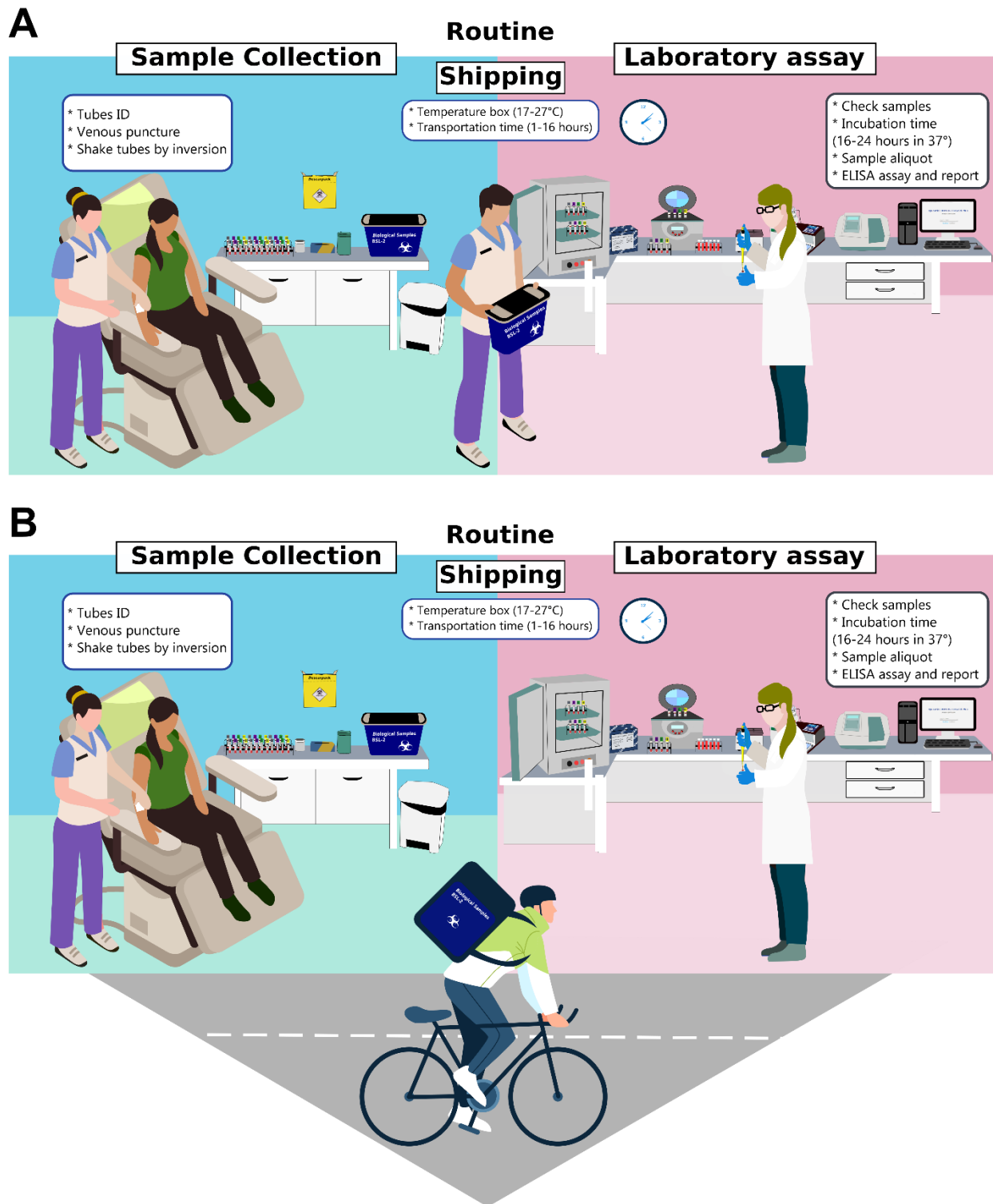


Figure 2: Different routine conditions for QFT-Plus / interferon-gamma release assay (IGRA) sample collection and processing in the study. A) Setup A: contains Site 1 and 2, characterized by performing the collection and processing of samples in the same place. B) Setup B: contains Site 3, 4 and 5, characterized by performing the collection and processing of samples in distinct place.

When arriving in labs, samples must pass through a check with respect to transport time and temperature, tube ID, beyond the volume evaluation and the presence of hemolysis or clots.

Finally, the samples are processed, incubated at 37°C for 20 hours, the aliquots are prepared, and the plasma samples are frozen at -20°C until the QFT-Plus ELISA is performed.

QuantIFERON-TB Gold Plus results under routine conditions in two settings

Figure 3 summarize the QFT-Plus results under routine conditions in Setup A-B (**Figure 3A**) and sites 1-5 (**Figure. 3B**). These results were obtained after the QFT-Plus ELISA assays were performed by the teams of the sites. For this, the aliquots containing the samples were thawed and used only once. In addition to the recommendations indicated by the manufacturer, the laboratories underwent quality control with the results being validated by an external laboratory. It is possible to observe that setup B has a higher percentage of indeterminate results, mainly in the first years of implementation of QFT-Plus. In additional, the number of samples changes overtime for each setup, as follow: 2016 (Setup A = 190; Setup B = 173), 2017 (Setup A = 366; Setup B = 258), 2018 (Setup A = 505; Setup B = 471), 2019 (Setup A = 570; Setup B = 333). Note also that over the years of implementation, this percentage tends to decrease. This can be associated with the learning process of the sites.

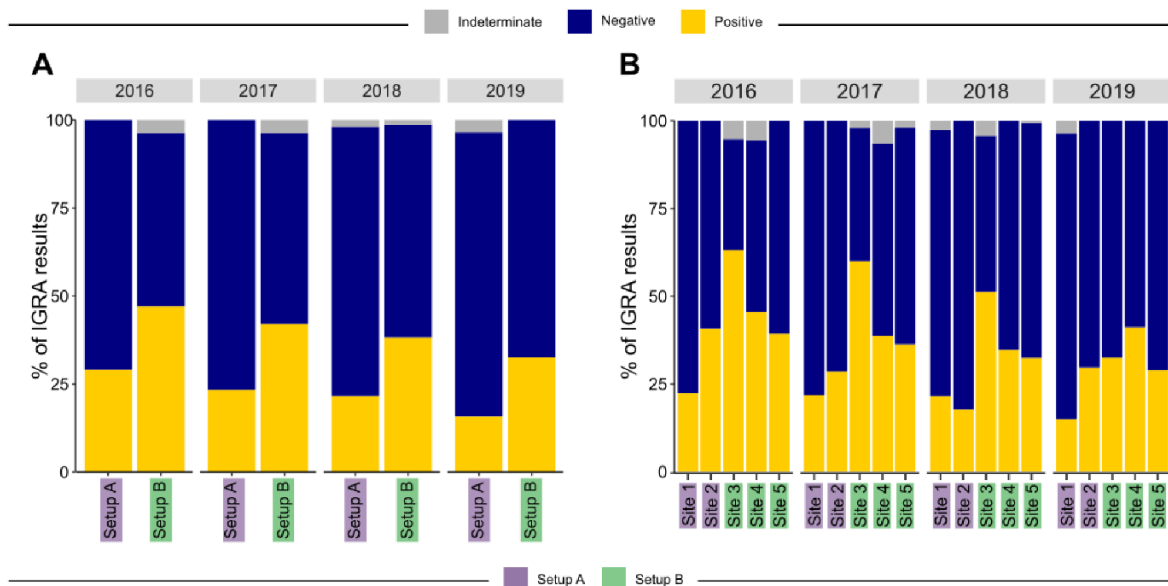


Figure 3: Frequencies of QFT®-Plus / IGRA results in each Setup and Site stratified by year in period of study. A) The sites are grouped by Setup A (purple rectangles, site 1 and 2) and Setup B (green rectangles, site 3, 4 and 5). B) Results stratified by site.

Non-conformities in QuantiFERON-TB Gold Plus assays

During the QFT-Plus implementation process, several problems were detected, generating non-conformities, such as samples without ID, transport with temperature outside the established standard (wrong temperature), sample leakage and among others (e.g. transport box change, coagulated samples or without minimum transport conditions). The percentage of non-conformities is shown in **Figure 4**.

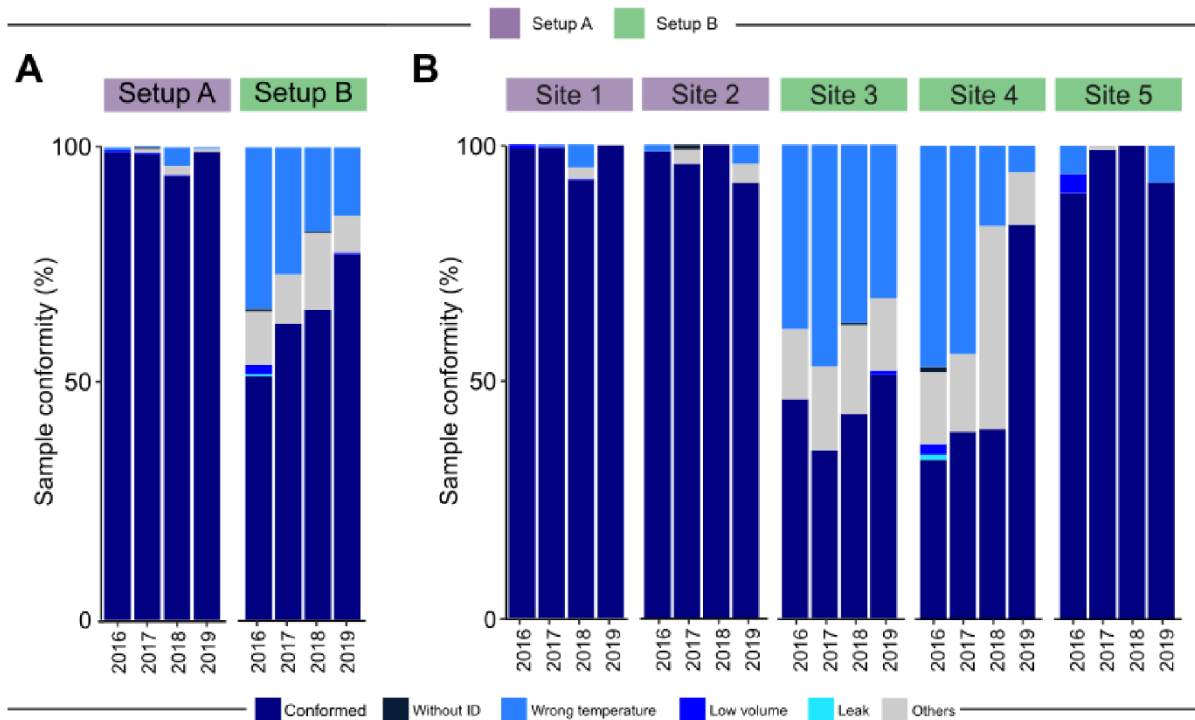


Figure 4: Frequencies of conformities and non-conformities of samples in each Setup and Site stratified by year in period of study. A) The sites are grouped by Setup A (purple rectangles, site 1 and 2) and Setup B (green rectangles, site 3, 4 and 5). B) Results stratified by site.

The wrong temperature and other§ non-conformities were registered significantly on the Setup B websites (**Supplementary Table 1**). These results are probably due to conditions related to the collection and transportation of samples, since Setup B needed external sample transport. In addition, these gaps generated learning opportunities for teams, which over the years of implementation, decreased the percentage of reported non-conformities.

Supplementary Table 1: Non-conformities stratified by year in period of study.

Non-Conformities	Year	Setup A*	Setup B	p-value#
Without ID, n (%) [£]	2016 [¥]	0 (0)	1 (0.6)	0.96
	2017	0 (0)	1 (0.4)	1.00
	2018	0 (0)	1 (0.2)	0.97
	2019	0 (0)	0 (0)	1.00

Low volume, n (%)	2016	1 (0.5)	4 (2.3)	0.31
	2017	1 (0.3)	0 (0)	1.00
	2018	1 (0.2)	0 (0)	1.00
	2019	0 (0)	1 (0.3)	0.78
Wrong temperature, n (%)	2016	1 (0.5)	67 (38.7)	< <i>0.001</i>
	2017	1 (0.3)	77 (29.8)	< <i>0.001</i>
	2018	20 (4.0)	92 (19.5)	< <i>0.001</i>
	2019	2 (0.4)	51 (15.3)	< <i>0.001</i>
Other [§] , n (%)	2016	1 (0.5)	22 ((12.7)	< <i>0.001</i>
	2017	3 (0.8)	30 (11.6)	< <i>0.001</i>
	2018	10 (2.0)	84 (17.8)	< <i>0.001</i>
	2019	3 (0.5)	28 (8.4)	< <i>0.001</i>

*Setup A: contains Site 1 and 2, characterized by performing the collection and processing of samples in the same place. Setup B: contains Site 3, 4 and 5. It is characterized by performing the collection and processing of samples in distinct place; #Data were compared between the Pearson's χ^2 test. Bold and italic font indicates statistical significance. [¥]The number of samples changes overtime for each Setup, as follow: 2016 (A = 190; B = 173), 2017 (A = 366; B = 258), 2018 (A = 505; B = 471), 2019 (A = 570; B = 333). [£]Data are shown as number (n) and frequency (percentage). [§]Other: Transport Box Change, coagulated samples or without minimum transport conditions.

Wrong temperature is the main Non-conformities in QuantiFERON-TB Gold Plus assays

Wrong temperature is the main non-conformity identified in study. When the occurrence is observed over the quarters of the evaluated years, it is noted that they occurred mainly in the months with the highest temperatures on the sites, such as spring and summer 3rd, 4th and 1st quarter (Figure 5). In addition, there is a decrease in this non-conformity over the years.

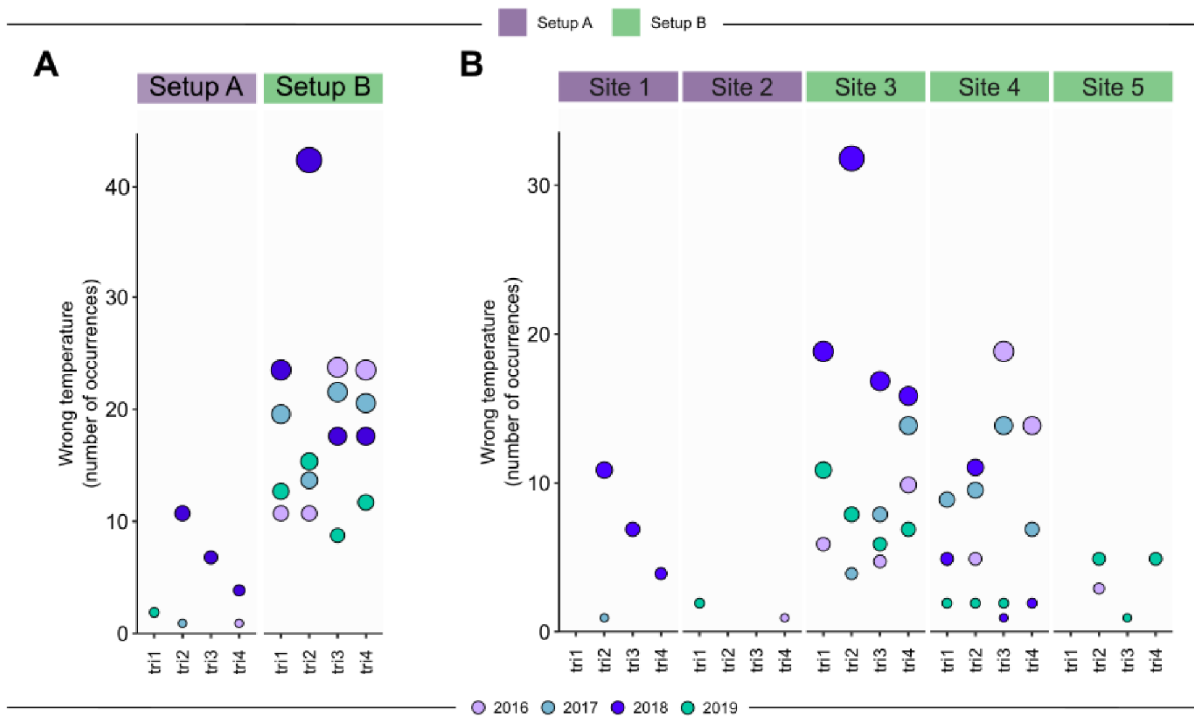


Figure 5: Number of occurrences of the non-conformity “wrong temperature” in each Setup and Site stratified by year in period of study. A) The sites are grouped by Setup A (purple rectangles, site 1 and 2) and Setup B (green rectangles, site 3, 4 and 5). B) Results stratified by site.

Dynamics of the time and temperature between collection and processing of QuantiFERON-TB Gold Plus samples

The distance between the collection site and the sample processing laboratory directly influenced the time and the temperature variation during transportation (**Table 1**). Setup A showed a significantly shorter time between sending and receiving the samples, influencing the temperature variation (delta), which was also significantly less.

Table 1: Time and temperature quality control measurements by year in period of study.

Parameters	Year	Setup A*	Setup B	p-value#
Time between sending vs receiving, median [IQR] [‡]	2016 [‡]	55.8 [20.1-75.1]	140.0 [102.0-176.0]	< 0.001
	2017	58.7 [22.2-82.8]	121.0 [83.5-155.0]	< 0.001
	2018	61.8 [25.1-90.1]	89.0 [29.0-164.0]	< 0.001
	2019	49.5 [20.1-66.1]	135.0 [96.0-171.0]	< 0.001
Temperature °C (sending samples), median [IQR]	2016	19.6 [18.1-21.2]	17.8 [16.0-19.1]	< 0.001
	2017	21.9 [19.6-24.1]	18.0 [16.0-19.5]	< 0.001
	2018	21.5 [19.3-23.8]	18.3 [16.8-19.8]	< 0.001
	2019	20.6 [19.0-22.2]	18.1 [16.6-19.2]	< 0.001
Temperature °C (receiving samples), median [IQR]	2016	20.1 [18.8-21.4]	19.6 [17.9-21.6]	< 0.001
	2017	22.1 [20.6-24.1]	20.7 [19.5-22.9]	< 0.001
	2018	21.9 [20.0-23.9]	20.4 [18.6-22.9]	< 0.001
	2019	20.7 [19.5-22.1]	20.5 [18.9-22.6]	< 0.001
Delta Temperature °C (receiving x sending, median [IQR])	2016	0.54 [0.0-0.8]	1.82 [0.0-3.7]	< 0.001
	2017	0.26 [0.0-0.1]	2.72 [1.2-4.1]	< 0.001

2018	0.37 [0.0-0.4]	2.06 [0.9-4.1]	< 0.001
2019	0.15 [0.0-0.2]	2.35 [1.1-4.3]	< 0.001

*Setup A: contains Site 1 and 2, characterized by performing the collection and processing of samples in the same place. Setup B: contains Site 3, 4 and 5. It is characterized by performing the collection and processing of samples in distinct place; #Data were compared between the setups using the Mann-Whitney U test. Bold and italic font indicates statistical significance. ¥The number of samples changes overtime for each Setup, as follow: 2016 (A = 190; B = 173), 2017 (A = 366; B = 258), 2018 (A = 505; B = 471), 2019 (A = 570; B = 333). £Data are shown as median and interquartile range (IQR).

It is possible to observe that both Setups had similar sending and receiving temperatures (Figure 6). Although within the established standard, Setup A showed a significantly higher temperature for both sending and receiving. Despite this, the temperature variation (delta) was significantly greater in Setup B. This can also be seen when analyzing the data by site (Supplementary Figure 2).

Over the years of implementation, it is noted that the variation in time between sending and receiving tends to decline, although this fact is not so evident in Setup B. The decrease in time variation is possibly due to the fact that the professionals inserted in the service adapt positively to the flow (collection, sending and processing) with the implementation of the test on the sites.

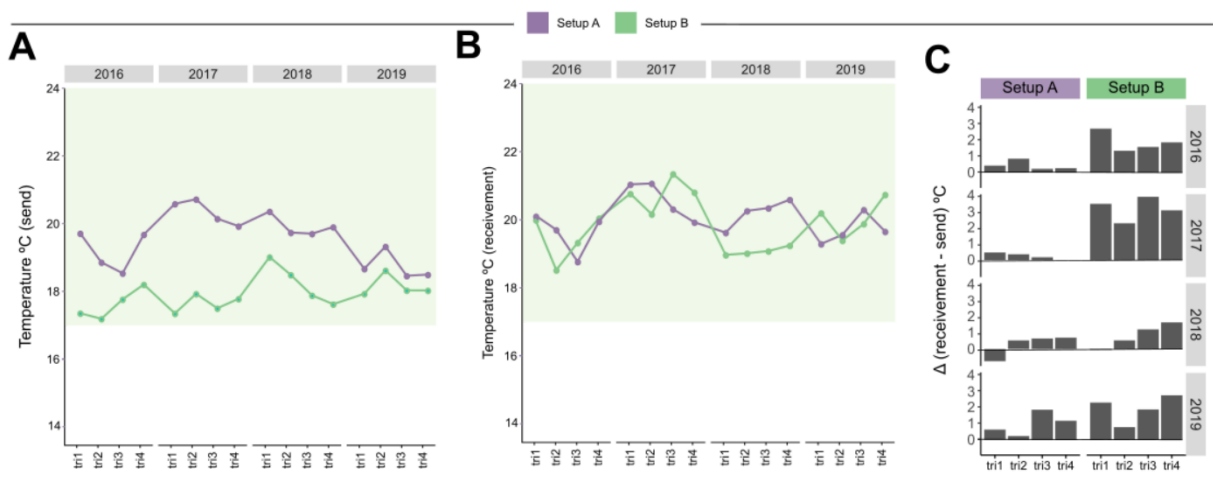
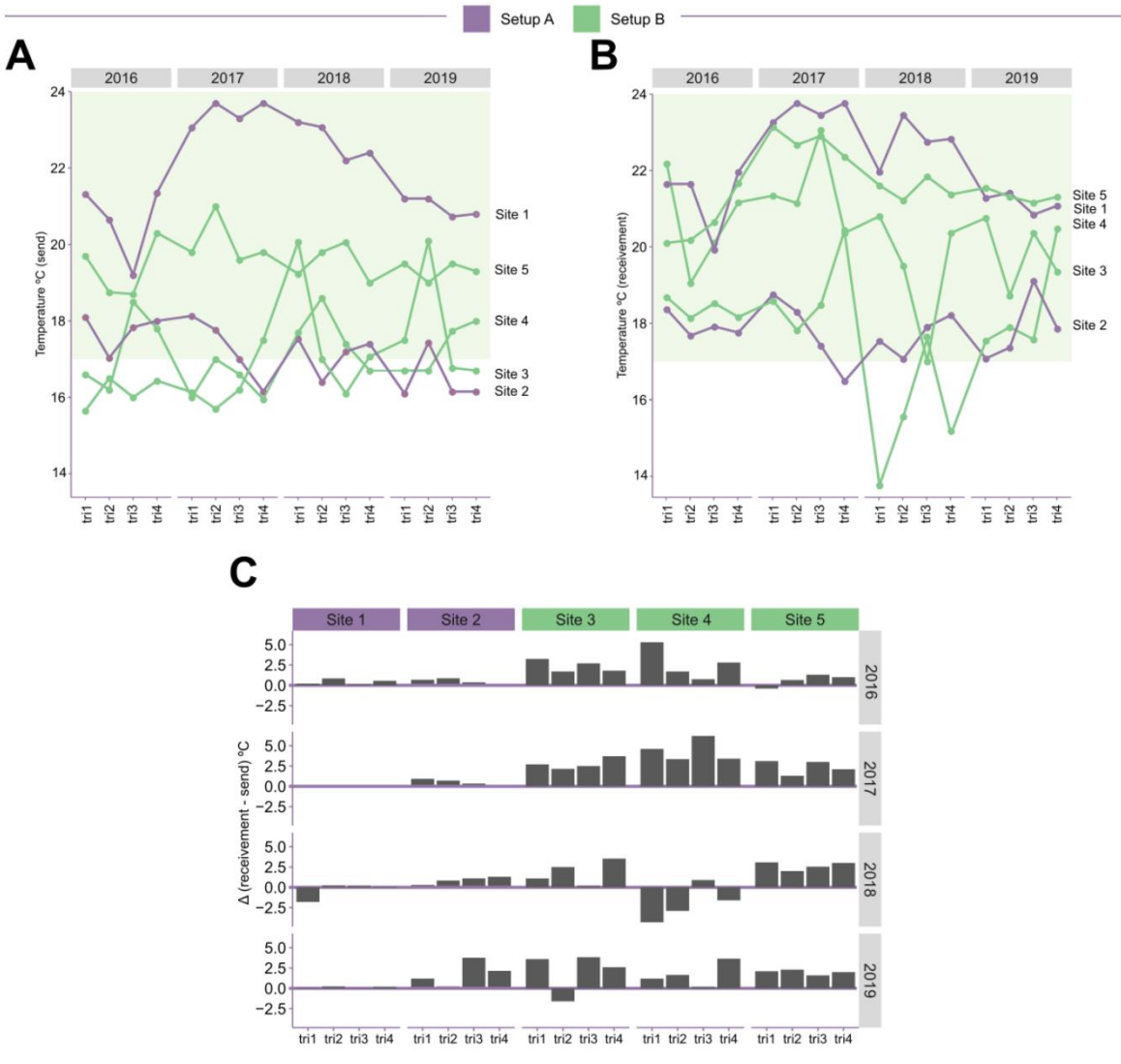


Figure 6: Dynamics of the temperature of sending and receiving samples, Besides the delta temperature variation over time in each Setup stratified by trimester and year in period of study. A) Average Temperature (°C) of sending samples calculated by trimester and year in each setup. B) Average Temperature (°C) of receiving samples calculated by trimester and year in each setup. C) The difference between receiving and sending temperature (delta) was calculated for each trimester and year in each setup. Purple lines indicate Setup A and green lines indicate Setup B. The light green block

indicates the limit accepted by the IGRA test manufacturer as acceptable for the storage and handling of the samples (17-27°C).



Supplementary Figure 2: Dynamics of the temperature of sending and receiving samples, Besides the delta temperature variation over time in each Setup and Site stratified by trimester and year in period of study. A) Average Temperature (°C) of sending samples calculated by trimester and year in each Setup and Site. B) Average Temperature (°C) of receiving samples calculated by trimester and year in each Setup and Site. C) The difference between receiving and sending temperature (delta) was calculated for each trimester and year in each Setup and Site. Purple lines indicate Setup A and green lines indicate Setup B. The light green block indicates the limit accepted by the IGRA test manufacturer as acceptable for the storage and handling of the samples (17-27°C).

Finally, a correlation analysis was performed between the variation of time and temperature (delta receiving x sending). In this analysis it was possible to notice that the

temperature delta is directly positive correlated with the time delta and that this variation was expressive in Setup B (Figure 7).

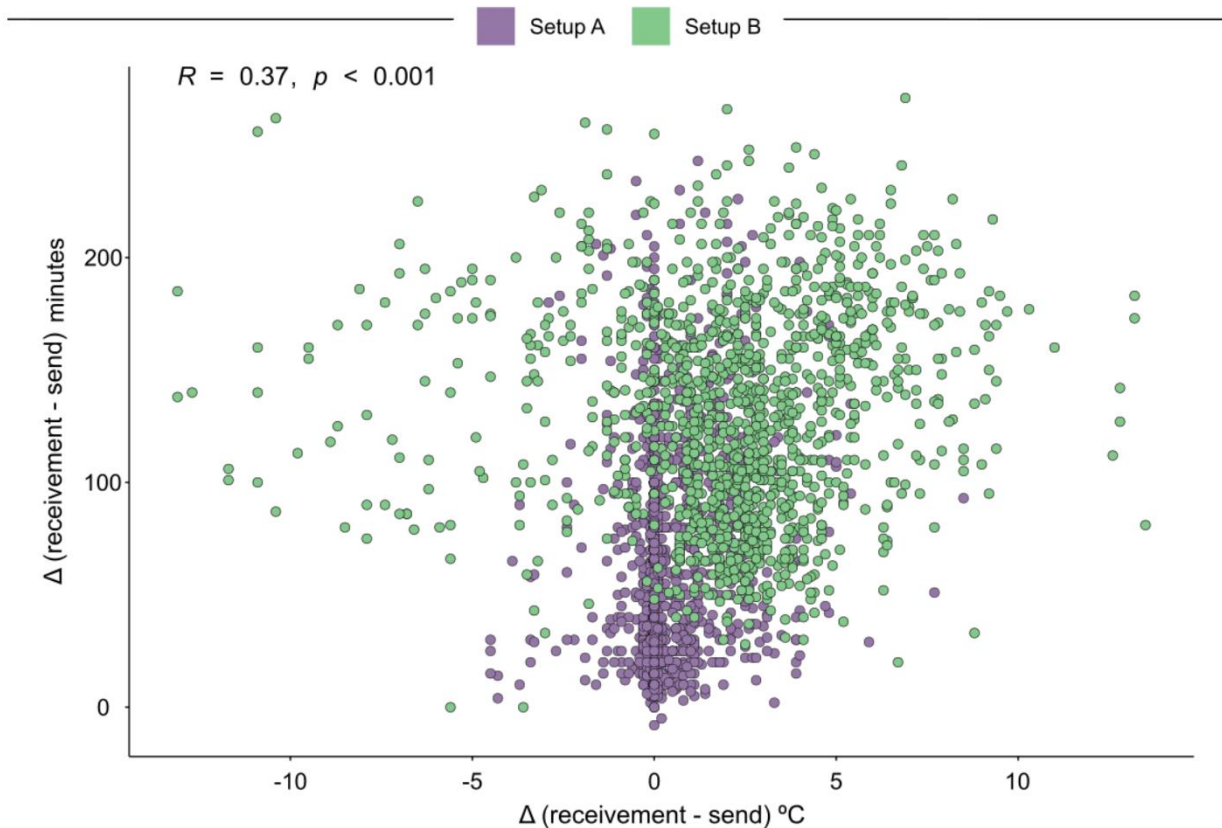


Figure 7: Correlation between delta temperature variation and delta time variation of study. Purple dots indicate Setup A and green dots indicate Setup B.

DISCUSSION

During the implementation process, several gaps were identified, even following all the recommendations of the manufacturer of the QFT-Plus assay. Initially, the laboratories identified problems in relation to acquisition of equipment, reagents and consumables. The equipment had to be purchased through the sites, generating additional costs. Furthermore, microplate washer had problems at the beginning of the ELISA assays, requiring corrective maintenance. QFT-Plus Tube kit and QFT-Plus ELISA kit were imported and generated problems in the logistics of delivery to the sites. The training of laboratory technicians without experience in samples collection, transporting and processing, with ELISA assays, was straight forward and the learning curve was quick, despite preanalytical errors being identified after the start of the study. Pre-analytical errors have important implications for the reproducibility and accuracy of IGRAs, needing to standardize the pre-analytical steps, as shown previously (15).

The sites standardized the preventive maintenance process of the equipment, in order to minimize the problems to be presented. The delivery of the QFT-Plus Tube and ELISA kits was directed to a website in Rio de Janeiro, which it distributed to other laboratories, mitigating import and logistics problems. In addition, laboratory technicians took the good clinical practices (GCP) and good clinical laboratory practices (GCLP). The step of collection, transport and processing of the samples started to be monitored via case report form (CRF). The lessons learned at this stage were important to create mechanisms for tracking non-conformities, since the use of CRFs is indicated for monitoring in clinical trials, but routine conditions in laboratories can be adapted (16).

The sample collection, transport and processing settings (Setup A and B) present in the study influenced the results of the QFT-Plus. It was observed that Setup B presented a higher percentage of indeterminate results, probably due to the longer time between the collection and processing of the samples, in addition to other pre-analytical variables evaluated here (time and temperature of transport, ID of the tubes, packaging of the samples, among others). It is important to ensure that the laboratory technicians involved in these steps are comfortable with performing the QFT-Plus, including simple tasks such as controlling the temperature of the shipping boxes, identifying non-conformities, minimizing errors and identifying problems in results to be generated. It is recommended to include in the QFT-Plus implementation planning a period of adaptation and short retraining, directed at the critical stages of sample collection, transport and processing, with the aim of gradually minimizing or extinguishing non-conformities and pre-analytical errors. This learning can assist in the quality control of test results and performance, since the reproducibility of IGRA can be influenced by these factors (17).

Biological samples can have different performances with respect to the quantity of certain analytes and, based on this, we must seek the identification of points that interfere in the variation of test results. The laboratory routine can have different points that can bring variations in results, being, in clinical practice, identified mainly as different processing rates, variations in processing rates throughout the month and variations of factors related to the environment (such as temperature) throughout the year (18)

The reproducibility of the test depends directly on the training of the team, since variations in the "operator" for the collection, homogenization and performance of the test can impact the result. Therefore, the standardization of quality control in the clinical and laboratory spheres is essential so that there are no significant impacts on the result. In addition, structural variations between different laboratories can influence the appearance of indeterminate results (17,19).

With regard to immunological molecules that can be released and consumed quickly (in vitro), the delay in the start of the incubation of the samples can interfere in the quantification of IFN- γ levels, leading to a decrease up to 0.24 IU / mL after 6 hours. (15,17). Different incubation times, longer or shorter, without a specific pattern, can be a possible interferer and influence the appearance of indeterminate results. Therefore, it is always recommended to follow the manufacturer's guidelines (17,19). The quantity of final volume of biological sample must always be respected, and it is not possible to use volumes smaller or larger than what was recommended for the test. Due to the amount of "biological stimulus" available per tube, the amount of IFN- γ released at the end of the test may have interference due to variation in the sample volume used (17,20,21).

The expansion of the use of IGRAs, such as the QFT-Plus, must be well planned, with negotiations with the manufacturer regarding the logistics of delivery of the kits in areas of difficult access. In addition, the sample collection, transport and processing settings must be evaluated, with the aim of mitigating pre-analytical errors that may interfere with the test results. Training with laboratory technicians is extremely important, since regular training to stakeholders develops a sense of responsibility towards reporting non-conformities and quality laboratory data reporting semester contribute to the improvement of routine after implementation. Finally, we believe that some of the problems identified in this pilot study can assist laboratories wishing to implement this technique, in addition to helping manufacturers IGRAs to provide effective technical support, increasing the speed in the implementation of new technologies by countries with a high burden of TB.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the study participants. We also thank the teams of clinical and laboratory platforms of RePORT Brazil. A special thanks to Elze Leite (FIOCRUZ, Salvador, Brazil), Eduardo Gama (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil), Elcimar Junior (FMT-HVD, Manaus, Brazil), and Hilary Vansell (VUMC, Nashville, USA) for administrative and logistical support.

FINANCIAL SUPPORT:

The study was supported by the Intramural Research Program of the Fundação Oswaldo Cruz, Intramural Research Program of the Fundação José Silveira, Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT) - Secretaria de Ciência e Tecnologia (SCTIE) - Ministério da Saúde (MS),

Brazil [25029.000507/2013-07 to V.C.R.] and the National Institutes of Allergy and Infectious Diseases [U01-AI069923 and U01-AI115940]. BKSC received a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas. MAP received a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Finance code: 001). BBA and ALK are senior investigators from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

DISCLAIMER

The funders of the study had no role in study design, data analysis, data interpretation, or writing of the report. All authors had access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

DECLARATION OF INTERESTS

All authors: none reported.

REFERENCES

1. WHO. WHO | Global tuberculosis report 2019. World Health Organization. 2020.
2. World Health Organization. WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis Treatment. Who. 2019.
3. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. BM da S. Técnicas de Aplicação e Leitura da Prova Tuberculínica. 2014;1º:56.
4. Brasil. Manual de recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde. 2019.
5. Pai M, Behr M. Latent Mycobacterium tuberculosis Infection and Interferon-Gamma Release Assays. *Microbiol Spectr*. 2016;
6. Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. 2010.
7. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000.
8. Ferrara G, Losi M, Meacci M, Meccugni B, Piro R, Roversi P, et al. Routine hospital use

of a new commercial whole blood interferon- γ assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;

9. Theel ES, Hilgart H, Breen-Lyles M, McCoy K, Flury R, Breeher LE, et al. Comparison of the QuantiFERON-TB gold plus and QuantiFERON-TB gold in-tube interferon gamma release assays in patients at risk for tuberculosis and in health care workers. *J Clin Microbiol*. 2018;
10. BRASIL M da S. Protocolo de vigilância da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* no Brasil. Ministério da Saúde. 2018.
11. Arriaga MB, Amorim G, Queiroz ATL, Rodrigues MMS, Araújo-Pereira M, Nogueira BMF, et al. Novel stepwise approach to assess representativeness of a large multicenter observational cohort of tuberculosis patients: The example of RePORT Brazil. *Int J Infect Dis [Internet]*. 2021 Feb;103:110–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971220324528>
12. IBGE IB de GE. Mapa do clima no Brasil [Internet]. 2021 [cited 2021 Feb 17]. Available from: https://geoftp.ibge.gov.br/informacoes_ambientais/climatologia/mapas/brasil/Map_BR_clima_2002.pdf
13. (CDI) CDI. Dados do clima no Brasil [Internet]. 2021 [cited 2021 Feb 17]. Available from: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil-114/>
14. QIAGEN. QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-plus) ELISA package insert. Germantown, USA. 2017. Available at: <https://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/10/QFT-plus-ELISA-IFU-L1095849-R02.pdf> Accessed on 08/03/2019.
15. Doberne D, Gaur RL, Banaei N. Preanalytical Delay Reduces Sensitivity of QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay for Detection of Latent Tuberculosis Infection. *J Clin Microbiol [Internet]*. 2011 Aug 1;49(8):3061–4. Available from: <https://jcm.asm.org/content/49/8/3061>
16. Gliklich RE, Dreyer NA, Leavy MB. Registries for Evaluating Patient Outcomes: A User's Guide [Internet]. 3rd ed. Rockville (MD), editor. Interfacing Registries with Electronic Health Records. Agency for Healthcare Research and Quality; 2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24945055/>
17. Tagmouti S, Slater M, Benedetti A, Kik S V., Banaei N, Cattamanchi A, et al. Reproducibility of interferon gamma (IFN- γ) release assays a systematic review. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(8):1267–76.
18. FRASER CG. Biological variation: from principles to practice. Press A, editor.

Washington, DC; 2001.

19. Whitworth WC, Hamilton LR, Goodwin DJ, Barrera C, West KB, Racster L, et al. Within-Subject Interlaboratory Variability of QuantiFERON-TB Gold In-Tube Tests. PLoS One. 2012;
20. G. H. Mazurek , W. C. Whitworth DJG. Affect Of Blood Collection Time On Quantiferon®-Tb Gold In-Tube Test Variability. In: IMMUNODIAGNOSTICS FOR LATENT TUBERCULOSIS INFECTION AND TUBERCULOSIS. 2012.
21. Gaur RL, Pai M, Banaei N. Impact of blood volume, tube shaking, and incubation time on reproducibility of Quantiferon-TB gold in-tube assay. J Clin Microbiol. 2013;51(11):3521–6.

4 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

Este estudo, que fez parte de uma pesquisa maior, conduzida em cinco sites do RePORT-Brasil. Apesar de termos descritos importantes informações sobre o processo de implementação, algumas lacunas foram observadas, principalmente no processo de rastreio dos resultados indeterminados. Apesar das limitações, apontamos que este estudo é pioneiro e realizado em regiões onde há uma alta prevalência de tuberculose, que poderiam contar com essa técnica para ampliar o rastreio da ILTB e auxiliar na diminuição dos casos ativos e transmissão da TB. No entanto, mais estudos para avaliar o desempenho do teste na rotina laboratorial são importantes a fim de sugerir novas informações para aplicação do teste em laboratórios públicos com uma demanda alta de pacientes com TB.

5 CONCLUSÃO

Durante o processo de implementação do teste algumas lacunas foram identificadas, apesar das equipes seguirem as recomendações do fabricante do ensaio QFT-Plus. Por ser um ensaio que não era da rotina laboratorial, os profissionais identificaram alguns problemas em relação a aquisição de insumos, reagente, e equipamentos, e quais de fato dos equipamentos não podiam faltar no processamento. As equipes a partir da experiência adquirida com ensaio IGRA foi identificando os erros e buscando alternativas para melhoria da implantação do teste. A importância da identificação de erros na fase pré-analítica minimizou resultados indeterminados do teste. A utilização dos POPs e formulários de rastreamento foi importante para o controle de qualidade, fornecendo dados descritivos importantes do ensaio e diminuindo a taxa de erros no processamento.

Os centros onde a coleta e processamento eram feitos no mesmo local, obteve-se um menor número de inconformidades, e resultados indeterminados nos testes. Em um cenário ideal seria a melhor forma de implementar o teste, porém, em locais onde coleta e processamento são em unidades diferentes também pode ser viável.

Ao longo dos anos do estudo, observou-se uma diminuição dos resultados indeterminados, isso pode estar relacionado com a experiência da equipe em relação ao teste, de como identificar os pontos que interferiam no ensaio e corrigindo-os de uma maneira mais rápida e eficaz.

Assim, este estudo corrobora na descrição das dificuldades e resoluções sobre a implementação do teste, auxiliando novos laboratórios que queiram implementar esta técnica com qualidade, além de auxiliar os fabricantes de IGRAs a fornecerem suporte técnico, aumentando a velocidade na implementação de novas tecnologias em países com uma alta

carga da tuberculose.

6 REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

1. Organization WH. WHO TB burden report 2018. Vol. 63, World Health Organization. 2018. 476 p.
2. World Health Organization. WHO | WHO End TB Strategy. World Health Organization. 2015.
3. Colangeli R, Gupta A, Vinhas SA, Chippada Venkata UD, Kim S, Grady C, et al. Mycobacterium tuberculosis progresses through two phases of latent infection in humans. *Nat Commun.* 2020;11(1):1–10.
4. Auguste P, Tsertsvadze A, Pink J, Court R, McCarthy N, Sutcliffe P, et al. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):1–13.
5. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet.* 2000;356:1099–104.
6. Ferrara G, Losi M, Meacci M, Meccugni B, Piro R, Roversi P, et al. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon- γ assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;
7. Infection M, States U. Guidelines for Using the QuantiFERON[®] TB Gold Test for Detecting Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports Guidelines for the Investigation of Contacts of Persons with Infectious Tuberculosis Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC Guidelines for Using the QuantiFERON[®] -TB Gold Test for Detecting Mycobacterium tuberculosis Infection , United States INSIDE : Continuing Education Examination tment of health and human ser. 2015;(January).
8. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Vernon A. Guidelines for Using the QuantiFERON[®] -TB Gold Test for Detecting Mycobacterium tuberculosis Infection , United States Linked references are available on JSTOR for this article : Guidelines for Using the QuantiFERON[®] -TB Gold Test for Detecting Mycobact. 2016;(Cdc).
9. Houben RMGJ, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLoS Med.* 2016;13(10):1–13.

10. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Prim.* 2016;2.
11. Pai M, Behr M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection and Interferon-Gamma Release Assays. *Microbiol Spectr.* 2016;
12. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *Lancet.* 2019;393(10181):1642–56.
13. Calder KM, Horwitz MA. Identification of iron-regulated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* and cloning of tandem genes encoding a low iron-induced protein and a metal transporting ATPase with similarities to two-component metal transport systems. *Microb Pathog.* 1998;24(3):133–43.
14. Barnes DS. Historical Perspectives on the Etiology of Tuberculosis. *Clin Perinatol.* 2000;33(2):431–40.
15. Bange FC, Brown AM, Jacobs WR. Leucine auxotrophy restricts growth of *Mycobacterium bovis* BCG in macrophages. *Infect Immun.* 1996;64(5):1794–9.
16. Barry CE. Preclinical candidates and targets for tuberculosis therapy. *Curr Opin Investig Drugs.* 2001;2(2):198–201.
17. Chan, John; Xing, Yun; Magliozzo, Richard S; Barry RB. Killing of Virulent *Mycobacterium tuberculosis* by Reactive Nitrogen Intermediates Produced by Activated Murine Macrophages. *Med Biol.* 1992;175(4):1111–22.
18. McDonough KA, Kress Y, Bloom BR. The interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages: A study of phagolysosome fusion. *Infect Agents Dis.* 1993;2(4):232–5.
19. J.D. M, K.H. ZUB, E.J. M-E, A. M, B. C, W.T. C, et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature.* 2000;406:735.
20. BRASIL M da S. Protocolo de vigilância da infecção latente pelo *Mycobacterium tuberculosis* no Brasil. Ministério da Saúde. 2018.
21. Dutta NK, Karakousis PC. Latent Tuberculosis Infection: Myths, Models, and Molecular Mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014;78(3):343–71.
22. Sester M, Van Leth F, Bruchfeld J, Bumbacea D, Cirillo DM, Dilektasli AG, et al. Risk assessment of tuberculosis in immunocompromised patients: A TBNET study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(10):1168–76.
23. Petruccioli E, Scriba TJ, Petrone L, Hatherill M, Cirillo DM, Joosten SA, et al. Correlates of tuberculosis risk: Predictive biomarkers for progression to active tuberculosis. *Eur Respir J.* 2016;48(6):1751–63.
24. Brasil. Manual de recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério

da Saúde. 2019.

25. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Brasil Livre da Tuberculose: Evolução dos Cenários Epidemiológicos e Operacionais da Doença. Bol Epidemiológico. 2019;50(9):18.
26. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2017 Document WHO/HTM/TB/2017.23. Geneva. 2017. 2017 p.
27. Viana-niero C, Leão SC. Limitations of the use of the mtp40 fragment as a marker of differentiation between Mycobacterium tuberculosis and M . bovis. J bras pneumol. 2004;(13):498–500.
28. Ribeiro VL, Souza SO, Casagrande RA, Wouters ATB, Wouters F, Rolim VM, et al. Infecção por Mycobacterium sp. Em herbívoros selvagens de cativeiro no Rio Grande do Sul: Estudo retrospectivo e detecção imuno-histoquímica (2003-2015). Pesqui Vet Bras. 2017;37(1):58–65.
29. Flynn JL, Chan J. IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS . Annu Rev Immunol. 2001;
30. Campos HS. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas TT - Tuberculosis: etiopathogenesis and clinical presentations. Pulmão RJ. 2006;15(1):29–35.
31. Brasil. Manual de recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Ministério da Saúde. 2011. 288 p.
32. Mortaz E, Varahram M, Farnia P, Bahadori M, Masjedi M. New Aspects in Immunopathology of Mycobacterium tuberculosis . ISRN Immunol. 2012;2012:1–11.
33. Silva L e, R J, Boéchat N. The resurgence of tuberculosis and the impact of the study of pulmonary immunopathogenesis. J Bras Pneumol. 2004;30(4):388–94.
34. BH C de I-U. Tuberculose Pulmonar. Sessões Clínicas. 2015;1–33.
35. Ruffino-Netto A, Kritski AL, Teixeira EG, Loredó CC dos S, Souza DN de, Trajman A. Influência do tamanho do frasco de tuberculina nos resultados da prova tuberculínica TT - Influence of vial size on the results of the tuberculin test. J Bras Pneumol. 2005;
36. Howard TP. Reading the Tuberculin Skin Test. Arch Intern Med. 1988;148(11):2457.
37. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. BM da S. Técnicas de Aplicação e Leitura da Prova Tuberculínica. 2014;1º:56.
38. Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Diagnóstico imunológico da tuberculose: Problemas e estratégias para o sucesso. J Bras Pneumol. 2007;33(3):323–34.
39. Menzies D, Pai M, Zwerling A. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. Ann Intern Med. 2008;149(3):177–84.

40. Ruffino-Netto A. Interpretação da prova tuberculínica. *Revista de Saude Publica*. 2006.
41. Arend SM, Geluk A, Van Meijgaarden KE, Van Dissel JT, Theisen M, Andersen P, et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect Immun*. 2000;68(6):3314–21.
42. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*. 1996;64(1):16–22.
43. Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. 2010.
44. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;
45. Passalent L, Khan K, Richardson R, Wang J, Dedier H, Gardam M. Detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: A head-to-head comparison of the T-SPOT.TB test, tuberculin skin test, and an expert physician panel. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;
46. Ltd OI. T SPOT. TB. 2016.
47. Theel ES, Hilgart H, Breen-Lyles M, McCoy K, Flury R, Breeher LE, et al. Comparison of the QuantiFERON-TB gold plus and QuantiFERON-TB gold in-tube interferon gamma release assays in patients at risk for tuberculosis and in health care workers. *J Clin Microbiol*. 2018;
48. Inc C. Clinicians guide to QuantiFERON-TB. 2001.
49. Elimination D of T. QuantiFERON-TB Gold Test. 2004.
50. Franken WPJ, Timmermans JF, Prins C, Slietman EJJ, Dreverman J, Bruins H, et al. Comparison of mantoux and QuantiFERON TB gold tests for diagnosis of latent tuberculosis infection in army personnel. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;
51. Inc C. Quantiferon-TB Gold In-Tube Package Insert. 2007.
52. Chien JY, Chiang HT, Lu MC, Ko WC, Yu CJ, Chen YH, et al. QuantiFERON-TB gold plus is a more sensitive screening tool than QuantiFERON-TB gold in-tube for latent tuberculosis infection among older adults in long-term care facilities. *J Clin Microbiol*. 2018;
53. Person AK, Pettit AC, Sterling TR. Diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection: an update. *Curr Respir Care Rep*. 2013;2(4):199–207.

54. Chiacchio T, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Pinnetti C, Sampaolesi A, et al. Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. *J Infect.* 2014;69(6):533–45.
55. Adekambi T, Ibegbu CC, Kalokhe AS, Yu T, Ray SM, Rengarajan J. Distinct effector memory CD4 + T cell signatures in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection, BCG vaccination and clinically resolved tuberculosis. *PLoS One.* 2012;7(4).
56. Chen J, Zhang R, Wang J, Liu L, Zheng Y, Shen Y, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis in HIV-infected patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6(10).

7 APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Responsáveis pelos Contatos com idade inferior a 18 anos – Coorte B) Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORT-Brasil)

Introdução: O (a) participante menor de idade pelo qual você é responsável legal está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa porque teve contato com alguém que foi diagnosticado com tuberculose (TB) pulmonar. A TB é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) em todo o mundo. Existe um tratamento eficaz para a maioria das pessoas que desenvolvem TB, entretanto a associação dos medicamentos para tratar TB pode ter efeitos tóxicos significativos, é longo (6 meses, no mínimo), e com o aumento dos casos de resistência aos medicamentos, cada vez mais difícil de curar. Sabe-se que algumas pessoas que se infectam com o Mtb adoececem, enquanto outras podem passar anos ou a vida inteira sem nunca adoecerem. Muitos pesquisadores vêm tentando entender porque isso acontece. Assim, um maior entendimento do adoecimento e do processo de cura é necessário. Para um maior conhecimento sobre esses fatores, esse estudo foi elaborado. O seu objetivo é coletar informações sobre a cura e não cura entre os pacientes doentes com tuberculose pulmonar e a ocorrência desta doença entre contatos, além de coletar amostras clínicas para o armazenamento em um biorrepositório (coleção de amostras biológicas armazenadas) para estudos futuros. Assim, esta pesquisa para a qual o participante menor de idade pelo qual você é responsável legal está sendo convidado também pretende coletar amostras de maneira bem padronizada de participantes doentes com TB pulmonar (doentes) e também de participantes que tiveram contato intenso (> 4 horas por semana) com pacientes doentes com TB pulmonar (contatos) para a formação do biorrepositório. Estas amostras poderão então ser disponibilizadas para uma variedade de finalidades, incluindo o desenvolvimento de testes diagnósticos, medicamentos novos e o estudo de biomarcadores (alguma característica especial da pessoa ou do Mtb) que se relacionem com a possibilidade de um novo remédio ou um novo regime de tratamento ser eficaz ou possam vir a prever o adoecimento ou a cura de uma pessoa. As amostras armazenadas no biorrepositório poderão ser utilizadas para estudos futuros relacionados à tuberculose que poderão incluir avaliações genéticas. Suas amostras serão usadas apenas para aprender mais sobre a TB e suas complicações. Futuros estudos que desejarem utilizar as amostras armazenadas no biorrepositório poderão solicitar o envio destas para análise no exterior. Tais estudos somente serão realizados após as aprovações éticas e regulatórias aplicáveis.

Descrição sumária do projeto: Este é um estudo que vai começar a partir da entrada do primeiro voluntário e visa observar o tratamento de pessoas doentes com TB pulmonar e o adoecimento ou não de seus contatos, além de obter e guardar amostras clínicas (escarro, urina, sangue) destes indivíduos que consentiram em participar da pesquisa. Este material ficará guardado no Instituto Bahiano de Reabilitação (IBR), gerenciado pelo Instituto Brasileiro para Investigação da Tuberculose (IBIT) (ambas são Instituições da Fundação José Silveira e estão localizadas em Salvador) por um período de até 10 anos. Se desejarmos armazenar o material por mais tempo, uma renovação desse período será solicitada às autoridades aplicáveis e o armazenamento só continuará se forem recebidas as devidas aprovações. As amostras coletadas poderão ser usadas futuramente para a avaliação e criação de novos testes para o diagnóstico da tuberculose, novos medicamentos e biomarcadores, porém agora só vamos guardar o material em lugar seguro. Este estudo tem uma duração prevista de pelo menos 48 meses. Serão recrutados 900 participantes com TB e 2700 contatos nas cidades do Rio de Janeiro, Salvador e Manaus. Para este estudo, contatos são aquelas pessoas que tiveram contato próximo (preferencialmente intradomiciliar), de no mínimo 4h/semana com pacientes doentes com TB pulmonar (com micobactéria no escarro ou cultura positiva para Mtb ou Xpert® MTB/RIF, que é um teste novo para detectar TB), nos últimos 6 meses após início dos sintomas do paciente. Para participar deste estudo, o paciente com TB com quem o menor de idade teve contato também deve estar participando do protocolo. A participação do(a) menor de idade neste estudo: A participação do(a) menor de idade nesse estudo consiste em fornecer amostras de sangue e urina para armazenamento antes do início do tratamento da infecção latente pelo Mtb em participantes com teste PPD \geq 5mm (mês 0), ou da observação naqueles que não querem fazer tratamento ou não tem indicação de tratamento (PPD \leq 5mm) e aos 6 meses (mês 6) ao final da observação ou tratamento da infecção pelo Mtb. Caso o(a) participante menor de idade tenha indicação de tratamento da TB latente, ele(a) será convidado(a) a se tratar aqui mesmo nesta instituição. Para isso faremos alguns exames para ver se ele(a) precisa desse tratamento tais como o PPD (prova tuberculínica), caso disponível, e a radiografia de tórax. Ele(a) fará também um hemograma e um teste antiHIV (vírus da imunodeficiência humana). Se ele(a) já for portador do HIV, um exame de contagem das suas células de defesa e exame de carga viral do HIV serão feitos, caso ele(a) não tenha feito nos últimos 6 meses. Para realizar esse acompanhamento na rotina será solicitado que ele(a) responda ao(á) médico(a) perguntas sobre a sua saúde e compareça às consultas agendadas pela rotina. Para fins desse protocolo ele(a) será agendado para o início (tempo 0) e seis meses após a definição de seu caso: contato com PPD reator (que tem indicação de tratamento preventivo para não ficar doente) ou contato com PPD

não reator (que não tem indicação de tratamento e será observado pela equipe do estudo e coletará apenas os exames listados aqui para este estudo). Além disso, a equipe do estudo vai querer saber como ele(a) está de saúde aos 12 (mês 12), 18 (mês 18) e 24 (mês 24) meses após a entrada no estudo e telefonará ou pedirá que venha a uma consulta. Se desconfiarmos que ele(a) possa estar com tuberculose, ele(a) será avaliado(a) por um(a) médico(a) e fará as mesmas coletas e procedimentos que já realizou no mês 0, início do estudo, além de coleta de escarro para diagnóstico e armazenamento. O PPD, também chamado pela equipe médica de prova tuberculínica, é um exame simples, que consiste numa pequena injeção dentro da pele do antebraço e leitura do resultado após 72h. Este exame detectará se o(a) menor de idade foi infectado pelo Mtb e se tem o que chamamos de tuberculose latente, quando a bactéria que causa a doença fica “dormindo” no organismo. Faremos a prova tuberculínica apenas caso tenha PPD disponível no Brasil para a realização do teste (às vezes o teste acaba). Caso contrário, saberemos que o menor de idade foi infectado(a) ou não pelo Mtb pelo exame de sangue IGRA (teste de liberação de Interferon Gama). O IGRA será feito na primeira visita do estudo; e será repetido na segunda visita se o teste der negativo na primeira visita. Se ele(a) tiver TB latente, o Ministério da Saúde recomenda que se faça o tratamento para prevenir o desenvolvimento da tuberculose com um medicamento chamado isoniazida por 6 meses. Você, como responsável legal, pode optar que o(a) participante menor de idade sob sua guarda seja tratado ou não. Mas, levaremos também em consideração o assentimento do(a) participante de 06 a 17 anos. Se a participante é uma adolescente que já menstrua, pediremos que ela forneça urina para que seja feito um teste de gravidez no início do estudo. Faremos o teste novamente na segunda visita do estudo só se houver suspeita de gravidez. Se ela estiver grávida ou amamentando, não poderá entrar no estudo. Se engravidar ao longo do estudo, não coletaremos as amostras para armazenar, fará apenas as visitas e acompanhamento por telefone. Riscos: A coleta de amostras de sangue pode resultar em uma pequena dor ou vermelhidão associada com o uso da agulha para obter o sangue (20 ml equivalente a no máximo 2 colheres de sobremesa). Todo o material usado será novo e descartável. A coleta do escarro (cerca de uma colher de chá) é um procedimento necessário para diagnóstico de TB e que de forma geral é bem tolerado, assim como a coleta da urina. Todos os procedimentos serão realizados em local apropriado e você e o menor de idade serão orientados sobre como e onde obter as amostras. Caso haja alguma dúvida ou se você ou o(a) participante menor de idade se sentir(em) constrangido(s) com a coleta de amostras, poderão pedir ajuda à equipe do estudo que tentará minimizar ao máximo o desconforto. Caso ele(a) tenha algum dano relacionado direta ou indiretamente à participação nesse estudo, receberá suporte do(a) médico(a) responsável no centro onde está sendo tratado e na falta desse, de outro profissional da equipe da pesquisa. Caso o tratamento não seja eficaz ou caso o menor de idade não consiga se adaptar aos remédios utilizados, um novo tratamento lhe será oferecido e garantido, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil. A equipe de saúde do centro está disponível para auxiliar você e o menor de idade independentemente da participação neste estudo. Ele(a) terá garantia de assistência integral durante a sua participação na pesquisa.

Benefícios: Ele(a) não terá benefícios diretos com a participação neste estudo, mas poderá contribuir para melhorar o conhecimento sobre o processo de adoecimento e cura no futuro.

Custo: Não há nenhum custo para você e para o(a) participante menor de idade. Além disso, os pesquisadores tentarão minimizar as suas despesas durante as consultas do protocolo ressarcindo por gastos com transporte e alimentação nos dias que vier à consulta do estudo para coleta de amostras para armazenamento no biorrepositório.

Biorrepositório: É uma coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade da instituição, mas sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais. Para esta pesquisa, o biorrepositório ficará no Instituto Bahiano de Reabilitação (IBR), localizado em Salvador, onde esta pesquisa também será realizada. Os centros do Rio de Janeiro, Salvador e Manaus enviarão as amostras de seus participantes para o IBR. Caso no futuro seja necessário terminar com a parceria entre esses centros de pesquisa, as amostras continuarão armazenadas sobre gerenciamento dos pesquisadores que continuarem este trabalho.

Uso do Material Coletado, Dados e Confidencialidade: Todo material coletado será mantido em local seguro. Nenhuma amostra coletada será identificada com o nome do participante, usaremos códigos para manter a sua confidencialidade. Esse material ficará armazenado por até 10 anos. Se desejarmos armazenar o material por mais tempo, uma renovação desse período será solicitada às autoridades aplicáveis e o armazenamento só continuará se forem recebidas as devidas aprovações. As amostras poderão ser utilizadas para futuras pesquisas em tuberculose. As informações demográficas (exemplos: idade, sexo, onde nasceu, e outras perguntas) e informações clínicas, obtidas durante o estudo através de entrevista em consulta clínica ou por telefone, serão utilizadas para análise deste estudo. Estas informações serão registradas em fichas de dados pela equipe do estudo, e armazenadas em um sistema para registro de dados nos Estados Unidos. Todos os dados pertencerão aos pesquisadores brasileiros e uma cópia do banco de dados será guardada no Brasil. Mas, nenhuma das suas informações pessoais será fornecida e a sua confidencialidade será mantida também através de códigos. Todas as pesquisas futuras mencionadas neste TCLE deverão ser aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em pesquisa, antes de serem iniciadas. Nós então, entraremos em comunicação com você e/ou com o participante (caso ele já seja maior de idade) e pediremos permissão para usar as suas amostras armazenadas e explicaremos os objetivos e as etapas da nova pesquisa. Caso você e/ou ele não seja encontrado informaremos, ao órgão competente e pediremos a autorização para o uso de suas amostras armazenadas. Precisamos saber se você, como responsável legal, aceita que as amostras do(a) participante sejam armazenadas.

Por favor, marque SIM ou NÃO abaixo:

() SIM () NÃO

Você e o(a) participante têm direito de saber os resultados obtidos com a utilização do material do(a) participante e a receber orientações quanto às consequências destes resultados, caso haja alguma. Para isso você e o(a) participante poderão contatar a pesquisadora responsável pelo estudo (Marcelo Cordeiro) através do telefone ou e-mail no fim deste documento. Se por acaso for necessária a transferência do material do(a) participante armazenado no IBR para outra instituição por qualquer motivo, você e/ou o(a) participante serão comunicados. Se houver perda ou destruição de suas amostras ou se o biorrepositório for encerrado, nós tentaremos informar você e/ou o participante. Por isso, deixe sempre atualizados os seus telefones, endereços e e-mails caso vocês tenham, para facilitar a comunicação. Se houver algum impedimento em contatar vocês, nós apresentaremos uma justificativa ao comitê de ética em pesquisa. Caso o(a) participante já seja maior de idade no momento deste novo contato, a permissão para participar destes novos estudos será dada por ele(a). O material biológico (sangue, urina, escarro) armazenado neste biorrepositório continuará sendo do(a) participante, permanecendo, entretanto, sob responsabilidade da instituição. Assim, você, como representante legal ou o participante, caso seja maior de idade na ocasião, pode retirar o consentimento do armazenamento das amostras a qualquer tempo, sem nenhum prejuízo para o(a) participante ou seu tratamento. Para isso, você, como representante legal, deverá formalizar sua desistência ou a do(a) participante através de um documento assinado e datado por você, como representante legal. A desistência será válida a partir desta data e nós destruiremos as amostras do participante. Vocês podem desistir de participar do estudo (não querer mais fazer as consultas e/ou receber as ligações telefônicas pelo protocolo) e manter as amostras armazenadas para o estudo e/ou para estudos futuros, sem nenhum prejuízo a vocês.

Participação voluntária: O(a) participante menor de idade pode participar ou não deste estudo. A participação dele é voluntária. Caso aceite, vocês podem desistir de participar a qualquer momento. O diagnóstico e tratamento do(a) participante serão os mesmos dos outros pacientes, mesmo se não participar ou desistir de participar do estudo e/ou de manter as amostras armazenadas. Vocês não precisam explicar porque não quer mais participar, devem apenas comunicar à equipe do estudo. O(a) participante receberá toda assistência e tratamento mesmo que não queira participar do estudo e/ou mesmo vocês não queriam mais manter as amostras armazenadas. Caso você, como representante legal, tenha lido e entendido as informações neste termo de consentimento – ou elas tenham sido lidas para você – e caso concorde que o(a) participante menor de idade participe voluntariamente deste estudo, você e o pesquisador assinarão duas vias originais deste documento. Uma via assinada por você e pelo pesquisador lhe será entregue. Ao assinar este documento, você e o(a) participante não abrirão mão de nenhum direito legal. Será também necessário que você e o pesquisador rubriquem todas as páginas deste termo, assegurando que todas as páginas foram lidas, o que garante ainda mais a proteção do participante da pesquisa. O(a) participante de 06 a 17 anos de idade deverá assentir em participar do estudo. Para isso, o protocolo será explicado para ele(a) em uma linguagem simples, através da aplicação de um termo de assentimento específico, de forma que ele(a) entenda sua participação no estudo.

Questões:

Marcelo Cordeiro dos Santos CRM 3243

Médico Infectologista

Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD

Av. Pedro Teixeira, Dom Pedro Nº 25. CEP 69040-000

FONE/FAX (92) 2127-3402 / 2127-3523 e PABX (92) 2127-3555 Home: <http://www.fmt.am.gov.br>

Email: marcelocordeiro.br@gmail.com

Caso você queira contatar o comitê de ética responsável pela análise e aprovação ética do estudo, poderá contatar:

Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado

Av. Pedro Teixeira, Dom Pedro Nº 25. CEP 69040-000

Telefone (92) 2127-3572

Email: cep@fmt.am.gov.br

Horário de Funcionamento: 2a a 6a de 08 às 14h

Nome do participante (letra legível)

_____/_____/_____
Data

Assinatura do participante

_____/_____/_____
Data

Nome do representante legal (letra legível)

_____/_____/_____
Data

Assinatura do representante legal

:_____
Hora

Nome da testemunha imparcial (letra legível)

_____/_____/_____
Data

Assinatura da testemunha imparcial

_____/_____/_____
Data

Nome do Profissional que aplicou o termo (letra legível)

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Profissional que aplicou o termo

:_____
Hora

Rubrica do profissional que aplicou o termo: _____ Rubrica do Representante Legal (se houver): _____ Rubrica da Testemunha (se aplicável): _____ RePORT-Brasil TCLE versão 4 de 29fev2016.

**Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORTBrazil)
Questionário sobre o uso do Teste IGRA (*Interferon Gamma Release Assay*)**

Data:

Instituição:

Equipe:

***SUGESTIVO PARA O COORDENADOR DO LABORATÓRIO RESPONDER**

1. O treinamento foi realizado pelo fabricante do teste?

Sim Não

2. Qual foi a duração do treinamento para realização do teste IGRA?

1- 2 horas 5- 6 horas
 3- 4 horas Superior a 6 horas **obs: 2 dias**

3. Quantos membros da equipe do Laboratório foram treinados?

1 3
 2 4 ou mais

4. Quais profissionais foram treinados?

Biomédico (a) Biólogo (a) técnico de enfermagem
 Farmacêutico (a) Técnico laboratorial (a) outros

5. Destes profissionais treinados, quantos continuaram responsáveis na realização do teste IGRA?

6. O treinamento atendeu as expectativas dos membros da equipe?

Sim Não

7. Para a realização do teste IGRA qual protocolo é utilizado?

Protocolo do fabricante
 Protocolo do laboratório

8. O laboratório realiza controle de qualidade referente ao IGRA?

Sim (Interno RePORT) Não

9. O laboratório possui certificado de qualidade referente ao IGRA?

Sim Não

- Quais dificuldades encontradas na validação do teste?

10. O laboratório tem acesso ao GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial)?

Sim Não

11. Quais equipamentos são necessários para realização do teste, solicitados pelo fabricante?

Espectrofotômetro
 Lavadora de microplacas
 Agitador de microplacas
 Centrífuga refrigerada de tubos

- () Estufa
 () Computador
 () Micropipetas de volume variado (1 kit: P20, P200 e P1000)
 () Pipeta multicanal
 () Outros _____

12. Quais equipamentos são utilizados no laboratório para realização do teste?

- () Espectrofotômetro
 () Lavadora de microplacas
 () Agitador de microplacas
 () Centrífuga refrigerada de tubos
 () Estufa
 () Computador
 () Micropipetas de volume variado (1 kit: P20, P200 e P1000)
 () Pipeta multicanal
 () Outros _____

Todos os equipamentos estavam disponíveis no laboratório?

- () sim () não

13. Quais equipamentos foram necessários incluir para a realização do teste IGRA?

14. Quantos testes IGRA podem ser feitos, conforme o a rotina laboratorial?

15. Diariamente quantas coletas são feitas para teste IGRA?

16. Quais as dificuldades encontradas para inserção do teste IGRA no laboratório?

17. São feitas as calibrações de micropipetas e pipeta multicanal?

- () Sim () Não

- Em quanto tempo?

- () Mensal () Semestral
 () Bimestral () Anual
 () Trimestral () Outros _____

18. São feitas as manutenções dos equipamentos tais como: centrífuga, estufa, espectrofotômetro, agitador e lavadora de microplacas?

- () Sim () Não

- Em quanto tempo?

- () Mensal
 () Bimestral
 () Trimestral
 () Semestral
 () Anual
 () Outros _____

19. Consegue realizar o teste IGRA sem interferir na rotina do laboratório?

- () Sim () Não

20. Em um laboratório com grande demanda de amostras, é viável o teste IGRA?

- () Sim () Não

-Por quê? _____

21. Sobre o kit de ELISA, o fabricante demora na entrega?

- () Sim () Não

- Houve dificuldade na entrega?

23. O IGRA sofre interferência no resultado obtido devido ao pré-analítico?

Sim Não

Que tipo de interferências?

Tempo de transporte

Temperatura

Volume

Qualidade da amostra (hemólise etc)

O Percentual de amostras com resultado indeterminado varia entre:

0%

1 – 5%

6 – 10%

11 -20%

21% a 30%

Acima de 30%

***SUGESTIVO PARA EQUIPE DE COLETA RESPONDER**

24. Os tubos são armazenados em qual temperatura?

Temperatura ambiente (17 a 25°C)

Temperatura refrigerada (2 a 8°C)

24. Quais tubos são utilizados na coleta para o teste IGRA?

Tubos de QuantiFERON TBGold-Plus Heparina Outros

- A caixa de transporte possui termômetro?

Sim Não

25. Onde é realizado a coleta?

Mesma unidade de saúde onde é realizado o processamento

Fora da unidade do local de processamento

26. Quais os materiais utilizados na coleta de sangue?

Luvas Seringa

Garrote Canhão de vácuo / scalp

Algodão Outros _____

27. Os tubos de QFT-TB Gold Plus são coletados na ordem conforme fabricante?

Sim Não

28. Quantos mililitros de sangue são coletados em cada tubo?

Entre 0,8 a 1,2 ml

inferior a 0,8 ml

superior a 1,2 ml

29. Quantas vezes é homogeneizado os tubos?

inferior a 10 x

superior a 10 x

10 x

30. Após coleta, qual a temperatura que é deixado os tubos?

Temperatura ambiente (17° a 25° C)

Temperatura refrigerada (2° a 8°C)

Outros _____

31. Em quanto tempo é realizado o transporte das amostras biológicas (coleta- laboratório)?

***SUGESTIVO PARA EQUIPE DO LABORATÓRIO RESPONDER**

32. Após coleta, qual o tempo médio para realização da incubação dos tubos?

- () Imediato
 () Inferior a 1 hora
 () Superior a 1 hora

33. Antes de incubar amostra, é realizado uma nova homogeneização?

- () Sim () Não

34. Por quantas horas ficam incubado os tubos de QFT-TB Gold Plus?

- () Conforme protocolo do fabricante. (16 a 24 h)
 () Conforme protocolo do laboratório. Horas: _____

35. Qual o intervalo de tempo entre o final da incubação e início da centrifugação?

- () 0- 30 min () 61- 90 min
 () 31- 60 min () Superior a 90 min

36. Ocorre hemólise das amostras após centrifugação?

- () Sim () Não

37. Após centrifugação, o processamento é feito em seguida?

- () Sim () Não

Em quanto tempo? _____

38. Como é feito o congelamento das amostras até a realização do teste IGRA?

- () Mantido no freezer -70 a -80°C
 () Mantido no freezer -20 a -30°C
 () Mantido na geladeira

39. Qual o período máximo entre a coleta e a realização do teste IGRA?

- () 1 semana () 3 semanas
 () 2 semanas () Superior a 3 semanas

40. Qual a frequência de realização do teste IGRA em seu laboratório?

- () Diário
 () Semanal
 () Quinzenal
 () Mensal
 () Outros _____

41. Houve dificuldade na realização do teste IGRA? Se sim, quais?

- () Sim () Não

Se sim, quais?

42. Qual o tempo (horas) utilizado para a realização teste IGRA ?

- () 4- 6 horas
 () 6- 8 horas
 () Aproximadamente: _____

43. Qual o percentual de resultados positivos, negativos e indeterminados?

- () % Positivos
 () % Negativos
 () % Indeterminados

45. Utiliza o software de análise recomendado pelo fabricante?

- () sim () não



Qual? _____

46. Houve dificuldade no manuseio do software de análise?

- () sim () não

47. Houve dificuldade na interpretação dos dados?

- () sim () não
48. Utiliza modelo de laudo para liberação do resultado?
 () sim () não
49. A liberação do laudo é feita de qual forma?
 () online () impresso

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</p> <p style="text-align: center;">Protocolo: Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORT-Brasil)</p>	
<p>Título: Coleta e Manuseio dos tubos QuantiFERON®-TB Gold Plus para o estudo RePORT-Brasil</p>		<p style="text-align: center;">POP.IMU.006</p>
<p>Emissão: 01 / 07 / 2017</p>	<p>Revisão: ____ / ____ / ____</p>	<p style="text-align: center;">Nº 001</p>

1. OBJETIVO

Este documento tem por objetivo descrever e normatizar as exigências de estoque dos tubos QuantiFERON®-TB Gold Plus, técnicas de coleta, materiais necessários para manuseio, bem como condições em que estes tubos deverão ser mantidos depois da coleta até seu transporte ao laboratório.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Serão abrangidas neste documento as circunstâncias de estoque dos tubos e da coleta de amostras.

3. DEFINIÇÃO/SIGLAS

QFT-Plus - QuantiFERON®-TB Gold Plus

4. RESPONSABILIDADES

Os responsáveis pela coleta de amostras em cada local participante deste projeto irão implantar e cumprir com todas as normas descritas neste documento, contando ainda com o treinamento proporcionado pela empresa fornecedora do produto (Qiagen®), que abrangerá todos os aspectos relacionados ao estoque, coleta e processamento dos tubos de QFT-Plus.

5. FLUXOGRAMAS

Amostras de sangue total serão coletadas nos devidos tubos (como descrito abaixo) para todos os participantes do Coorte B no momento de sua inclusão no estudo (baseline).

Tais amostras poderão ser coletadas APENAS de Segundas-feiras às Quintas-feiras, não devendo ser coletadas às Sextas-feiras, devido ao longo período de incubação necessário para o processamento destes tubos que ocorre logo após a coleta.

6. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

a) Componentes:

O kit de QuantiFERON®-TB Gold Plus consiste de 4 (três) tubos: Nil control (tampa cinza), TB1 antigen (tampa verde), TB2 antigen (tampa amarela) e Mitogen control (tampa roxa).

b) Estoque dos tubos QFT (antes da coleta)

Tubos deverão ser mantidos em temperaturas entre 17°C e 25°C.

c) Coleta (passo a passo)

1. Use as etiquetas de identificação (pasta do participante) para rotular os tubos.
2. Colete 1 ml de sangue em cada um dos quatros tubos (marca preta)
 - a. Adicione o mínimo de 0.8 ml e o máximo de 1.2 ml de sangue em cada tubo; desde que dentro desta margem, o volume é considerado aceitável (**Figura 1**).
 - b. Os tubos se completarão com sangue vagarosamente.
3. Imediatamente agite os tubos por 5 segundos:
 - a. Agite os três tubos simultaneamente em movimentos verticais, como descritos pelo fabricante.
 - b. Toda a superfície interna do tubo deverá ser coberta com sangue (**Figura 1**).
 - c. Atenção! A agitação muito vigorosa dos tubos poderá causar rompimento do gel e consequentemente resultados aberrantes.
4. Mantenha os tubos (**Figura 2**) em temperatura ambiente (17°C–27°C) até o transporte ao laboratório.
5. É recomendável que a incubação dos tubos comece o mais cedo possível após a coleta (aceitável até 16 horas – tempo suficiente para chegada ao laboratório).

Figura 1. Demonstrativo de volumes e correta homogeneização dos tubos (Fonte: Mayo Clinic).

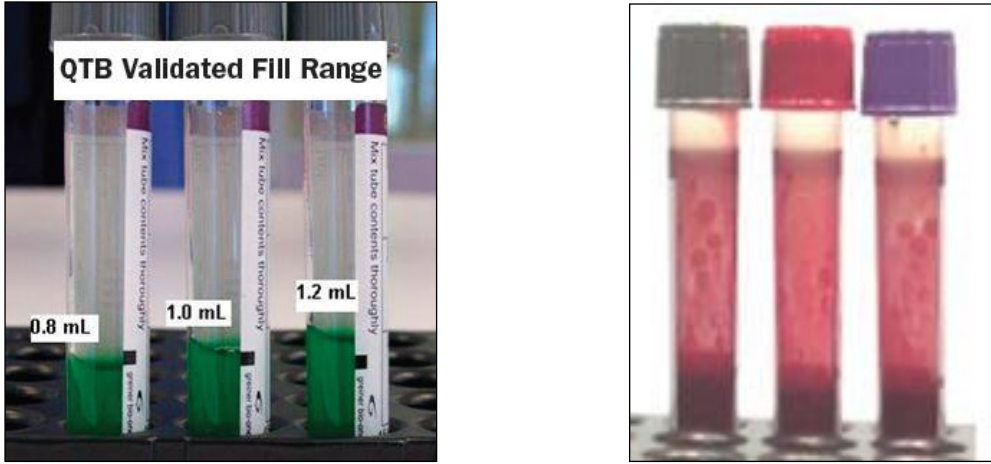


Figura 2. Tubos de QuantiFERON®-TB Gold Plus



7. ANEXOS

N/A

8. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

N/A

9. REFERÊNCIAS



- a) QuantiFERON – Package insert – disponível em: www.celletis.com
- b) QuantiFERON processing instructions from Mayo Clinic (Mayo Medical Laboratories) – Disponível em: www.mayomedicallaboratories.com

10. DISTRIBUIÇÃO

ÁREA	No. DE CÓPIAS
Enfermaria de Pesquisa Clínica da FMT-HVD (PesClin)	01
Laboratório de Pesquisa em Doenças Endêmicas	01

11. HISTÓRICO DE REVISÕES

No. DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESP. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</p> <p style="text-align: center;">Protocolo: Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORT-Brasil)</p>	
<p>Título: Processamento de tubos QuantiFERON para o estudo RePORT-Brasil</p>		<p style="text-align: center;">POP.IMU.007</p>
<p>Emissão:</p>	<p>Revisão: ____ / ____ / ____</p>	<p style="text-align: center;">Nº 001</p>

1. OBJETIVO

Este documento tem por objetivo descrever e normatizar as exigências de recebimento, incubação e centrifugação dos tubos de QuantiFERON®-TB Gold-Plus, seguido da obtenção das alíquotas de plasma e realização da técnica ELISA para detecção de interferon-gama (IFN- γ). O QuantiFERON®-TB Gold-Plus (QFT®-Plus) é um teste de diagnóstico *in vitro* que usa dois tubos contendo coquetel de peptídeos que simula as proteínas ESAT-6 e CFP-10 para estimular células específicas em sangue total heparinizado (TB1 e TB2). Em paralelo, como o controle do teste, é também coletado sangue em um tubo sem estímulo (Nil) – controle negativo –, e outro tubo contendo mitógeno (Mitogen) – controle positivo. A evidência de contato com o *Mycobacterium tuberculosis* é baseada na capacidade de produção de IFN- γ por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Neste documento serão abrangidas as instruções para o recebimento das amostras no laboratório, a incubação das amostras de sangue, a obtenção das amostras de plasma destinadas ao biorrepositório, e a realização da técnica de ELISA. Em seguida, será instruída a inserção das alíquotas geradas no REDCap. A instrução referente ao tratamento dos dados obtidos será realizada em POP adjacente (POP Nº 0003 – POP QuantiFERON®-TB Gold Plus – **Análise em software e liberação de laudos**)

3. DEFINIÇÃO/SIGLAS

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

IFN- γ – Interferon-gama

MITOGEN – Tubo de sangue com mitógeno (controle positivo)

NIL – Tubo de sangue sem estímulo (controle negativo)

REDCap – Research Electronic Data Capture

TB1 e TB2 – Tubos de sangue com antígenos de *M. tuberculosis*

4. RESPONSABILIDADES

No recebimento das amostras de sangue coletadas (tubo NIL, tubos TB1 e TB2, tubo MITOGEN), os responsáveis deverão verificar se os volumes em cada tubo estão de acordo com o padrão determinado pelo fabricante do kit. Além disso, verificar se as etiquetas foram corretamente colocadas nos tubos adequados (etiqueta de cor marrom – tubo NIL; etiqueta de cor azul claro – tubo TB1; etiqueta de cor verde clara – tubo TB2; etiqueta de cor azul escuro – tubo MITOGEN). Também se deve cumprir rigorosamente as condições de homogeneização e os tempos de incubação das amostras em incubadora com temperatura controlada a 37°C. O operador deverá realizar a centrifugação das amostras de acordo com as especificações definidas pelo fabricante, e realizar as alíquotas de plasma de acordo com o previsto pelo manual de laboratório do RePORT. A identificação das alíquotas, a temperatura de armazenamento, e todas as condições que sejam inerentes à qualidade de obtenção dos resultados deste teste, serão de responsabilidade do operador em cada etapa. **O responsável também deverá obedecer ao prazo para a liberação do resultado do teste: prazo máximo de 21 dias, a partir da coleta das amostras, para liberação do resultado para o paciente.** Sendo assim, os responsáveis de cada local participante deste projeto irão implantar e cumprir com todas as normas descritas neste documento, contando ainda com o treinamento proporcionado pela empresa fornecedora do produto (Qiagen), que abrangerá todas as etapas relacionadas ao processamento do QuantiFERON-TB Gold-Plus (QFT®-Plus).

5. FLUXOGRAMA

- Processamento dos tubos QuantiFERON e ELISA (em anexo).

6. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

6.1. Processamento dos tubos QuantiFERON-TB® GOLD-Plus

Após a coleta, os tubos poderão ser acondicionados à temperatura ambiente por até 16 horas antes de serem incubados. **NÃO** refrigerar ou congelar os tubos.

- a) Após o recebimento dos tubos de QuantiFERON-TB® GOLD-Plus no laboratório, deve-se verificar e anotar o volume dos mesmos no **formulário de processamento da amostra**, assim como o horário em que a coleta foi realizada;
- b) Verifique se os tubos estão devidamente identificados com etiquetas específicas: tubo NIL – etiqueta marrom, tubo TB1 – etiqueta azul claro, tubo TB2 – etiqueta verde claro, tubo MIT – etiqueta azul escuro;

- c) Homogeneíze os quatro tubos simultaneamente por 10 vezes como ilustrado na figura 1, para assegurar que toda a superfície interna dos tubos seja revestida com o sangue, solubilizando os antígenos que estão adsorvidos na parede interna do tubo.

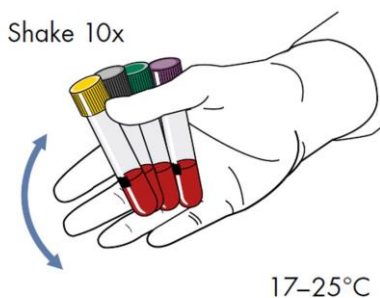


Figura 1 - Esquema demonstrativo da homogeneização correta dos quatro tubos.

ATENÇÃO: NÃO agitar os tubos energicamente, pois poderá ocorrer o rompimento ou deslocamento do gel, levando as análises a resultados aberrantes.

- d) Incubar os quatro tubos em posição vertical a 37°C por 20 horas (± 1 h);
- e) Após o período de incubação, centrifugue os tubos por 15 minutos a 2500xg para a separação do plasma;
- f) Retire de cada tubo seis alíquotas de 60 μ L de plasma, transferindo para microtubos do tipo Safe-lock com capacidade de 0,5mL. Estas alíquotas terão os seguintes destinos:
- 4 alíquotas de cada tubo para serem depositadas no biorrepositório. Elas devem estar com as identificações padronizadas para o estudo (etiquetas marrom/NIL, azul claro/TB1, verde claro/TB2 e azul escuro/MIT). Estas alíquotas deverão ser registradas no REDCap e armazenadas em caixas 10x10 devidamente identificadas e também registradas no REDCap (uma caixa para cada cor);
 - 2 alíquotas de cada tubo serão armazenadas no laboratório onde as amostras foram processadas, e as mesmas devem ser identificadas com a mesma ID do paciente. Estas alíquotas serão utilizadas no teste de ELISA. OBS: Se a etiqueta de final 99 para cada amostra não for utilizada para identificação de alíquotas para o biorrepositório, poderá ser utilizada para identificar uma das alíquotas do teste. Isso facilitará e garantirá a identificação correta das amostras para liberação dos resultados. O armazenamento será feito em caixas 10x10 devidamente identificadas e acondicionadas em freezer -20°C até serem utilizadas no teste.

OBS.: As amostras de plasma podem ser armazenadas durante 28 dias a temperatura de -20°C.

6.2. Materiais e equipamentos necessários para processamento e teste de ELISA:

- Incubadora com temperatura controlada em 37°C (CO₂ não é necessário);
- Pipetas calibradas com volume ajustável de 10 a 1000 μ L;

- Pipetas multicanais calibradas com volume ajustável entre 50µL e 100µL;
- Ponteiras estéreis com barreira, de 20µL, 200µL e 1000µL, descartáveis;
- Centrifuga própria para os tubos QuantiFERON-TB® GOLD-Plus, com capacidade de centrifugação a pelo menos 2500xg;
- Agitador de microplacas;
- Água deionizada ou destilada, 2 litros;
- Lavadora de microplacas (lavadora automática);
- Leitora de microplacas equipada com filtro de 450nm e filtro de referência de 620 a 650nm;
- Crômetro;
- Canaletas descartáveis para soluções (tamanho para pelo menos 8 canais);
- Microtubos eppendorf descartáveis de 1,5 mL;
- Microtubos eppendorf descartáveis de 0,5mL;
- Papel toalha;
- Tubo FALCON (15mL);
- Papel alumínio;
- Kit ELISA (descrito a seguir)

6.2.1. Componentes do kit ELISA:

ITEM	QUANTIDADE
Tira de microplaca (12 x 8 poços) revestidos com anticorpo monoclonal produzido em camundongo, específico ao IFN-γ humano	2 conjuntos de tiras de microplaca de 12 unidades x 8 poços
“Human IFN-γ Standard, lyophilized” (Padrão IFN-γ humano liofilizado: contém IFN-γ humano recombinante, caseína bovina, Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (8 IU/mL quando reconstituído)
“Green Diluent” (Diluyente Verde: contém caseína bovina, soro normal de rato, Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (volume = 30mL)
“Conjugate 100x Concentrate, lyophilized” (Conjugado liofilizado, 100x concentrado: anticorpo produzido em camundongo, específico ao IFN-γ humano, e conjugado com enzima HRP. Contém Timerosal com 0,01% peso/volume)	1 x frasco (volume = 0,3mL quando reconstituído)
“Wash Buffer 20x Concentrate” (Tampão de lavagem 20x concentrado: pH 7,2, contém 0,05% ProClin® 300)	1 x frasco (volume = 100mL)
“Enzyme Substrate Solution” (Solução de substrato da enzima: contém H ₂ O ₂ e cromógeno Tetrametilbenzidina 3,3', 5,5')	1 x frasco (volume = 30mL)
“Enzyme Stopping Solution” (Solução de parada de reação enzimática: contém 0,5% ProClinm 0,5M de H ₂ SO ₄) [†]	1 x frasco (volume = 15mL)

[†]Contém ácido sulfúrico.

6.3. Considerações sobre o kit QuantiFERON-TB® Gold-Plus:

- Armazene os reagentes do kit entre 2 e 8°C;
- Mantenha a Solução de Substrato de Enzimas (“enzyme substrate solution”) sempre protegida de luz solar direta;
- O Padrão (“human IFN-γ standard”) e o Conjugado 100x Concentrado (“conjugate 100x concentrate”), depois de reconstituídos, podem ser guardados durante 3 meses

na temperatura de 2 a 8°C. **ANOTE A DATA EM QUE O PADRÃO E O CONJUGADO FORAM RECONSTITUÍDOS;**

- O conjugado funcional (Conjugado 100x Concentrado e reconstituído + Diluente Verde) pode ser utilizado num prazo de 6h após a preparação;
- Não misture nem utilize as tiras de microplaca, o padrão INF- γ , o Diluente Verde ou o Conjugado 100x Concentrado de diferentes lotes de kits QFT;
- Os demais reagentes (Tampão de Lavagem 20x Concentrado, Solução de Substrato de Enzimas e Solução de Parada de Enzimas) podem ser trocados entre kits de lotes diferentes, contanto que estejam dentro do prazo de validade e que os detalhes do lote sejam anotados;
- O tampão de lavagem funcional (“wash buffer” - Tampão de Lavagem 20x Concentrado, depois de diluído) pode ser armazenado a temperatura ambiente durante 2 semanas;

6.4. Preparo de reagentes/condições de armazenamento/prazo de validade

a) O “**Human IFN- γ Standard**” (padrão IFN- γ humano) deverá ser reconstituído com o volume de água deionizada ou destilada indicado no rótulo do frasco. Depois de reconstituída, a solução padrão IFN- γ poderá ser armazenada por até 3 meses em temperatura entre 2 e 8°C. Anote a data na qual o padrão foi reconstituído.

OBS.: O volume de reconstituição do padrão do kit será diferente de lote para lote.

b) O “**Conjugate 100x concentrate**” (conjugado 100x concentrado) deverá ser reconstituído com 0,3mL de água deionizada ou destilada. Uma vez reconstituído, o conjugado não utilizado deve ser armazenado entre 2 e 8°C e tem que ser utilizado num prazo de 3 meses. Anote a data na qual o conjugado foi reconstituído.

c) O “**Wash buffer 20x concentrate**” (tampão de lavagem 20x concentrado) deverá ser diluído da seguinte forma:

1 parte de tampão 20x concentrado + 19 partes de água deionizada ou destilada

O tampão poderá ser armazenado a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 semanas.

6.5. Procedimentos para IFN- γ ELISA:

6.5.1. Recomendações iniciais

- Todas as informações referentes à técnica de ELISA deverão ser registradas no **formulário específico de registro da técnica ELISA - QuantiFERON-TB Gold-Plus (QFT-Plus)**;
- Todas as amostras de plasma e reagentes, exceto o **conjugado 100x concentrado** (Conjugate 100x Concentrate), devem ser colocados à temperatura

ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes de serem utilizados. Aguarde, no mínimo, 60 minutos para alcançar o equilíbrio térmico;

- Caso não utilize todas as tiras da placa de ELISA, guarde as que não serão utilizadas na embalagem original e mantenha a 4°C .

6.5.2. Procedimento

- Reconstitua o padrão IFN- γ humano, segundo a recomendação do item 6.4(a);
- Para preparar a curva baseada em diluição seriada, siga as etapas indicadas na **Tabela 1** e **Figura 2**;

Tabela 1: Preparação dos pontos de curva padrão em duplicata

ETAPAS PARA PREPARAÇÃO DE CADA PONTO DA CURVA EM DUPLICATA.
a) Identifique 4 microtubos novos com 1,5mL de capacidade: S1 , S2 , S3 e S4 .
b) Adicione 150 μL de diluente verde (Green Diluent) nos 4 microtubos.
c) Tampe o tubo S4 .
d) Adicione 150 μL de padrão IFN- γ (Human IFN- γ Standard) no tubo S1 e homogeneíze com pipeta.
e) Transfira 50 μL de S1 para S2 e homogeneíze bem com pipeta.
f) Transfira 50 μL de S2 para S3 e homogeneíze bem com pipeta.
OBS.: O tubo S4 permanece apenas com o diluente verde (Green Diluent) – controle zero.

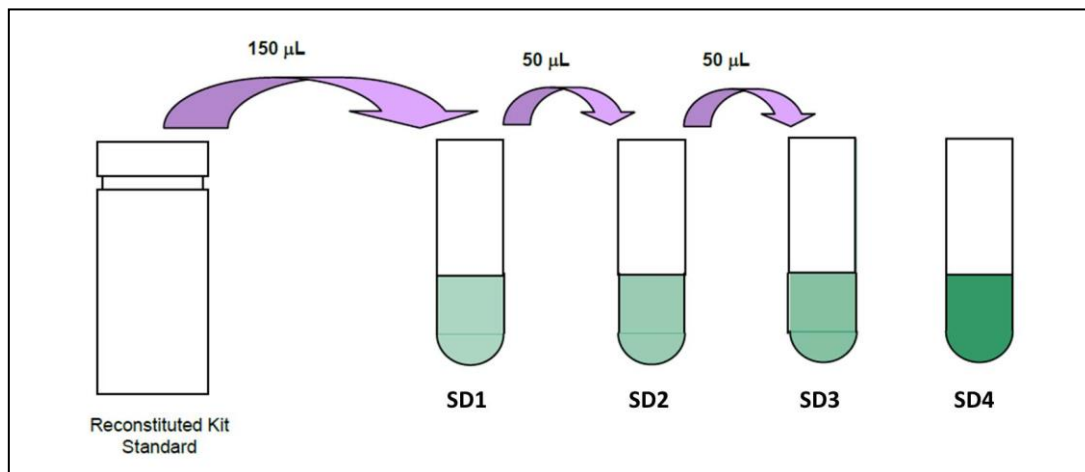


Figura 2: Esquema representativo da diluição da curva de IFN- γ recombinante considerando que cada diluição (SD1, SD2, SD3 e SD4) seja incluída na placa de ELISA em duplicata; S = SD (padrão).

- Ao final das diluições da curva, obteremos as seguintes concentrações de IFN- γ recombinante em cada tubo: SD1 = 4,0IU/mL; SD2 = 1,0IU/mL; SD3 = 0,25IU/mL; SD4 = 0IU/mL (zeroIU/mL);
- A curva padrão deverá ter obrigatoriamente 04 pontos de diluição e no mínimo em duplicata respeitando o padrão Europeu do teste;
- Numere as tiras das placas para maior segurança, caso as mesmas se soltem durante o manuseio;
- Adicione 50 μL de cada um dos pontos da curva padrão (S1, S2, S3, S4) nos poços previamente indicados (Figura 3);
- Adicione 50 μL de cada uma das amostras de plasma nos poços previamente indicados (Figura 3);

OBS.: As amostras de plasma que foram previamente armazenadas deverão estar congeladas por no mínimo 24 horas antes do ensaio. Ao momento do ensaio, deverão estar em temperatura ambiente e serem bem homogêneas antes de serem pipetadas para os poços da placa de ELISA.

A)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	1N	3N	5N	7N	9N	11N	13N	15N	17N	19N	21N
B	S2	1T1	3T1	5T1	7T1	9T1	11T1	13T1	15T1	17T1	19T1	21T1
C	S3	1T2	3T2	5T2	7T2	9T2	11T2	13T2	15T2	17T2	19T2	21T2
D	S4	1M	3M	5M	7M	9M	11M	13M	15M	17M	19M	21M
E	S1	2N	4N	6N	8N	10N	12N	14N	16N	18N	20N	22N
F	S2	2T1	4T1	6T1	8T1	10T1	12T1	14T1	16T1	18T1	20T1	22T1
G	S3	2T2	4T2	6T2	8T2	10T2	12T2	14T2	16T2	18T2	20T2	22T2
H	S4	2M	4M	6M	8M	10M	12M	14M	16M	18M	20M	22M

B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	1N	3N	5N	7N	9N						
B	S2	1T1	3T1	5T1	7T1	9T1						
C	S3	1T2	3T2	5T2	7T2	9T2						
D	S4	1M	3M	5M	7M	9M						
E	S1	2N	4N	6N	8N	10N						
F	S2	2T1	4T1	6T1	8T1	10T1						
G	S3	2T2	4T2	6T2	8T2	10T2						
H	S4	2M	4M	6M	8M	10M						

Figura 3: Esquema de organização da curva em duplicata e das amostras em triplicata na placa de ELISA. A) Esquema para placa inteira; B) Esquema para meia placa.

Exemplo

1N = Amostra 1, plasma de Nil;

1T1 = Amostra 1, plasma de Anti TB1;

1T2 = Amostra 1, plasma Anti TB2;

1M = Amostra 1, plasma de Mitógeno)

- h) O conjugado funcional é preparado diluindo a quantidade necessária de conjugado 100x concentrado (Conjugate 100x Concentrate), já reconstituído, em diluente verde (Green Diluent) conforme estabelecido na **Tabela 2**;

Tabela 2: Preparação do conjugado

Número de tiras	Volume de Concentrado de conjugado 100x	Volume de Diluente Verde
2	10 μ L	1,0mL
3	15 μ L	1,5mL
4	20 μ L	2,0mL
5	25 μ L	2,5mL
6	30 μ L	3,0mL
7	35 μ L	3,5mL
8	40 μ L	4,0mL
9	45 μ L	4,5mL
10	50 μ L	5,0mL
11	55 μ L	5,5mL
12	60 μ L	6,0mL

- i) Homogeneíze bem e com cuidado para não formar espuma, e coloque o conjugado funcional em uma canaleta;
OBS.: Volte a armazenar o Conjugado 100x Concentrado não utilizado entre 2 a 8°C.
- j) Utilizando micropipeta multicanal, adicione 50 μ L de conjugado funcional recém preparado aos poços ELISA que contém as amostras;
OBS.: - Atenção para o tempo em que se leva para adicionar o conjugado funcional. Procurar não demorar entre as carreiras de poços.
 - Atenção para não formar bolhas nos poços. Caso tenham sido formadas, utilizar agulha de seringa descartável para desfazê-las (uma agulha para cada poço com bolhas);
OBS.: **NÃO** toque com a ponta da agulha no fundo do poço.
- k) Misture bem o conjugado e os padrões/amostras de plasma utilizando agitador de microplacas por 1 minuto (veloc. 500-1000rpm);
- l) Cubra a placa, coloque em local protegido de luz (com auxílio de papel alumínio) e de trepidações, e incube à temperatura ambiente (22°C \pm 5°C) durante 2 horas (\pm 5 minutos);
- m) Durante a incubação, dilua o tampão de lavagem 20x concentrado, seguindo a recomendação do item 6.4 (c);
- n) Após a incubação, lave a placa 6 vezes com tampão de lavagem 1x concentrado. Utilize a lavadora de placa automática, ajustada para 6 ciclos de lavagem, utilizando 400 μ L de tampão em cada poço. Uma lavagem exaustiva é muito importante para o desempenho do ensaio. Certifique-se de que cada poço está completamente cheio com o tampão de lavagem. Recomenda-se um período de imersão de pelo menos 5 segundos entre cada ciclo.
- o) Ao término das lavagens, bata as placas viradas para baixo sobre algumas folhas de papel toalha para remover o tampão de lavagem residual;
- p) Adicione 100 μ L de solução de substrato de enzima (enzyme substrate solution) em cada poço (evitando a formação de bolhas) com auxílio de micropipeta multicanal, e misture bem utilizando agitador de microplacas por 1 minuto (veloc. 500-1000rpm);
OBS.: Se houver formação de bolhas nos poços, utilize agulha de seringa estéril e descartável para desfazê-las, com o cuidado de usar uma agulha para cada poço.
NÃO toque com a ponta da agulha no fundo do poço.

- q) Cubra a placa, coloque em local protegido de luz e de trepidações e incube à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos (± 5 minutos);
- r) Durante o período de incubação:
- i. Ligue a leitora de ELISA e ajuste os parâmetros para leitura da placa logo após o término da reação: leitura com filtro 450nm e filtro de referência de 620 a 650nm;
 - ii. No programa de leitura do computador, monte o mapa da placa que será lida;
- s) Após os 30 minutos de incubação, adicione 50 μL de solução de parada de enzimas (enzyme stopping solution) em cada poço com auxílio de micropipeta multicanal, evitando formação de bolhas, e homogeneíze colocando a placa no agitador de placas por 1 minuto (veloc. 500-1000rpm);
- A solução de parada de enzimas deverá ser adicionada aos poços na mesma ordem e velocidade em que o substrato foi adicionado.
- t) Realize a leitura no leitor de ELISA num período máximo de 5 minutos a contar da adição da solução de parada de enzimas.
- OBS.:** A leitora de ELISA deve estar previamente programada (item 6.5.2, letra r).
- u) Imprima os valores obtido de densidade ótica. Estes valores serão usados para calcular os resultados do teste. Reserve os dados para a inserção no Software QuantiFERON-TB[®] Gold-Plus (Vers. 2.71) para análise. Os dados impressos deverão ser digitalizados e registrados em livro de protocolo.

IMPORTANTE: O descarte das tiras da placa, frascos utilizados para diluição, e recipientes utilizados para pipetagem contendo resíduos químicos (substrato e solução de parada), deverá ser realizado em lixo adequado para resíduos químicos, com a devida identificação do local, data, operador e os tipos de resíduos descartados.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Check-list Processamento de tubos QuantiFERON-TB Gold-Plus.

Anexo 2 – Check-list Teste ELISA

Anexo 3 – Fluxograma de processamento dos tubos QuantiFERON-TB Gold-Plus e ELISA

8. FORMULÁRIOS

- Formulário de processamento de amostra – QuantiFERON-TB[®] Gold-Plus (QFT-Plus)

- Formulário de registro da técnica de ELISA – QuantiFERON-TB[®] Gold-Plus (QFT-Plus)

9. REFERÊNCIAS

- http://www.quantiferon.com/irm/PDF/1675_0/Portuguese_QFTPlus_ELISA_R04_022016

- <http://www.quantiferon.com/irm/company/showpage.aspx/PDFs/1628-95883375/AnalysisSoftwareInstructions>

10. DISTRIBUIÇÃO

ÁREA	Nº. DE CÓPIAS
INI/IOC-Fiocruz	01
UFRJ	01
Rocinha	00
Fundação Medicina Tropical (FMT)	01
IBIT/Fundação José Silveira	01
Vanderbilt University	01
Sistema Rocket	01

11. HISTÓRICO DE REVISÕES

Nº DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESP. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</p> <p style="text-align: center;">Protocolo: Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORT-Brasil)</p>	
<p>Título: QuantiFERON[®]-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos</p>		<p style="text-align: center;">POP.IMU.008</p>
<p>Emissão: 25 / 07 / 2017</p>	<p>Revisão: ____ / ____ / ____</p>	<p style="text-align: center;">Nº 002</p>

OBJETIVO:

Este documento tem por objetivo descrever e normatizar as exigências para a análise dos dados obtidos no ELISA QuantiFERON-TB[®] Gold-Plus, através do software QuantiFERON-TB[®] Gold-Plus 2.71, e para a liberação dos laudos de diagnóstico.

1. CAMPO DE APLICAÇÃO:

Serão abordadas neste documento as instruções de utilização do software de análise QuantiFERON TB Gold Plus 2.71 e as condições para a obtenção e liberação dos laudos gerados pelo software.

2. DEFINIÇÃO/SIGLAS:

ELISA - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

IFN- γ – Interferon gamma.

MITOGEN - Tubo de sangue com mitógeno. NIL -Tubo de sangue sem estímulo

TB1 e TB2 - Tubo de sangue com antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*.

3. RESPONSABILIDADES:

O técnico responsável deverá conferir assegurar a confiabilidade dos dados obtidos antes de inseri-los no programa de análise e seguir corretamente o protocolo de utilização do software. O responsável também deverá obedecer ao prazo para a liberação dos resultados do teste, disponibilizando-os em até 21 dias corridos a partir da coleta das amostras, bem como manter os formulários relativos à técnica devidamente preenchidos e uma cópia dos laudos liberados arquivados no laboratório da Imunologia.

Sendo assim, os responsáveis irão implantar e cumprir com todas as normas descritas neste documento, contando ainda com o treinamento proporcionado pela empresa fornecedora do produto (**Qiagen**), que abrangerá todas as etapas relacionadas ao processamento do QuantiFERON- TB[®] Gold Plus(QFT[®] -Plus).

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantiFERON®-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos	POP 008

4. FLUXOGRAMAS:

Fluxograma: QuantiFERON®-TB Gold Plus – **Obtenção e liberação de laudos** (em anexo)

5. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES:

a. Análise de resultados e interpretação através do programa QUANTIFERON®-TB GOLD:

- i. Instale o programa *QFT v2.71 Installation* a partir do CD-ROM, ou obtidos no site da Qia- gen (<http://www.quantiferon.com>), nos arquivos de programa do computador;

OBS.: Não há versões desse programa para plataformas MAC.

- ii. Após instalação, abra o programa a partir do ícone localizado na tela da área de trabalho do computador utilizado;
- iii. Na tela inicial, selecione o idioma e clique em **OK** (Figura 1);



Figura 1: Tela inicial.

- iv. Preencha os campos: número do ciclo (cada laboratório deve criar um número para identificar cada reação de ELISA); número de lote do kit; operador da reação.
- v. Em seguida, clique na seta para a direita (\Rightarrow) localizada no canto inferior direito da tela (Figura 2);

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

Título: QuantiFERON®-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos

POP 008

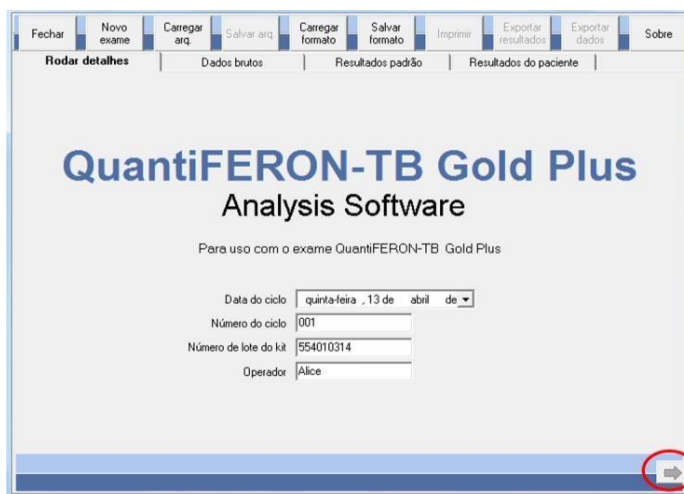


Figura 2: Identificação da reação de ELISA.

Selecionar o ícone **ENTRADA MANUAL DE DADOS** presente na borda inferior da tela (Figura 3);

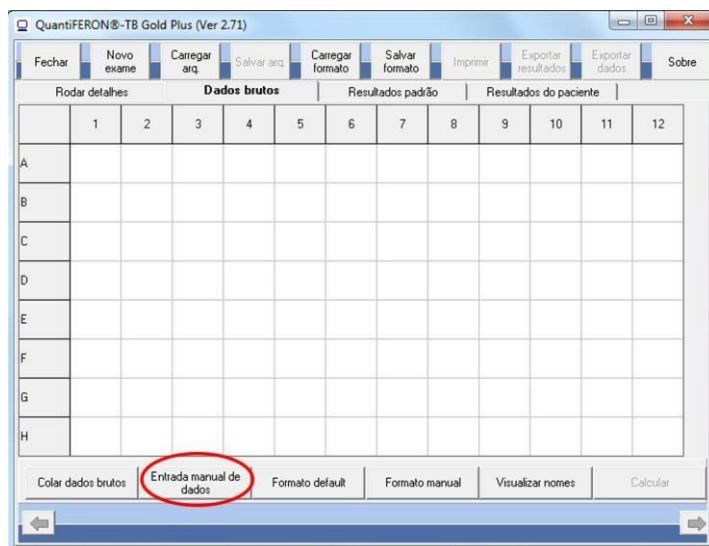


Figura 3: Entrada manual de dados.

- vi. Digite os dados de densidade ótica obtidos após leitura da placa de ELISA, respeitando as posições dos valores na placa e as casas decimais. Utilizar vírgula para separar o numeral do decimal. Após a digitação, faça a conferência para evitar erros de digitação. Os valores de densidade ótica obtidos deverão ser digitalizados e registrados em caderno de protocolo para futuras conferências (Figura 4);
- vii. Ao final da digitação manual dos dados, clique em **CONCLUIR** (Figura 4);

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

Título: QuantiFERON®-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos

POP 008

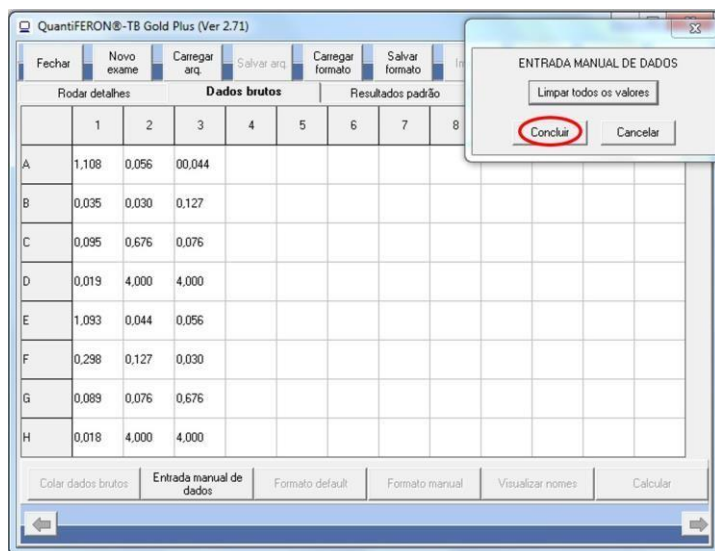


Figura 4: Entrada de valores de densidade ótica nos campos correspondentes à placa de ELISA.

- viii. Clicar no ícone **FORMATO MANUAL** localizado na borda inferior da tela (Figura 5);
- ix. Selecione na janela de cor azul o ícone **PADRÕES** do item a designar, seguido do ícone **VERTICAL** em orientação padrão (Figura 5);

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

Título: QuantiFERON®-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos

POP 008

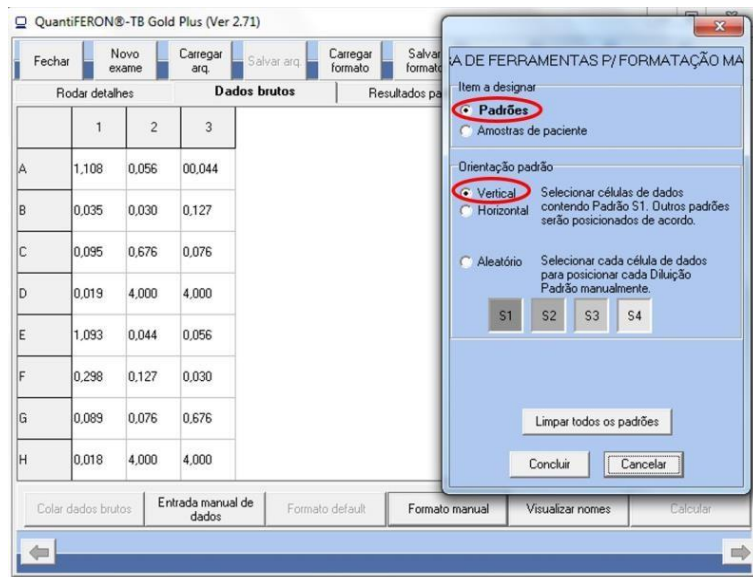


Figura 5: Formato manual de definição dos pontos da curva padrão.

- x. Em seguida, clique no desenho da placa de ELISA, sobre as posições onde se encontram os pontos da curva S1. Automaticamente, ele irá designar os pontos da curva padrão (S1, S2, S3 e S4). Clique novamente na posição onde se localiza a duplicata do padrão (Figura 6).

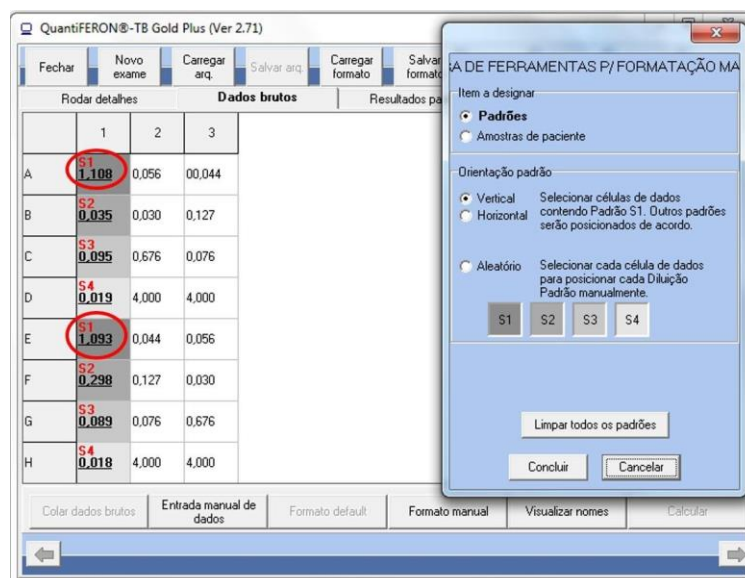


Figura 6: Definição da localização da curva padrão em duplicata.

- xi. Selecione **AMOSTRAS DE PACIENTE** (janela de cor azul). Em tipo de amostra, mantenha selecionado **QFT-Plus (Nil, TB1, TB2, Mitógeno)**. Selecione, em seguida, **VERTICAL** na aba das amostras; preencha o campo com o código de identificação do paciente (utilize o leitor de código de barras). Em seguida, clique na posição da amostra correspondente

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

Título: QuantiFERON®-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos

POP 008

ao tubo NIL do paciente em questão, e automaticamente as outras amostras desse mesmo paciente serão designadas no esquema da placa de ELISA (Figura 7);

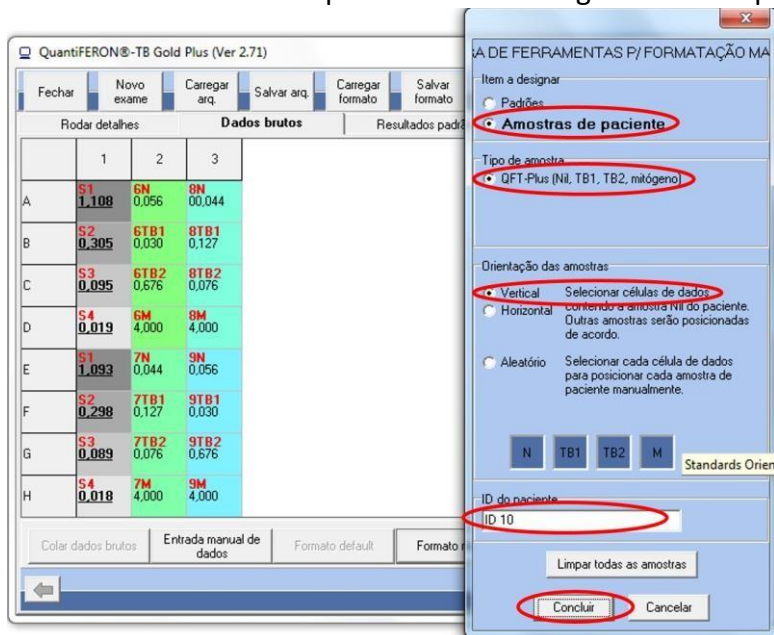


Figura 7: Identificação dos pacientes na placa de ELISA.

- xii. Repita este processo até que todos os pacientes tenham sido designados no desenho da placa. Após designar todas as amostras, clique em **CONCLUIR**;
- xiii. Para a conferência da alocação das amostras na placa e o número de identificação dos pacientes, podemos conferir clicando no ícone **VISUALIZAR NOMES**, localizado na borda inferior da tela. Após a conferência, clique em **OK** (Figura 8);

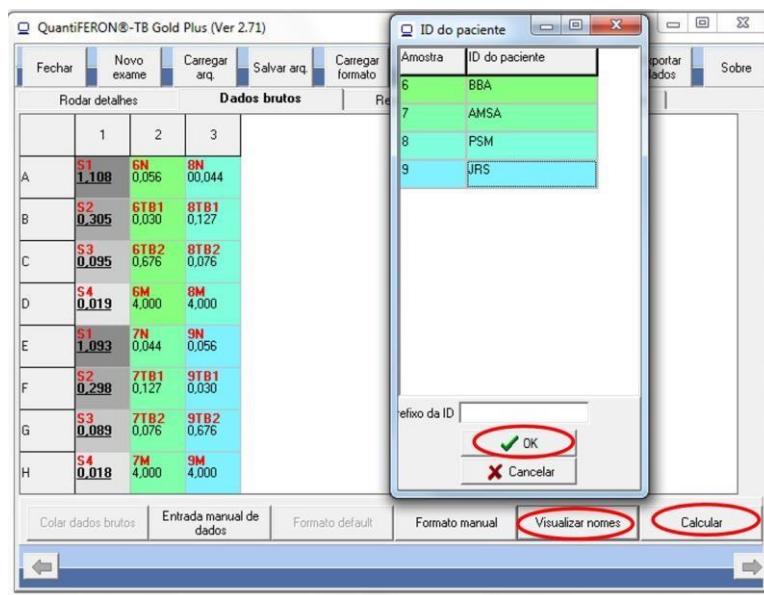


Figura 8: Conferência da identificação dos pacientes.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

Título: QuantiFERON®-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos

POP 008

- xiv. Em seguida, clique no ícone **CALCULAR** para obter a primeira análise: curva padrão (Figura 8);
- xv. Verificar se a reação de ELISA está válida conferindo os seguintes parâmetros (Figura 9):

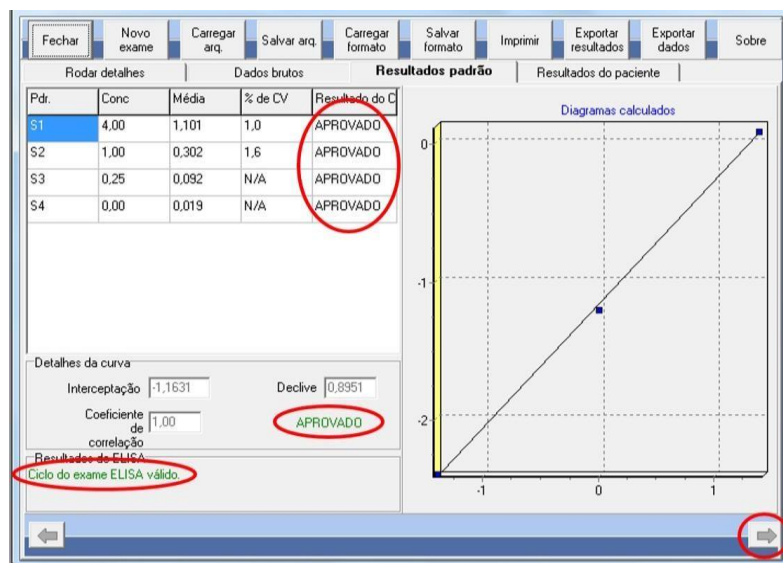


Figura 9: Validação do teste de ELISA.

1. Pontos da curva com status **APROVADO**;
2. Detalhes da curva com status **APROVADO**;
3. Resultado do ELISA com status **VÁLIDO**.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantiFERON®-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos	POP 008

OBS.: Se algum destes critérios de validação do teste não for aprovado, o teste de ELISA estará invalidado e deverá ser repetido.

- xvi. Clique na seta para direita (→) localizada no canto inferior direito da tela para visualizar a tabela contendo os resultados dos pacientes (Figuras 9 e 10);

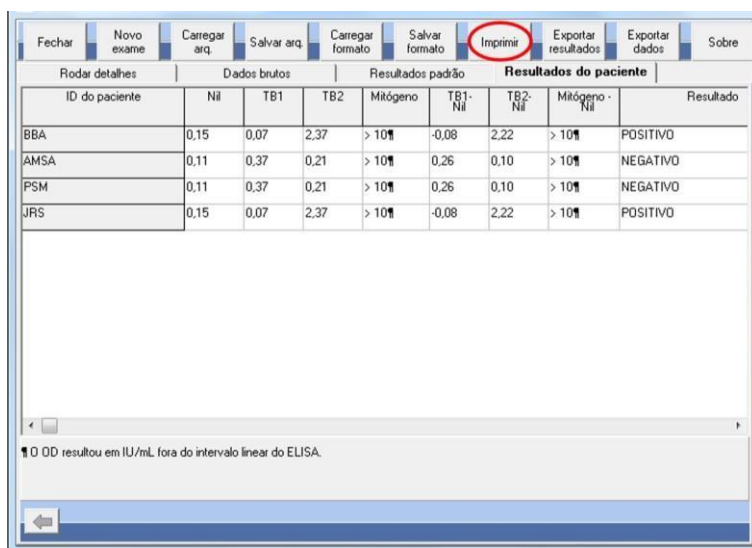


Figura 10: Resultado dos pacientes.

- xvii. Conferir se o resultado gerado pelo programa está de acordo com os critérios estabelecidos para definição de amostra POSITIVA, NEGATIVA e INDETERMINADA. Para isto, utilize a tabela 3.

Tabela 3: Resultado do QuantiFERON segundo valores de densidade óptica.

Nil ¹ (IU/mL)	TB1 menos Nil (IU/mL)	TB2 menos Nil (IU/mL)	Mitógeno menos Nil (IU/mL)	QFT-Plus Resultado	Relatório/Interpretação
<=8,0	≥ 0,35 e ≥ 25% do valor Nil	Qualquer um	Qualquer um	Positivo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> provável
	Qualquer um	≥ 0,35 e ≥ 25% do valor Nil			
	<0,35 ou ≥ 0,35 e < 25% do valor Nil		≥0,5	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> NÃO provável
>8,0	Qualquer um		<0,5	Indeterminado	Os resultados da reação ao antígeno TB são indeterminados

¹ O controle Nil deve ser <= 8,0 IU/mL e o mitógeno - Nil deve ser >= 0,5 IU/mL OU TB1 ou TB2 - Nil deve ser >= 0,35 IU/mL para um paciente com um resultado válido do QuantiFERON®-TB Gold Plus.

- xviii. Após conferidos os resultados, clicar no ícone **IMPRIMIR** localizado na borda superior da tela (Figura 10);
- xix. Em seguida, na opção **TIPO DE AMOSTRA**, clique nos ícones: **IMPRIMIR TODOS OS RELATÓRIOS; IMPRIMIR CURVA PADRÃO E A FORMATAÇÃO DA PLACA**, localizados no

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO

Título: QuantiFERON®-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos

POP 008

canto superior esquerdo da tela. Na opção **TIPO DE RELATÓRIO**, clique no ícone **TODOS OS PACIENTES (RELATÓRIO DE GRUPO)**, também localizado no canto superior esquerdo da tela. Por último, clique no ícone **SALVAR COMO PDF** localizado no canto superior direito da tela (Figura 11);

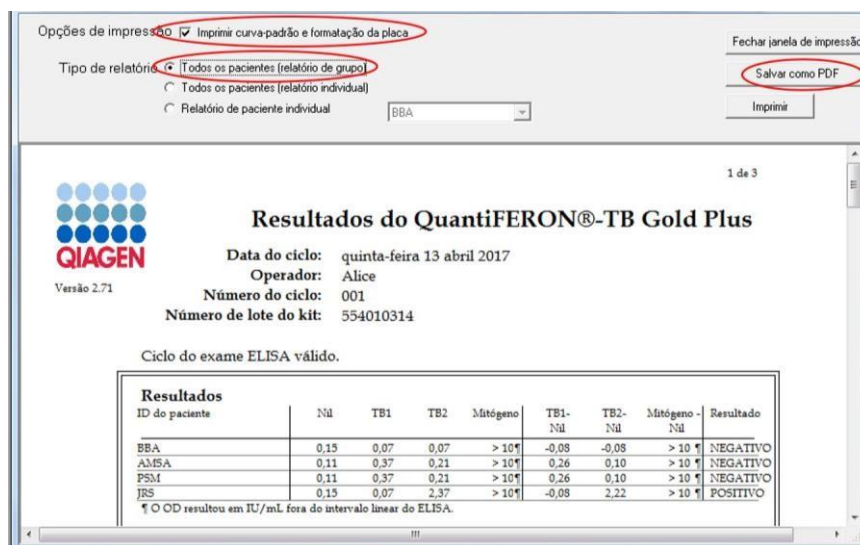


Figura 11: Emissão do relatório final do QuantiFERON.

- xx. Salve os documentos gerados na pasta denominada **Resultados QuantiFERON 4G** para futura conferência (Figura 12);

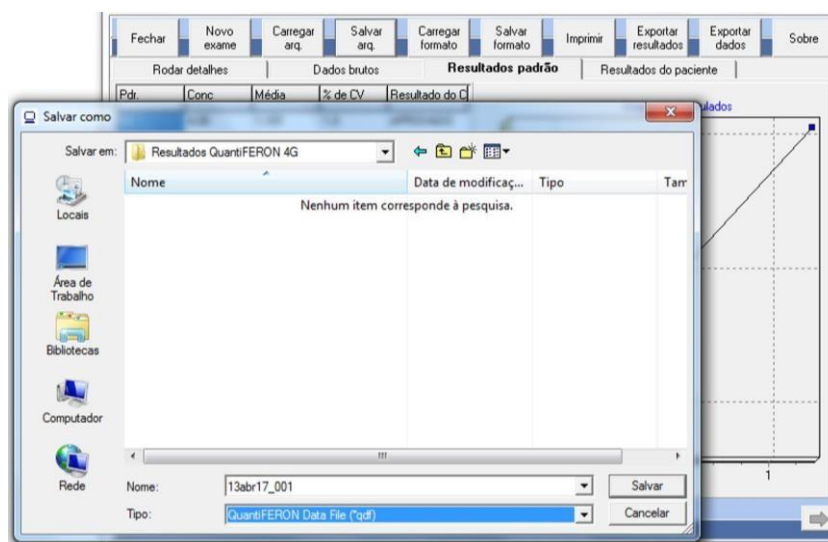


Figura 12: Salvar relatório final da reação.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO	
Título: QuantiFERON®-TB Gold Plus – Análise em software e liberação de laudos	POP 008

- xxi. Para obter o resultado individual do paciente (laudo) selecione a opção **TIPO DE RELATÓRIO**, o ícone **RELATÓRIO DE PACIENTE INDIVIDUAL**, localizado no canto superior esquerdo da tela. Selecionar o paciente pelo ID e clique no ícone **SALVAR COMO PDF** localizado no canto superior direito da tela (Figura 13);

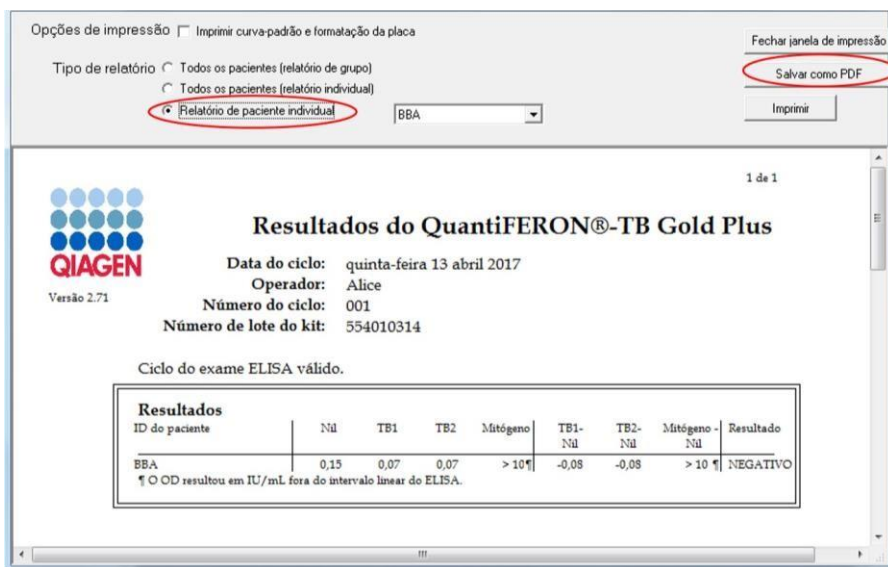


Figura 13: Impressão do resultado individual do paciente.

IMPORTANTE: O responsável deverá imprimir o relatório individual, conferir as informações do paciente e o resultado do teste, colocar a data da realização do exame e da impressão do laudo, carimbar e assinar.

6. ANEXOS

7.2. Resultado do QuantiFERON®-TB Gold-Plus (QFT) – relatório individual

7.3. Fluxograma: QuantiFERON®-TB Gold-Plus – **Obtenção e liberação de laudos**

7. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

- Formulário Unificado de Registro do Paciente

8. REFERÊNCIAS


- POP#002P1 - QuantiFERON®-TB Gold – Processamento e ELISA
- [1] QuantiFERON®-TB Gold-Plus Analysis Software (v2.71) Instructional Guide.
Disponível em:
<<http://www.quantiferon.com/IRM/company/showpage.aspx/PDFs/1579-61054710/AnalysisSoftwareInstructions>>. Acesso em: 12/04/2017.

DISTRIBUIÇÃO:

ÁREA	No. DE CÓPIAS
Enfermaria de Pesquisa Clínica da FMT-HVD (PesClin)	01

9. HISTÓRICO DE REVISÕES

No. DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESPONS. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

	<p style="text-align: center;">PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</p> <p style="text-align: center;">Protocolo: Pesquisa Regional Prospectiva e Observacional em Tuberculose no Brasil (RePORT-Brasil)</p>	
Título: Liberação de Laudo e resultados para REDCap QuantiFERON®-TB Gold-Plus		<p style="text-align: center;">POP.IMU.009</p>
Emissão: 25 / 07 / 2017	Revisão: ____ / ____ / ____	<p style="text-align: center;">Nº 002</p>

1. OBJETIVO

Este documento tem por objetivo descrever e normatizar a correta informação dos resultados quantitativos e qualitativos obtidos pela técnica ELISA para detecção de interferon-gama (IFN- γ) que participam do Projeto RePORT-TB, assim como a revisão e liberação do Laudo Simplificado, correta inserção de resultados e carregamento e laudos no REDCap.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Neste documento serão abrangidas as instruções para a correta observação do resultado qualitativo (POSITIVO/NEGATIVO/INDETERMINADO) e quantitativo, a forma de preenchimento do Laudo Simplificado, o procedimento para a inserção dos resultados no REDCap e o upload dos laudos no REDCap.

3. DEFINIÇÃO/SIGLAS

ELISA – Ensaio imunoenzimático

INF- γ – Interferon-gama

REDCap – Research Electronic Data Capture

4. RESPONSABILIDADES

Após a análise no software *QuantiFERON-TB® Gold-Plus 2.71*, (**POP nº 005 – Análise em software e liberação de laudos - QuantiFERON® TB Gold Plus**) os responsáveis deverão verificar se a análise foi validada pelo programa. A análise estando validada, é responsabilidade

do operador inserir os laudos individuais gerados pelo software no REDCap e elaborar o Laudo Simplificado (modelo no Anexo 01).

O setor responsável pelos resultados e pela verificação tem um prazo máximo de 7 dias, a partir da coleta das amostras, para inserir os resultados quantitativos e qualitativos no REDCap, elaborar o Laudo Simplificado e fazer o carregamento dos laudos (Laudo Simplificado e laudo gerado pelo software) no REDCap, informando o cumprimento destas etapas aos respectivos responsáveis pela verificação das informações, quando aplicável.

Sendo assim, os responsáveis de cada local participante deste projeto irão implantar e cumprir com todas as normas descritas neste documento.

5. FLUXOGRAMA

- Liberação de resultados e laudos/arquivamento.

6. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

6.1. Laudo gerado pelo software:

O software tem a possibilidade de gerar o laudo de duas formas: apresentando os resultados gerais da análise feita naquele ciclo (A) ou apresentando individualmente os resultados de cada contactante (B), conforme demonstrado na figura 01.

A)

The image shows two screenshots of the QuantiferON-TB Gold Plus software interface. The left screenshot (A) displays a summary table of results for 10 patients, with columns for TB1, TB2, TB3, TB4, TB5, TB6, TB7, TB8, TB9, TB10, TB11, TB12, TB13, TB14, TB15, TB16, TB17, TB18, TB19, TB20, TB21, TB22, TB23, TB24, TB25, TB26, TB27, TB28, TB29, TB30, TB31, TB32, TB33, TB34, TB35, TB36, TB37, TB38, TB39, TB40, TB41, TB42, TB43, TB44, TB45, TB46, TB47, TB48, TB49, TB50, TB51, TB52, TB53, TB54, TB55, TB56, TB57, TB58, TB59, TB60, TB61, TB62, TB63, TB64, TB65, TB66, TB67, TB68, TB69, TB70, TB71, TB72, TB73, TB74, TB75, TB76, TB77, TB78, TB79, TB80, TB81, TB82, TB83, TB84, TB85, TB86, TB87, TB88, TB89, TB90, TB91, TB92, TB93, TB94, TB95, TB96, TB97, TB98, TB99, TB100. The right screenshot (B) displays a detailed view of results for a specific patient, including a table of results for each of the 100 contactants, with columns for TB1, TB2, TB3, TB4, TB5, TB6, TB7, TB8, TB9, TB10, TB11, TB12, TB13, TB14, TB15, TB16, TB17, TB18, TB19, TB20, TB21, TB22, TB23, TB24, TB25, TB26, TB27, TB28, TB29, TB30, TB31, TB32, TB33, TB34, TB35, TB36, TB37, TB38, TB39, TB40, TB41, TB42, TB43, TB44, TB45, TB46, TB47, TB48, TB49, TB50, TB51, TB52, TB53, TB54, TB55, TB56, TB57, TB58, TB59, TB60, TB61, TB62, TB63, TB64, TB65, TB66, TB67, TB68, TB69, TB70, TB71, TB72, TB73, TB74, TB75, TB76, TB77, TB78, TB79, TB80, TB81, TB82, TB83, TB84, TB85, TB86, TB87, TB88, TB89, TB90, TB91, TB92, TB93, TB94, TB95, TB96, TB97, TB98, TB99, TB100.

B)

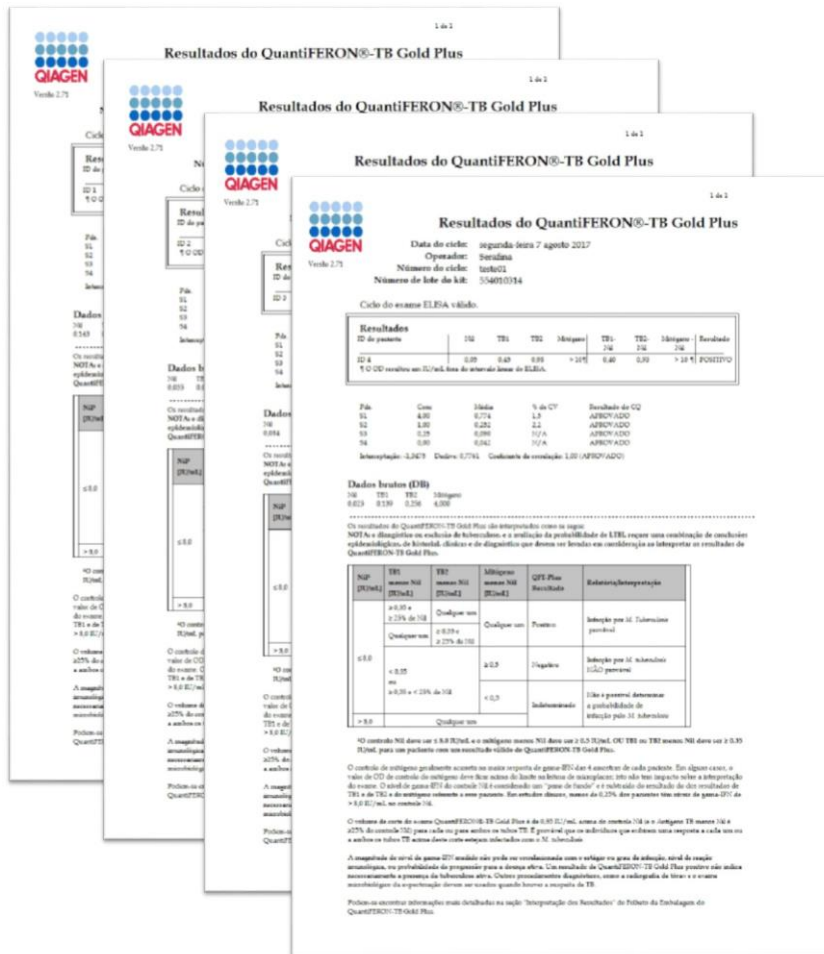


Figura 1 – Modelos de laudo gerado pelo software: A) Laudo geral; B) Laudos individuais.

- g) No quadro RESULTADOS são apresentados 4 grupos de colunas, indicando, na sequência, a ID do paciente no primeiro grupo; os resultados encontrados para NIL, TB1, TB2 e MITÓGENO, no segundo grupo; a diferença entre TB1, TB2 e MITÓGENO para os valores encontrados em NIL, no terceiro grupo; e o resultado QUALITATIVO (Positivo, Negativo ou Indeterminado) no último grupo (fig. 2).
- h) Pode ser observado como resultados QUANTITATIVOS os valores contidos no segundo e terceiro grupo, e QUALITATIVOS no último grupo. Para inserção dos dados no REDcap serão utilizados apenas a informação do **segundo grupo** (Nil, TB1, TB2 e MIT) e **último grupo**. E para liberação do laudo os dados **de todas as colunas**.



Resultados do QuantiFERON®-TB Gold Plus

Data do ciclo: segunda-feira 7 agosto 2017
 Operador: Serafina
 Número do ciclo: teste01
 Número de lote do kit: 554010314

Ciclo do exame ELISA válido.

ID do paciente	Resultados			Mitógeno	TB1- NI	TB2- NI	Mitógeno- NI	Resultado
	NI	TB1	TB2					
ID 1	0,46	0,19	0,23	> 10*	-0,27	-0,23	> 10*	NEGATIVO
ID 2	0,08	0,09	0,13	> 10*	0,01	0,05	> 10*	NEGATIVO
ID 3	0,23	0,25	0,16	5,16	0,02	-0,07	7,93	NEGATIVO
ID 4	0,05	0,45	0,98	> 10*	0,40	0,93	> 10*	POSITIVO

† O OD resultou em IU/mL, fora do intervalo linear do ELISA.

Figura 2 – Indicação dos resultados quantitativos e qualitativos gerados pós análise em software. Marcado em vermelho, resultado quantitativo; em azul resultado qualitativo.

6.2. Elaboração do Laudo Simplificado:

A elaboração do Laudo Simplificado é para fins de pesquisa e poderá ser anexado ao prontuário do Contactante.

- a) Preencha o cabeçalho do Laudo Simplificado com (fig. 8):
- Identificação do Paciente (PID)
 - Data de nascimento do Paciente
 - Data e hora de coleta do sangue
 - Data de análise do QuantiFERON
 - Data de entrega do resultado

TESTE IGRA

Cabeçalho

Identificação do paciente

PID:	N° da Requisição:	Data Nascimento: / /
Data da coleta: / /	Data da análise: / /	Data da liberação: / /

Resultado:

ID do paciente	Nil	TB1 Ag	TB2 Ag	Mitógeno	TB1 Ag - Nil	TB2 Ag - Nil	Mitógeno - Nil	Resultado
								<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Indeterminado

Figura 8 – Laudo informativo: identificação do paciente e datas de referência.

- b) Coloque os valores numéricos e qualitativos gerados pelo laudo do software em seus respectivos locais (fig. 9):

TESTE IGRA

PID:	N° da Requisição:	Data Nascimento: / /
Data da coleta: / /	Data da análise: / /	Data da liberação: / /

Resultado:

ID do paciente	Nil	TB1 Ag	TB2 Ag	Mitógeno	TB1 Ag - Nil	TB2 Ag - Nil	Mitógeno - Nil	Resultado
								<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Indeterminado

Resultados								
ID do paciente	Nil	TB1	TB2	Mitógeno	TB1 - Nil	TB2 - Nil	Mitógeno - Nil	Resultado
ID 1	0,46	0,19	0,23	> 10*	-0,27	-0,23	> 10*	NEGATIVO
ID 2	0,08	0,09	0,13	> 10*	0,01	0,05	> 10*	NEGATIVO
ID 3	0,23	0,25	0,16	8,16	0,02	-0,07	7,93	NEGATIVO
ID 4	0,05	0,45	0,98	> 10*	0,40	0,93	> 10*	POSITIVO

* % OD resultado em IU/mL, fora do intervalo linear do ELISA.

Figura 9 – Inserção dos resultados nos locais correspondentes.

c) O profissional responsável pela análise deverá assinar o Laudo informativo (fig. 10);

Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)
Laboratório de Imunologia de Pesquisa Clínica do Instituto Carlos Borborema

TESTE IGRA

PID: _____ Nº da Requisição: _____ Data Nascimento: / / _____

Data da coleta: / / _____ Data da análise: / / _____ Data da liberação: / / _____

Resultado:

ID do paciente	Nil	TB1 Ag	TB2 Ag	Mitógeno	TB1 Ag - Nil	TB2 Ag - Nil	Mitógeno - Nil	Resultado
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Indeterminado

Resultados do QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT®-Plus) são interpretados como se segue:

Nº (U/mL)	Antígeno TB1 menos Nil (U/mL)	Antígeno TB2 menos Nil (U/mL)	Mitógeno menos Nil (U/mL)	Resultado do QuantiFERON-TB Gold Plus	Registro/Interpretação
<= 0,35	<= 0,35	<= 0,35	<= 0,5	Negativo	Infeção por <i>M. tuberculosis</i> /NO provável
>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	>= 0,5	Positivo	Infeção por <i>M. tuberculosis</i> provável
>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	< 0,5	Indeterminado	Os resultados da reação ao Antígeno TB são indeterminados
>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	< 0,5	Indeterminado	Os resultados da reação ao Antígeno TB são indeterminados
>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	>= 0,35 e < 25% do valor de Nil	< 0,5	Indeterminado	Os resultados da reação ao Antígeno TB são indeterminados

Observações: IGRA: Ensaio baseado na detecção da produção de interferon-gama.
 Exame realizado por resposta in vivo aos antígenos de micobactéria ESAT-6, CFP-10. Importante observar que um teste negativo pode não excluir totalmente a infecção tuberculosa, uma vez que o estágio da infecção e as condições que afetam a imunidade do indivíduo pode alterar a resposta aos antígenos. A positividade ao teste não deve ser utilizada como critério único para diagnóstico ou tratamento da tuberculose latente. Resultados indeterminados podem ocorrer devido a problemas técnicos ou por características individuais, sendo aconselhável a repetição do teste caso a realização de exames complementares.

 Nome do Responsável
 Profissão - Nº Conselho:
 Nº CNES

Figura 10 – Localização para assinatura do responsável técnico da análise.

d) O Laudo informativo deverá ser enviado para a Clínica em envelope lacrado.

6.3. Inserção dos resultados no REDCap e upload de laudo:

6.3.1. Inserção dos resultados no REDCap:

a) Após fazer LOGIN e selecionar o Contactante (Coorte B) cujos resultados serão inseridos, selecione na linha de **Resultados Laboratoriais (SANGUE e URINA)** a aba correspondente à visita do Contactante: **Visita Inicial** ou **Mês 6 Visita** (fig. 3).

Instrumento de Coleta de Dados	Formulário Múltiplo	Visita Inicial	Mês 6 Visita	Acompanhamento Telefônico 1	Acompanhamento Telefônico 2	Acompanhamento Telefônico 3	Saída Prematura
Arrolamento		<input checked="" type="radio"/>					
Visita Basal		<input checked="" type="radio"/>					
Mês 6 Visita			<input type="radio"/>				
Acompanhamento Telefônico				<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Prova Tuberculínica		<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Profilaxia para TB Latente	<input checked="" type="radio"/>						
Tratamento de HIV	<input checked="" type="radio"/>						
Raio-X de Tórax		<input type="radio"/>					<input type="radio"/>
Resultados Laboratoriais (SANGUE e URINA)		<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>				<input type="radio"/>
Resultados QuantiFERON - Labs		<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>				
Rastreamento de amostra biológica - SANGUE e URINA		<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>				<input type="radio"/>
Rastreamento De Amostra Biológica - SANGUE e URINA (necessidade de re-coleta)		<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>				<input type="radio"/>
Rastreamento de amostra biológica - ESCARRO							<input type="radio"/>
Rastreamento De Amostra Biológica - ESCARRO (necessidade de re-coleta)							<input type="radio"/>
Resultados Laboratoriais (ESCARRO)							<input type="radio"/>
Saída Prematura do Estudo							<input type="radio"/>
Desfecho Final						<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Aba para inserir resultados
QUANTITATIVOS e QUALITATIVOS

Aba para inserir LAUDO

Figura 3 – Indicação da aba que deverá receber o resultado quantitativo e qualitativo, e a aba onde o laudo deverá ser carregado.

- b) Imediatamente a tela irá mudar para a aba para inserir os resultados de sangue obtidos. Localize o item referente ao exame do QuantiFERON (fig. 4);
- c) Marque **SIM** para a pergunta referente à realização do exame e então insira a data da coleta do sangue (**Data do teste**) e a data em que a análise foi realizada (**Data do resultado**);
- d) Em **Resultado**, marque o resultado QUALITATIVO obtido (figura 2, última coluna): POSITIVO, NEGATIVO ou INDETERMINADO;
- e) Para inserir os resultados QUANTITATIVOS, transcreva os valores contidos nas colunas **Nil**, **TB1**, **TB2** e **Mitógeno** para as linhas correspondentes (fig. 4);

QuantIFERON (obrigatório apenas para a Coorte B)

Save & Exit Form
 Salvar e ir para o próximo formulário
 -- Cancelar --

O exame foi realizado? Sim Não Não se aplica

Data do teste: 09-08-2017 Hoje D-M-Y
 Considerar a data da coleta.

Data do resultado: 11-08-2017 Hoje D-M-Y
 Considerar a data do laudo.

Resultado: Positivo Negativo Indeterminado

Concentração Nil: (Formato: 99,99 IU/mL. Não utilizar pontos, somente vírgulas.)

Concentração TB1: (Formato: 99,99 IU/mL. Não utilizar pontos, somente vírgulas.)

Concentração TB2: (Formato: 99,99 IU/mL. Não utilizar pontos, somente vírgulas.)

Concentração Mitógeno: (Formato: 99,99 IU/mL. Não utilizar pontos, somente vírgulas.)

RESULTADO QUALITATIVO

RESULTADOS QUANTITATIVOS

Resultados								
ID do paciente	Nil	TB1	TB2	Mitógeno	TB1- Nil	TB2- Nil	Mitógeno- Nil	Resultado
ID 1	0,46	0,19	0,23	> 10*	-0,27	-0,23	> 10*	NEGATIVO
ID 2	0,08	0,09	0,13	> 10*	0,01	0,05	> 10*	NEGATIVO
ID 3	0,23	0,25	0,16	8,16	0,02	-0,07	7,93	NEGATIVO
ID 4	0,05	0,45	0,98	> 10*	0,40	0,93	> 10*	POSITIVO

* O OD resultou em IU/mL fora do intervalo linear do ELISA.

Figura 4 – Campos para inserção de resultados qualitativos e quantitativos no REDCap.

f) Finalizado o procedimento, clique em **Salvar e ir para o próximo formulário**.

6.3.2. Upload dos laudos no REDCap:

O Formulário seguinte é específico para fazer o UPLOAD do laudo gerado pelo software de análise do QuantiFERON e do Laudo Simplificado (fig. 5).

- Marque **SIM** para a pergunta referente à realização do exame e então insira a data em que a análise foi realizada (**Data em que o exame foi realizado**);
- Clique em **Carregar documento** (a seta preta da figura 5 indica os locais para clicar);

- c) Selecione o laudo individual referente ao Contactante cujos resultados e laudo estão sendo inseridos (fig 6). Faça o mesmo para o laudo simplificado (há dois espaços de carregamento);

Resultados QuantiFERON - Labs

Nome do Evento: **Visita Inicial**

Participante ID (Coorte B) B505243

Resultados QuantiFERON - Laboratórios

O exame foi realizado? Sim Não Não se aplica [Redefinir o valor](#)

Data em que o exame foi realizado: 06-10-2017 Hoje D-M-Y

Upload do laudo do exame: [Carregar documento](#)

Upload do laudo do exame: [Carregar documento](#)

Form Status

Complete? Complete

[Save & Exit Form](#)

[Salvar e ir para o próximo formulário](#)

[-- Cancelar --](#)

Resultados QuantiFERON - Labs

Nome do Evento: **Visita Inicial**

Participante ID (Coorte B) B505243

Resultados QuantiFERON - Laboratórios

O exame foi realizado? Sim Não Não se aplica [Redefinir o valor](#)

Data em que o exame foi realizado: 06-10-2017 Hoje D-M-Y

Upload do laudo do exame: 06out17...pdf (0.25 MB) [Remover o arquivo](#)

Upload do laudo do exame: [Carregar documento](#)

Form Status

Complete? Complete

[Save & Exit Form](#)

[Salvar e ir para o próximo formulário](#)

[-- Cancelar --](#)

Figura 5 – Tela para carregamento de Laudo.

IMPORTANTE: é necessário que o laudo gerado pelo programa e o Laudo Simplificado estejam nomeados de maneira diferente. Recomenda-se identificar o Laudo Simplificado com este nome e o PID do contactante (ex: laudo_simplificado_B000000-00XXX.pdf)

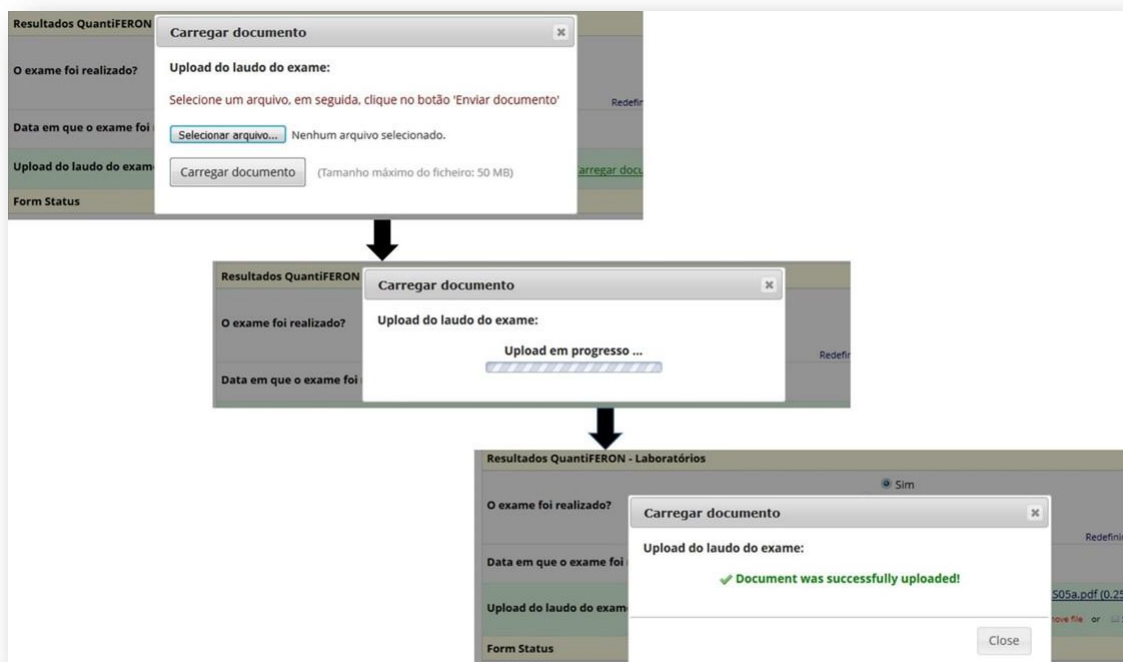


Figura 6 – Procedimento para carregamento do Laudo.

- d) Após o carregamento dos laudos, marque como **COMPLETE** no campo ao final do formulário (fig. 7);
- e) Clique em SALVAR e SAIR (**Save & Exit Form**).

Resultados QuantiFERON - Labs

Nome do Evento: **Visita Inicial**

Participante ID (Coorte B)

Resultados QuantiFERON - Laboratórios

O exame foi realizado? Sim Não Não se aplica Redefinir o valo

Data em que o exame foi realizado: D-M-Y

Upload do laudo do exame: .pdf (0.26 MB) Remover o arquivo or Envie-It

Upload do laudo do exame: (0.21 MB) Remove file or Send-It

Form Status

Complete? o próximo formulário

Unverified
Incomplete
Unverified
Complete
-- Cancelar --

Figura 7 – Finalização do upload do laudo no REDCap.

7. REVISÃO DAS INFORMAÇÕES

É necessário realizar a revisão dos resultados inseridos no REDCap e no laudo simplificado, antes da liberação completa de resultados/laudos. Para tal, é necessário designar pelo um colaborador para a realização da atividade.

- Obter o laudo gerado pelo software, inserido no REDCap, em formato não editável (PDF);
- Seguir os passos do item 6.2.1, letras A e B, para ter acesso à página dos resultados (IMPORTANTE: não alterar qualquer marcação ou resultado nesta página);
- Seguir até o item **QuantiFERON (obrigatório apenas para Coorte B)** e comparar os valores do laudo com os valores inseridos;
- Não havendo discordâncias de valores, clique em SALVA E SAIR (SAVE & EXIT) no topo da página;
- Obter o Laudo Simplificado no REDCap e descarregar;
- Comparar os valores qualitativos (POSITIVO/NEGATIVO/INDETERMINADO) e quantitativos do Laudo Simplificado com os valores especificados no laudo gerado pelo software.
- Não ocorrendo divergências de resultados

8. ANEXOS

Anexo 1 – Exemplo de Laudo gerado pelo software

Anexo 2 – Modelo de Laudo Informativo

Anexo 3 – Fluxograma

9. FORMULÁRIOS

- Laudo Informativo

10. REFERÊNCIAS


<http://www.quantiferon.com/irm/company/showpage.aspx/PDFs/162895883375/AnalysisSoftwareInstructions>

11. HISTÓRICO DE REVISÕES

Nº DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESP. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

Exemplo de Laudo gerado pelo software

1 de 1



Resultados do QuantiFERON®-TB Gold Plus

Data do ciclo: segunda-feira 7 agosto 2017
 Operador: Serafina
 Número do ciclo: teste01
 Número de lote do kit: 554010314

Versão 2.71

Ciclo do exame ELISA válido.

Resultados								
ID do paciente	NI	TB1	TB2	Mitógeno	TB1- NI	TB2- NI	Mitógeno- NI	Resultado
ID 1	0,46	0,19	0,23	> 10†	-0,27	-0,23	> 10 †	NEGATIVO

† O OD resultou em IU/mL fora do intervalo linear do ELISA.

Pde	Conc	Média	% de CV	Resultado do CQ
S1	4,00	0,774	1,5	APROVADO
S2	1,00	0,281	2,1	APROVADO
S3	0,25	0,099	N/A	APROVADO
S4	0,00	0,041	N/A	APROVADO

Intercepção: -2,3475 Desvio: 0,7741 Coeficiente de correlação: 1,00 (APROVADO)

Dados brutos (DB)

NI	TB1	TB2	Mitógeno
0,143	0,073	0,082	4,000

Os resultados do QuantiFERON-TB Gold Plus são interpretados como se segue:
 NOTAs: diagnóstico ou exclusão de tuberculose, e a avaliação da probabilidade de LTBI, requer uma combinação de conclusões epidemiológicas, de história clínica e de diagnóstico que devem ser levadas em consideração ao interpretar os resultados do QuantiFERON-TB Gold Plus.

NI† [IU/mL]	TB1 menos NI [IU/mL]	TB2 menos NI [IU/mL]	Mitógeno menos NI [IU/mL]	QFT-Plus Resultado	Relatório/interpretação
≥ 8,0	≥ 0,35 e ≥ 25% de NI	Qualquer um	Qualquer um	Positivo	Infecção por <i>M. Tuberculosis</i> provável
	Qualquer um	≥ 0,35 e ≥ 25% de NI			
< 8,0	< 0,35 ou ≥ 0,35 e < 25% de NI		≥ 0,5	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> NÃO provável
			< 0,5	Indeterminado	Não é possível determinar a probabilidade de infecção pelo <i>M. tuberculosis</i>
> 8,0	Qualquer um				

† O controle NI deve ser ≤ 8,0 IU/mL, e o mitógeno menos NI deve ser ≥ 0,5 IU/mL. OU TB1 ou TB2 menos NI deve ser ≥ 0,35 IU/mL para um paciente com um resultado válido do QuantiFERON-TB Gold Plus.

O controle de mitógeno geralmente acerta na maior resposta de gama-IFN das 4 amostras de cada pacote. Em alguns casos, o valor de OD de controle de mitógeno deve ficar acima do limite na leitura de microplacas; isto não tem impacto sobre a interpretação do exame. O nível de gama-IFN do controle NI é considerado um "piso de fundo" e é substituído do resultado do dos resultados de TB1 e de TB2 e do mitógeno referente a esse paciente. Em estudos clínicos, menos de 0,25% dos pacientes têm níveis de gama-IFN de > 8,0 IU/mL no controle NI.

O volume de corte do soro QuantiFERON-TB Gold Plus é de 0,35 IU/mL acima do controle NI (e o Anti-gama TB menos NI é ≥ 25% do controle NI) para cada ou para ambos os tubos TB. É provável que os indivíduos que exibem uma resposta a cada um ou a ambos os tubos TB acima deste corte estejam infectados com o *M. tuberculosis*.

A magnitude do nível de gama-IFN medido não pode ser correlacionada com o estágio ou grau de infecção, nível de reação imunológica, ou probabilidade de progressão para a doença ativa. Um resultado de QuantiFERON-TB Gold Plus positivo não indica necessariamente a presença de tuberculose ativa. Outros procedimentos diagnósticos, como a radiografia de tórax e o exame microbiológico da expectoração devem ser usados quando houver a suspeita de TB.

Podem-se encontrar informações mais detalhadas na seção "Interpretação dos Resultados" do Folheto de Embalagem do QuantiFERON-TB Gold Plus.

ANEXO 2

Modelo de Laudo Simplificado

TESTE IGRA

PID:	Nº da Requisição:	Data Nascimento: / /
Data da coleta: / /	Data da análise: / /	Data da liberação: / /

Resultado:

ID do paciente	Nil	TB1 Ag	TB2 Ag	Mitógeno	TB1 Ag - Nil	TB2 Ag - Nil	Mitógeno - Nil	Resultado
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Indeterminado

Resultados do QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT®-Plus) são interpretados como se segue:

Nil* (IU/mL)	Antígeno TB1 menos Nil (IU/mL)	Antígeno TB2 menos Nil (IU/mL)	Mitógeno menos Nil (IU/mL)	Resultado do QuantiFERON®-TB Gold Plus	Relatório/Interpretação
≤ 8,0	< 0,35	< 0,35	≥ 0,5	Negativo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> NÃO provável
	> = 0,35 e < 25% do valor de Nil	> = 0,35 e < 25% do valor de Nil	> = 0,5		
	> = 0,35 e ≥ 25% do valor de Nil	> = 0,35 e ≥ 25% do valor de Nil	Qualquer um	Positivo	Infecção por <i>M. tuberculosis</i> provável
	< 0,35	< 0,35	< 0,5	Indeterminado	Os resultados da reação ao Antígeno TB são indeterminados
> = 0,35 e < 25% do valor de Nil	> = 0,35 e < 25% do valor de Nil	< 0,5			
> 8,0	Qualquer um	Qualquer um	Qualquer um		

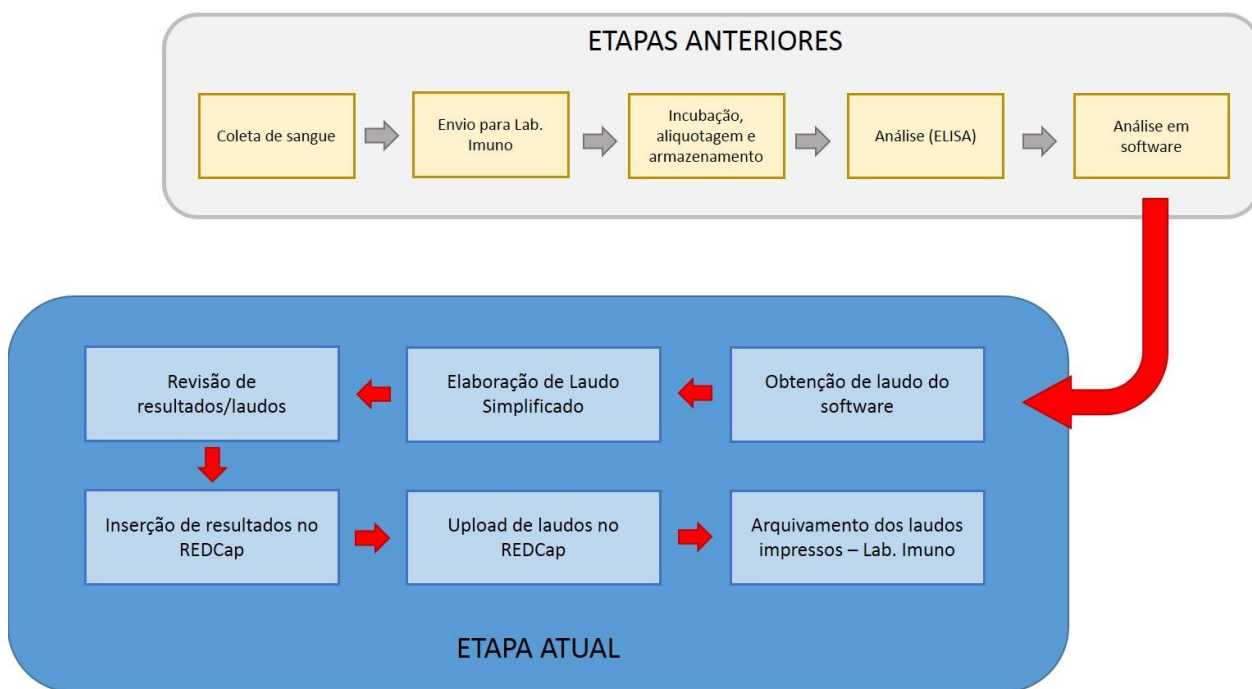
Observações: IGRA: Ensaio baseado na detecção da produção de interferon-gama.

Exame realizado por resposta in vitro aos antígenos de micobactéria ESAT-6, CFP-10. Importante observar que um teste negativo pode não excluir totalmente a infecção tuberculosa, uma vez que o estágio da infecção e as condições que afetam a imunidade do indivíduo pode alterar a resposta aos antígenos. A positividade ao teste não deve ser utilizada como critério único para diagnóstico ou tratamento da tuberculose latente. Resultados indeterminados podem ocorrer devido a problemas técnicos ou por características individuais, sendo aconselhável a repetição do teste e/ou a realização de exames complementares.

Nome do Responsável
 Profissão - Nº Conselho: |
 Nº CNES

Fluxograma

Liberação de resultados e laudos / arquivamento



ANEXO 4

Checklist: Processamento de tubos QuantiFERON® Gold Plus

Equipamentos	
Cabine de segurança estéril	
Estufa a 37°C (CO ₂ não é necessário)	
Centrífuga com capacidade para acomodar e centrifugar tubos QuantiFERON-TB Gold-Plus (veloc. 2000-3000 rcf)	
Micropipeta de 10µL a 100µL	
Freezer (-20°C)	
Insumos	
Álcool a 70%	
Estante para tubos QuantiFERON-TB Gold-Plus	
Ponteiras estéreis com barreira para 200µL	
Criotubos ependorf ® com tampa <i>safe-lock</i> para 0,5mL	
Etiquetas de identificação (NIL, TB1, TB2, MIT)	
Caixas 10x10	
Caneta permanente	

ANEXO 5

Checklist: Teste ELISA

Equipamentos	
Micropipeta de 10µL a 1000µL	
Micropipeta multicanal de 50µL a 100µL	
Agitador de Microplacas	
Lavadora de microplacas automática	
Leitor de ELISA (filtro de 450nm e de 620-650nm)	
Cronômetro	
Freezer (-20°C)	
Insumos	
Álcool a 70%	
Ponteiras estéreis com barreira (20µL, 200µL e 1000µL)	
Água deionizada ou destilada	
Canaletas descartáveis para soluções	
Criotubos ependorf ® de 1,5mL	
Criotubos ependorf ® com tampa <i>safe-lock</i> para 0,5mL	
Papel toalha	
Tubos de polipropileno de 15mL	
Papel alumínio	
Kit QuantiFERON-TB Gold-Plus	

ANEXO 6

Formulário de registro da técnica ELISA-Quantiferon® - TB Gold Plus(QFT-Plus)

Data: ___/___/___ Data de abertura do Kit: ___/___/___ LOTE KIT: _____
 Horário de retirada do kit e amostras para ambientação: ____:____ Horário início da reação: ____:____
 Operador: _____ Número do ciclo: _____ Temperatura ambiente: ____°C

MAPA DA PLACA DE ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	✓	OBSERVAÇÕES		ANEXAR RESULTADOS IMPRESSOS
Curva Padrão				
Amostras				
Conjugado Diluição →				
1ª INCUBAÇÃO		Início: ____:____	Término: ____:____	
Lavagem				
Substrato				
2ª INCUBAÇÃO		Início: ____:____	Término: ____:____	
Solução de parada				
Leitura				

ANEXO 7

Formulário de processamento da amostra QuantiFERON - TB Gold Plus (QFT-Plus)	FOR IMU 001
---	--------------------

Data: ___/___/___ Início da Incubação: _____ : _____ Operador: _____

Paciente	PID	Tubo	Validade	Lote	Obs:
01		NIL			
		TB 01			
		TB 02			
		Mit			
02		NIL			
		TB 01			
		TB 02			
		Mit			
03		NIL			
		TB 01			
		TB 02			
		Mit			
04		NIL			
		TB 01			
		TB 02			
		Mit			
05		NIL			
		TB 01			
		TB 02			
		Mit			
06		NIL			
		TB 01			
		TB 02			
		Mit			

PID - Número de identificação do participante

Tubo NIL - Usar **OK, ↑, ↓** para definir o volume do sangue dentro do tubo: **OK=0,8-1,2ml; ↑1,2ml, ↓0,8**

Tubo TB (01 E 02) - Usar **OK, ↑, ↓** para definir o volume do sangue dentro do tubo: **OK=0,8-1,2ml; ↑1,2ml, ↓0,8**

Tubo Mit - Usar **OK, ↑, ↓** para definir o volume do sangue dentro do tubo: **OK=0,8-1,2ml; ↑1,2ml, ↓0,8**

OBS: Anotar se amostras de plasma apresentam hemólise, coágulos ou gordura.

Data do término da incubação: ___/___/___ Horário do término da incubação _____ : _____

Condições de centrifugação

Velocidade: _____ (Xg) Temperatura: _____ °C

Tempo: _____ minutos

Operador: _____