

QuantiFERON[®] - TB **Gold**

**Il test IFN-gamma su sangue intero
per la misurazione delle risposte
agli antigeni peptidici ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 (p. 4)**

FOGLIETTO
ILLUSTRATIVO

Per uso diagnostico *in vitro*



INDICE

1. FINALITÀ D'USO	2
2. RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST	2
Principi del test	3
Durata del test	3
3. REAGENTI E CONSERVAZIONE	4
Materiali necessari (ma non forniti in dotazione)	4
Istruzioni per la conservazione	5
Provette per il prelievo del sangue	5
Reagenti del kit	5
Reagenti ricostituiti e inutilizzati	5
4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI	6
Avvertenze	6
Precauzioni	6
5. PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI	9
6. ISTRUZIONI PER L'USO	11
FASE UNO - Incubazione del sangue e prelievo del plasma	11
FASE DUE - IFN- γ umano ELISA	12
7. CALCOLI E INTERPRETAZIONE DEL TEST	14
Generazione della curva standard	14
Controllo di qualità del test	15
Interpretazione dei risultati	16
8. LIMITI DEL METODO	20
9. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE	20
10. INFORMAZIONI TECNICHE	22
Risultati indeterminati	22
Campioni di plasma coagulato	22
Risoluzione dei problemi del test ELISA	23
Sviluppo di colorazione aspecifica	23
Valori di lettura di densità ottica bassi per gli standard	23
Background elevato	24
Curva standard non lineare e variabilità dei duplicati	24
11. BIBLIOGRAFIA	25
12. ASSISTENZA TECNICA	26
13. PROCEDURA DEL TEST (IN SINTESI)	27
14. MODIFICHE IMPORTANTI	30

1. FINALITÀ D'USO

QuantIFERON[®]-TB Gold In-Tube (QFT[®]) è un test diagnostico *in vitro* che utilizza un cocktail peptidico che simula le proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4), per stimolare le cellule del sangue intero eparinizzato. La rilevazione dell'interferone- γ (IFN- γ) mediante il dosaggio immunoenzimatico ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) consente di identificare le risposte *in vitro* agli agenti peptidici associati all'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT è un test indiretto per la rilevazione dell'infezione da *M. tuberculosis* (inclusa la malattia attiva) ed è previsto per l'uso congiuntamente alla valutazione dei rischi, agli accertamenti radiologici e ad altre valutazioni mediche e diagnostiche.

2. RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La tubercolosi è una malattia contagiosa causata dall'infezione dagli organismi del *M. tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), che in genere si trasmette attraverso le particelle aerosoliche veicolate per via aerogena da pazienti colpiti da tubercolosi respiratoria. Un individuo con infezione recente si può ammalare di tubercolosi nell'arco di alcune settimane o mesi, anche se la maggior parte dei soggetti contagiati non manifesta alcuna sintomatologia. L'infezione tubercolare latente (LTBI), una condizione asintomatica non trasmissibile, è presente in alcuni soggetti, che possono poi sviluppare la tubercolosi a mesi o anni di distanza. Scopo principale della diagnosi della LTBI è individuare un trattamento medico idoneo a prevenire la malattia tubercolare conclamata. Fino a poco tempo fa, il test cutaneo alla tubercolina (TST) era l'unico metodo disponibile per la diagnosi della LTBI. La sensibilità cutanea alla tubercolina si manifesta da 2 a 10 settimane dall'infezione. Tuttavia, alcuni soggetti contagiati (quali, ad esempio, individui con funzione immunitaria indebolita, ma anche persone che non presentano tale condizione) non rispondono alla tubercolina. Viceversa, vi sono soggetti non colpiti da infezione tubercolare che manifestano sensibilità alla tubercolina e risultano positivi al test TST dopo la vaccinazione con il bacillo di Calmette-Guérin (BCG), in seguito ad infezione da micobatteri diversi da quelli del complesso *M. tuberculosis*, o per altri fattori imprecisati.

Occorre distinguere la LTBI dalla tubercolosi, una malattia soggetta all'obbligo di notifica che solitamente colpisce i polmoni e il tratto respiratorio inferiore, ma può interessare anche altri sistemi di organi. La diagnosi della tubercolosi si basa sull'anamnesi e su riscontri fisici, radiologici, istologici e micobatteriologici.

Il test QFT è un test che misura le risposte immuni cellulo-mediate (CMI) agli antigeni peptidici che simulano le proteine micobatteriche. Tali proteine - ESAT-6, CFP-10 e TB7.7 (p4) - sono assenti in tutti i ceppi di BCG e nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari, ad eccezione di *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*.¹ In genere, il sangue dei soggetti infetti da organismi del complesso *M. tuberculosis* contiene linfociti in grado di riconoscere questi e altri antigeni micobatterici. Il processo di riconoscimento comporta la generazione e secrezione di citochina, IFN- γ . La rilevazione e conseguente quantificazione di IFN- γ costituisce il principio del presente test.

Gli antigeni utilizzati nel test QFT sono un cocktail peptidico che simula le proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4). Numerosi studi hanno dimostrato che tali antigeni peptidici stimolano le risposte IFN- γ nelle cellule T di individui affetti da *M. tuberculosis*, ma in genere non di soggetti non infetti, o vaccinati con BCG, che non presentano malattia tubercolare o che non sono a rischio di LTBI.¹⁻³² Tuttavia, trattamenti medici o condizioni che alterano la funzionalità immunitaria possono potenzialmente ridurre le risposte IFN- γ . I pazienti affetti da altre infezioni micobatteriche possono reagire anche alle proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4) poiché i geni che le codificano sono presenti in *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*.^{1,23} QFT è sia un test per la LTBI che un ausilio utile nella diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis complex* in pazienti malati. Un risultato positivo avvalorza la diagnosi di malattia tubercolare, anche se le infezioni provocate da altri micobatteri (ad es. *M. kansasii*) possono anch'esse indurre positività. Per confermare o escludere la malattia tubercolare si rendono necessari altri accertamenti medici e diagnostici.

Principi del test

Il sistema QFT prevede l'uso di provette specifiche per la raccolta di sangue intero. L'incubazione del sangue avviene nelle provette nell'arco di 16-24 ore; successivamente il plasma viene prelevato ed analizzato per rilevare la presenza di IFN- γ prodotto in risposta agli antigeni peptidici.

Il test QFT si svolge in due fasi. Innanzi tutto il sangue intero viene raccolto in ciascuna delle provette dedicate QFT, costituite da una provetta di controllo nullo, una provetta di antigene TB e una provetta opzionale per mitogeno.

La provetta del mitogeno può essere utilizzata come controllo positivo del test QFT, in particolare nel caso in cui sussistano dubbi circa lo stato immunitario del soggetto. La provetta del mitogeno può anche essere utilizzata come controllo della corretta manipolazione e incubazione dei campioni di sangue.

Le provette vanno incubate a 37°C il più presto possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo dei campioni. Dopo un periodo di incubazione compreso tra 16 e 24 ore, le provette sono sottoposte a centrifugazione, il plasma viene rimosso e si procede alla misurazione della quantità di IFN- γ (IU/ml) con il test ELISA.

Un test si considera positivo se la risposta IFN- γ alla provetta di antigene TB è significativamente superiore al valore nullo espresso in IU/ml di IFN- γ . Se utilizzato, il campione di plasma stimolato dal mitogeno funge da controllo positivo IFN- γ per ciascun campione analizzato. Una bassa risposta al mitogeno (<0,5 IU/ml) indica un risultato indeterminato se il campione di sangue ha avuto una risposta negativa anche agli antigeni TB. Un'eventualità di questo genere può manifestarsi in presenza di linfociti insufficienti, o di una loro ridotta attività dovuta ad un trattamento inadeguato del campione, a procedure di riempimento/miscelazione scorrette della provetta del mitogeno, o all'incapacità dei linfociti del paziente di generare IFN- γ . Il campione nullo serve a compensare gli effetti di background, degli anticorpi eterofili,⁷ o di IFN- γ non specifico nei campioni di sangue. Il livello di IFN- γ nella provetta nulla viene sottratto al livello di IFN- γ della provetta dell'antigene TB e del mitogeno (se utilizzata).

Durata del test

La stima dei tempi richiesti per effettuare il test QFT è riportata di seguito, assieme all'indicazione del tempo necessario per l'analisi di campioni multipli in modalità batch:

Incubazione a 37° C delle provette di sangue:	16-24 ore
ELISA:	Circa 3 ore per ogni piastra ELISA
	<ul style="list-style-type: none">• <1 ora di lavoro• Aggiungere 10-15 minuti per ciascuna piastra in più

3. REAGENTI E CONSERVAZIONE

Provette per il prelievo di sangue per l'antigene TB e l'antigene di controllo

Numero di catalogo T0590-0301

- | | |
|-------------------------------------|--------------|
| 1. Controllo nullo (tappo grigio) | 100 provette |
| 2. Antigene TB (tappo rosso) | 100 provette |
| 3. Controllo mitogeno (tappo viola) | 100 provette |

NOTA: Le provette sono disponibili anche in altre combinazioni:

*100 provette di controllo nullo, 100 provette di antigene TB
(n. cat. T0590-0201)*

100 provette di controllo mitogeno (n. cat. T0593-0201)

Provette High Altitude (fare riferimento al capitolo 5)

N. cat. T0590-0501: (High Altitude) 100 provette di controllo nullo, 100 provette di antigene TB

N. cat. T0590- 0505: (High Altitude) 100 provette di controllo nullo, 100 provette di antigene TB e 100 provette per mitogeno

N. cat. T0593- 0501: (High Altitude) 100 provette di controllo mitogeno

Componenti per il test ELISA

Componenti per il test ELISA	N. di catalogo: 0594-0201	N. di catalogo: 0594-0501
	Kit a 2 piastre	Confezione laboratorio di riferimento
Strisce per piastre di microtitolazione rivestite con anticorpo monoclonale murino anti IFN- γ umano	2 piastre a 96 pozzetti	20 piastre a 96 pozzetti
Standard IFN- γ umano, liofilizzato (<i>contiene IFN-γ umano ricombinante, caseina bovina, 0,01 % p/v timerosal</i>)	1 flacone (8 IU/ml quando ricostituito)	10 flaconi (8 IU/ml quando ricostituito)
Diluyente verde, GD (<i>contiene caseina bovina, siero murino normale, 0,01% p/v timerosal</i>)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Coniugato concentrato 100X, liofilizzato (<i>anticorpo murino anti IFN-γ umano coniugato a HRP, contiene 0,01% p/v timerosal</i>)	1 x 0,3 ml (quando ricostituito)	10 x 0,3 ml (quando ricostituito)
Tampone di lavaggio concentrato 20X (<i>pH 7,2, contiene 0,01 % p/v timerosal</i>)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Soluzione di substrato enzimatico (<i>contiene H₂O₂, 3,3',5,5' tetrametilbenzidina</i>)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Soluzione di arresto enzimatico (<i>contiene 0,5M H₂SO₄</i>)	1 x 15 ml	10 x 15 ml

Materiali necessari (ma non forniti in dotazione)

- Incubatore a 37°C. CO₂ non richiesta.
- Pipette calibrate a volume variabile (da 10 µl a 1000 µl) con puntali monouso
- Pipetta calibrata multicanale per la dispensazione di volumi di 50 µl e 100 µl con puntali monouso
- Agitatore per micropiastre
- Acqua distillata o deionizzata – 2 litri
- Stazione di lavaggio per micropiastre (si consiglia un dispositivo di lavaggio automatico)
- Lettore per micropiastre dotato di filtro da 450 nm e di filtro di riferimento da 620 nm a 650 nm

Istruzioni per la conservazione

Provette per il prelievo del sangue

- Conservare le provette per il prelievo del sangue ad una temperatura compresa tra 4°C e 25°C.

Reagenti del kit

- Conservare il kit refrigerato ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.
- Conservare sempre la soluzione di substrato enzimatico al riparo dalla luce diretta.

Reagenti ricostituiti e inutilizzati

Per istruzioni relative alla ricostituzione dei reagenti, fare riferimento al capitolo 6 (pagina 11).

- Se conservato a 2-8°C, lo standard ricostituito del kit si mantiene stabile fino a 3 mesi.
 - *Prendere nota della data in cui è stato ricostituito lo standard del kit.*
- Una volta ricostituito, il coniugato concentrato 100X non utilizzato va riportato alla temperatura di conservazione compresa tra 2°C e 8°C e deve essere utilizzato entro 3 mesi.
 - *Prendere nota della data in cui è stato ricostituito il coniugato.*
- Il coniugato pronto per l'uso deve essere utilizzato entro 6 ore dalla preparazione.
- Il tampone di lavaggio pronto per l'uso può essere conservato a temperatura ambiente per un massimo di 2 settimane.

4. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Avvertenze

- Un risultato negativo al test QFT non esclude la possibilità di infezione da *M. tuberculosis* o di malattia tubercolare: i risultati falsi negativi possono essere dovuti allo stadio dell'infezione (ad es. un campione prelevato prima dello sviluppo della risposta immuno-cellulare), a condizioni di comorbidità che alterano le funzioni immunitarie, alla manipolazione scorretta delle provette di raccolta del sangue dopo la venopuntura, all'esecuzione non corretta del test o ad altre variabili immunologiche.
- Un risultato positivo al test QFT non può costituire il riscontro unico o definitivo per la diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis*. L'esecuzione scorretta del test può dare luogo a risultati falsi positivi.
- Un risultato positivo al test QFT deve essere confermato da ulteriori indagini mediche e diagnostiche atte ad individuare la presenza di malattia tubercolare attiva (ad es. striscio e coltura AFB , radiografia del torace).
- Anche se gli antigeni ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4) sono assenti da tutti i ceppi BCG e dalla maggior parte dei micobatteri non tubercolari conosciuti, è possibile che un risultato positivo al test QFT sia dovuto ad infezione da *M. kansasii*, *M. szulgai* o *M. marinum*. Se si sospetta la presenza di tali infezioni, valutare la possibilità di eseguire test alternativi.

Precauzioni

- Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
- **Nocivo: la soluzione di substrato enzimatico** contiene 3,3',5,5' tetrametilbenzidina che è nociva per ingestione, per inalazione e a contatto con la pelle. Può essere irritante per gli occhi, membrane mucose ed il tratto respiratorio. Proteggersi gli occhi, indossare guanti e seguire le misure precauzionali per la manipolazione dei prodotti chimici previste dal laboratorio.
- **Nocivo: la soluzione di arresto enzimatico** contiene H₂SO₄ che è nocivo per ingestione, a contatto con gli occhi, a contatto con la pelle e per inalazione. Proteggersi gli occhi, indossare guanti e il normale abbigliamento protettivo da laboratorio. Qualora la soluzione di arresto entri in contatto con la cute o con gli occhi, sciacquare abbondantemente con acqua e consultare il medico.
- **Nocivo: lo standard IFN- γ e il coniugato concentrato 100X** possono provocare disturbi in caso di ingestione e causare irritazioni della cute. Indossare i guanti e normali indumenti protettivi da laboratorio.
- **Manipolare il sangue umano come se fosse potenzialmente infettivo.** Osservare le linee guida previste per la manipolazione del sangue.
- Il **timerosal** viene utilizzato come conservante in alcuni reagenti. Può risultare tossico in caso di ingestione, inalazione o a contatto con la pelle.
- Il **diluyente verde (GD)** contiene siero normale di topo e caseina, che possono provocare reazioni allergiche; evitare il contatto con la cute.
- La mancata osservanza delle istruzioni riportate nel foglietto illustrativo può portare a risultati errati. Leggere attentamente le istruzioni prima dell'uso.
- Non utilizzare il kit se un flacone di reagente è danneggiato o non perfettamente sigillato prima dell'uso.
- Non miscelare o utilizzare i reagenti ELISA appartenenti ad altri lotti del kit QFT.

- Smaltire i reagenti non utilizzati e i campioni biologici nel rispetto dei regolamenti locali e nazionali vigenti in materia.
- Non utilizzare le provette per il prelievo del sangue o il kit ELISA oltre la data di scadenza.
- Accertarsi che le attrezzature di laboratorio come i dispositivi di lavaggio e lettura delle piastre siano stati calibrati/validati per l'uso.

5. PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

QFT contiene le seguenti provette per il prelievo dei campioni:

1. controllo nullo (tappo grigio con anello bianco) (utilizzare tra il livello del mare e 810 m)
2. antigene TB (tappo rosso con anello bianco) (utilizzare tra il livello del mare e 810 m)
3. controllo mitogeno – facoltativo (tappo viola con anello bianco) (utilizzare tra il livello del mare e 810 m)
4. controllo nullo (tappo grigio con anello giallo) (utilizzare tra 1.020 m e 1.875 m)
5. antigene TB (tappo rosso con anello giallo) (utilizzare tra 1.020 m e 1.875 m)
6. controllo mitogeno – facoltativo (tappo viola con anello giallo) (utilizzare tra 1.020 m e 1.875 m)

Gli antigeni aderiscono alle pareti interne delle provette per il prelievo del sangue. Di conseguenza, è fondamentale miscelare completamente il contenuto delle provette con i campioni di sangue. Le provette devono essere trasferite in un incubatore a 37°C il più presto possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo dei campioni.

Per ottenere risultati ottimali è opportuno attenersi alle seguenti procedure:

1. Per ciascun soggetto in esame prelevare 1 ml di sangue per venopuntura direttamente in ognuna delle provette dedicate QFT. La procedura deve essere eseguita da un addetto ai prelievi addestrato.
 - Ad altitudini di 810 metri utilizzare le provette per la raccolta del sangue QFT standard. Ad altitudini comprese tra 1.020 e 1.875 metri utilizzare le provette per la raccolta del sangue QFT High Altitude (HA).

Se le provette per la raccolta del sangue QFT vengono utilizzate ad altitudini che non rientrano in quelle sopra indicate, o se il volume di sangue raccolto è insufficiente, prelevare il sangue con una siringa e trasferire 1 ml in ciascuna delle tre provette. Per motivi di sicurezza, la procedura migliore da seguire in questo caso consiste nel togliere l'ago della siringa e, rispettando le adeguate regole di sicurezza, togliere i tappi dalle tre provette QFT e aggiungere 1 ml di sangue in ciascuna (fino a raggiungere la tacca nera sul lato dell'etichetta della provetta). Richiudere per bene le provette con i tappi e miscelare seguendo le istruzioni riportate di seguito.
 - Dato che nelle provette da 1 ml il sangue fluisce con relativa lentezza, mantenere la provetta sull'ago per altri 2-3 secondi dopo che sembra riempita completamente, per accertarsi di aver prelevato il volume corretto.

La tacca nera sul lato delle provette indica il volume di riempimento di 1 ml. Le provette per il prelievo del sangue QFT sono state validate per volumi che variano da 0,8 a 1,2 ml. Se il livello di sangue in una qualunque delle provette non raggiunge la linea indicata, si consiglia di prelevare un altro campione di sangue.
 - Se per il prelievo del sangue si utilizza un ago a farfalla, è opportuno verificare con una provetta vuota che il tubo si sia riempito di sangue, prima di usare le provette QFT.
2. Immediatamente dopo aver riempito le provette, scuoterle dieci (10) volte con decisione quanto basta ad assicurarsi che l'intera superficie interna della provetta sia ricoperta di sangue, in modo da sciogliere gli antigeni presenti sulle pareti della provetta.
 - Durante la fase di riempimento, le provette devono essere ad una temperatura compresa tra 17 e 25°C.
 - La miscelazione troppo energica può causare la rottura del gel con conseguenti risultati anormali.
3. Etichettare correttamente le provette.
4. Le provette devono essere trasferite in un incubatore a 37°C ± 1°C il prima possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo dei campioni. Prima dell'incubazione tenere le provette a temperatura ambiente (22°C ± 5°C). Non refrigerare né congelare i campioni di sangue.

6. ISTRUZIONI PER L'USO

Fase uno – Incubazione del sangue e prelievo del plasma

Materiali forniti

Provette per prelievo del sangue QFT (consultare il capitolo 3).

Materiali necessari (ma non forniti in dotazione)

Consultare il capitolo 3.

Procedura

1. Se i campioni di sangue non vengono incubati immediatamente dopo il prelievo, **le provette devono essere nuovamente miscelate capovolgendone il contenuto per 10 volte immediatamente prima dell'incubazione**, come descritto nel capitolo 5.
2. Incubare le provette **IN POSIZIONE VERTICALE** a 37°C per 16-24 ore. L'incubatore non richiede CO₂ né umidificazione.
3. Dopo averle incubate a 37°C, le provette per il prelievo del sangue possono essere conservate ad una temperatura compresa tra 4°C e 27°C per un massimo di 3 giorni prima della centrifugazione.
4. Dopo aver incubato le provette a 37°C, centrifugarle per 15 minuti a 2000-3000 x g (RCF) onde facilitare il prelievo di plasma. Il plug di gel separerà le cellule dal plasma. In caso contrario, centrifugare di nuovo le provette ad una velocità più elevata.
 - È possibile prelevare il plasma senza centrifugazione, anche se occorre prestare maggior attenzione durante la rimozione del plasma, per non distruggere le cellule.
5. **Dopo la centrifugazione, non pipettare su e giù né miscelare in altro modo il plasma prima del prelievo. Prestare sempre attenzione a non toccare il materiale sulla superficie del gel.**
 - I campioni di plasma vanno prelevati utilizzando esclusivamente una **pipetta**.
 - I campioni di plasma possono essere caricati direttamente dalle provette di prelievo centrifugate alla piastra ELISA QFT, anche quando si utilizzano stazioni di lavoro ELISA automatizzate.
 - I campioni di plasma possono essere conservati per un massimo di 28 giorni a 2-8°C o, dopo il prelievo, a temperature inferiori ai -20°C per lunghi periodi.

Fase due – IFN- γ umano ELISA

Materiali forniti

Kit ELISA QFT (consultare il capitolo 3).

Materiali necessari (ma non forniti in dotazione)

Consultare il capitolo 3.

Procedura

1. Tutti i campioni di plasma e i reagenti, tranne il coniugato concentrato 100X, devono essere portati a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) prima dell'uso. Farli equilibrare per almeno 60 minuti.
2. Togliere le strisce non necessarie dal supporto, sigillare di nuovo il sacchetto di alluminio e conservare in frigorifero fino a nuovo uso.

Calcolare almeno una striscia per gli standard QFT e un numero di strisce sufficienti per il numero di soggetti da sottoporre a test (v. figure 2A e 2B, rispettivamente per i formati a 2 e 3 provette). Dopo l'uso, conservare il supporto e il coperchio per utilizzarli con le strisce rimanenti.

3. Ricostituire lo standard liofilizzato del kit con il volume di acqua distillata o deionizzata indicato sull'etichetta del flacone standard. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e garantire la completa solubilizzazione. La ricostituzione dello standard al volume indicato produce una soluzione con una concentrazione di 8,0 IU/ml.

Nota: il volume di ricostituzione dello standard del kit varia da lotto a lotto.

Utilizzare lo standard ricostituito del kit per produrre una serie di diluizioni 1:4 di IFN- γ in diluente verde (Green Diluent, GD) - v. figura 1. S1 (Standard 1) contiene 4 IU/ml, S2 (Standard 2) contiene 1 IU/ml, S3 (Standard 3) contiene 0,25 IU/ml e S4 (Standard 4) contiene 0 IU/ml (solo GD). Gli standard vanno analizzati almeno in duplicato.

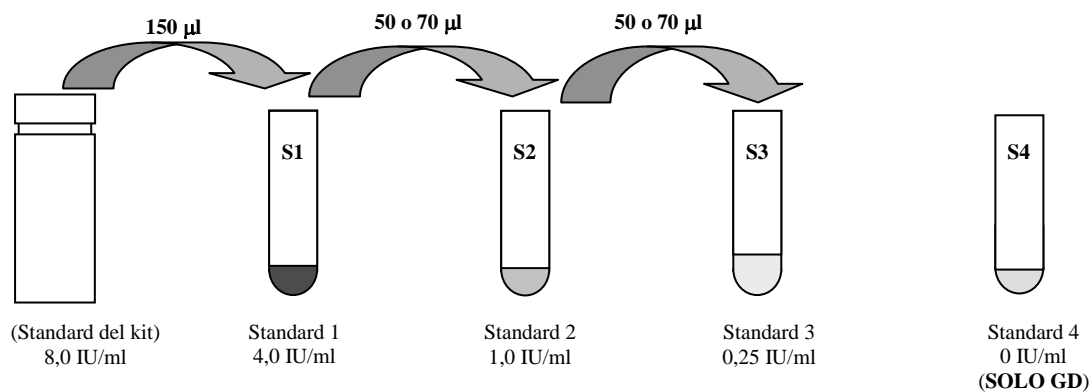
PROCEDURA RACCOMANDATA PER STANDARD IN DUPLICATO

- a. Etichettare 4 provette con "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Aggiungere **150 μl** di GD a S1, S2, S3, S4.
- c. Aggiungere **150 μl** dello standard del kit a S1 e miscelare accuratamente.
- d. Trasferire **50 μl** da S1 a S2 e miscelare accuratamente.
- e. Trasferire **50 μl** da S2 a S3 e miscelare accuratamente.
- f. **Solo GD** funge da standard zero (S4).

PROCEDURA RACCOMANDATA PER STANDARD IN TRIPLICATO

- a. Etichettare 4 provette con "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Aggiungere **150 μl** di GD a S1.
- c. Aggiungere **210 μl** di GD a S2, S3, S4.
- d. Aggiungere **150 μl** dello standard del kit a S1 e miscelare accuratamente.
- e. Trasferire **70 μl** da S1 a S2 e miscelare accuratamente.
- f. Trasferire **70 μl** da S2 a S3 e miscelare accuratamente.
- g. **Solo GD** funge da standard zero (S4).

FIGURA 1: Preparazione della curva standard



- Preparare nuove diluizioni dello standard del kit per ciascuna sessione ELISA.
4. Ricostituire il coniugato concentrato 100x liofilizzato con 0,3 ml di acqua distillata o deionizzata. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e garantire la completa solubilizzazione del coniugato.

Il coniugato pronto per l'uso viene preparato diluendo il volume richiesto di coniugato concentrato 100X ricostituito con diluente verde (GD), come mostrato nella sottostante Tabella 1: Preparazione del coniugato.

TABELLA 1: Preparazione del coniugato

NUMERO DI STRISCE	VOLUME DI CONIUGATO CONCENTRATO 100X	VOLUME DI DILUENTE VERDE (GD)
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

- Miscelare accuratamente, ma con delicatezza per evitare la formazione di schiuma.
 - Riportare il coniugato concentrato 100X non utilizzato ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C subito dopo l'uso.
 - Utilizzare esclusivamente diluente verde (GD).
5. I campioni di plasma ottenuti dalle provette di prelievo e successivamente congelati o conservati per più di 24 ore prima del dosaggio, devono essere accuratamente miscelati prima di essere dispensati nel pozzetto ELISA.
- Se i campioni di plasma devono essere aggiunti direttamente dalle provette QFT centrifugate, non miscelare il plasma.

6. Aggiungere 50 µl di coniugato pronto per l'uso appena preparato nei relativi pozzetti ELISA con l'ausilio di una pipetta multicanale.
7. Aggiungere 50 µl dei campioni di plasma in esame nei relativi pozzetti con l'ausilio di una pipetta multicanale (per la configurazione raccomandata della piastra, consultare le figure 2A e 2B di seguito). Infine, aggiungere 50 µl in ciascuno degli Standard da 1 a 4.

FIGURA 2A: Configurazione raccomandata per le provette di controllo nullo e di antigeni TB (44 test per piastra)

FILA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	5N	9N	13N	17N	S1	S1	25N	29N	33N	37N	41N
B	1A	5A	9A	13A	17A	S2	S2	25A	29A	33A	37A	41A
C	2N	6N	10N	14N	18N	S3	S3	26N	30N	34N	38N	42N
D	2A	6A	10A	14A	18A	S4	S4	26A	31A	34A	38A	42A
E	3N	7N	11N	15N	19N	21N	23N	27N	32N	35N	39N	43N
F	3A	7A	11A	15A	19A	21A	23A	27A	32A	35A	39A	43A
G	4N	8N	12N	16N	20N	22N	24N	28N	33N	36N	40N	44N
H	4A	8A	12A	16A	20A	22A	24A	28A	33A	36A	40A	44A

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Campione 1. Plasma controllo nullo); 1A (Campione 1. Plasma antigene TB).

FIGURA 2B: Configurazione raccomandata per le provette di controllo nullo, antigeni TB e mitogeno (28 test per piastra)

FILA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	1A	1M	S1	S1	S1	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	S2	S2	S2	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	S3	S3	S3	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	S4	S4	S4	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4).
- 1N (Campione 1. Plasma controllo nullo); 1A (Campione 1. Plasma antigene TB); 1M (Campione 1. Plasma controllo mitogeno).

8. Miscelare accuratamente il coniugato e i campioni di plasma/gli standard utilizzando un agitatore per micropiastre per 1 minuto.
9. Coprire ogni piastra con un coperchio e incubare a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) per 120 ± 5 minuti.
 - Non esporre le piastre alla luce diretta durante l'incubazione.
10. Durante l'incubazione, diluire una parte di tampone di lavaggio concentrato 20X con 19 parti di acqua distillata o deionizzata e miscelare con cura. La quantità di tampone di lavaggio concentrato 20X fornita è sufficiente a preparare 2 litri di tampone di lavaggio pronto per l'uso.

Lavare i pozzetti con **400 µl** di tampone di lavaggio pronto per l'uso per almeno 6 cicli. Si consiglia di utilizzare un sistema di lavaggio per piastre automatizzato.

- Per garantire il funzionamento corretto del test è essenziale risciacquare completamente. Prima di ogni ciclo di lavaggio, verificare che ogni pozzetto sia **riempito completamente** di tampone di lavaggio fino al bordo. Si raccomanda un tempo di riposo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.

- Aggiungere un comune disinfettante da laboratorio al serbatoio di scarico e seguire le procedure previste per la decontaminazione del materiale potenzialmente infetto.
11. Dopo averle capovolte, percuotere le piastre su un panno assorbente per rimuovere i residui di tampone di lavaggio. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato enzimatico in ogni pozzetto e miscelare completamente utilizzando un agitatore per micropiastre.
 12. Coprire ogni piastra con un coperchio e incubare a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) per 30 minuti.
 - Non esporre le piastre alla luce diretta durante l'incubazione.
 13. Dopo 30 minuti di incubazione, aggiungere 50 µl di soluzione di arresto enzimatico in ciascun pozzetto e miscelare.
 - Aggiungere la soluzione di arresto enzimatico nei pozzetti nello stesso ordine e approssimativamente alla stessa velocità del substrato della fase 11.
 14. Misurare la densità ottica (OD) di ogni pozzetto entro 5 minuti dall'arresto della reazione con l'ausilio di un lettore per micropiastre, dotato di un filtro da 450 nm e di un filtro di riferimento da 620 nm a 650 nm. I valori OD sono utilizzati per calcolare i risultati.

7. CALCOLI E INTERPRETAZIONE DEL TEST

Cellestis ha sviluppato il software di analisi QFT per l'analisi dei dati grezzi e il calcolo dei risultati. (Verificare che sia in uso la versione più recente del software)

Il software effettua una verifica del controllo di qualità del test, genera una curva standard e fornisce un risultato per ogni soggetto sottoposto al test, come descritto nel dettaglio nell'Interpretazione della sezione Risultati.

Il metodo seguente rappresenta un'alternativa all'impiego del software di analisi QFT, per il calcolo dei risultati:

Generazione della curva standard

(qualora non si utilizzi il software di analisi QFT)

Determinare i valori medi OD dei replicati dello standard del kit su ciascuna piastra.

Costruire una curva standard $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ tracciando il $\log_{(e)}$ della media OD (asse y) rispetto al $\log_{(e)}$ della concentrazione di IFN- γ degli standard espressa in IU/ml (asse x), omettendo dai calcoli in questione lo standard zero. Calcolare la retta con il miglior fittaggio per la curva standard mediante l'analisi di regressione.

Utilizzare la curva standard per determinare la concentrazione di IFN- γ (IU/ml) di ciascuno dei campioni di plasma in esame, utilizzando il valore OD di ciascun campione.

Per questi calcoli si possono utilizzare i pacchetti software forniti con i lettori per micropiastre e i normali fogli di calcolo o software statistici (come ad esempio Microsoft Excel). Si consiglia l'uso di questi pacchetti per calcolare l'analisi di regressione, il coefficiente di variazione (CV%) degli standard, nonché il coefficiente di correlazione (r) della curva standard.

Controllo di qualità del test

L'accuratezza dei risultati analitici dipende dalla generazione di una curva standard accurata. Pertanto, i risultati ottenuti dagli standard devono essere esaminati prima di poter procedere all'interpretazione dei risultati dei campioni in esame.

Affinché il test ELISA sia valido, devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Il valore medio OD dello Standard 1 deve essere $\geq 0,600$.**
- **Il CV% dei valori OD replicati dello Standard 1 e Standard 2 deve essere $\leq 15\%$.**
- **I valori OD replicati dello Standard 3 e Standard 4 non devono discostarsi di più di 0,040 unità OD dalla relativa media.**
- **Il coefficiente di correlazione (r) calcolato sulla base dei valori medi di assorbanza degli standard deve essere $\geq 0,98$.**

Il software di analisi QFT calcola e riporta questi parametri del controllo di qualità.

Se i criteri summenzionati non vengono soddisfatti, la seduta analitica non è valida e deve essere ripetuta.

- **Il valore medio OD dello Standard zero (diluente verde, GD) deve essere $\leq 0,150$. Se il valore medio OD è $> 0,150$ occorrerà verificare la procedura di lavaggio delle piastre.**

Interpretazione dei risultati

I risultati del test QFT vanno interpretati sulla base dei seguenti criteri:

NOTA: La diagnosi, o l'esclusione della tubercolosi, nonché la valutazione della probabilità della LTBI, richiedono una combinazione di referti epidemiologici, anamnestici, medici e diagnostici di cui si deve tenere conto per l'interpretazione dei risultati del test QFT.

QUALORA VENGA UTILIZZATE SOLTANTO LE PROVETTE DI CONTROLLO NULO E ANTIGENE TB:

<u>Controllo nullo</u> [IU/ml]	<u>Antigene TB meno controllo nullo</u> [IU/ml]	Risultato QFT	Rapporto/Interpretazione
≤ 8,0	< 0,35	Negativo	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABILE
	≥ 0,35 e < 25% del valore del controllo nullo		
	≥ 0,35 e ≥ 25% del valore del controllo nullo	Positivo ¹	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> probabile
> 8,0 ²	Qualsiasi	Indeterminato ³	I risultati sono indeterminati per quanto attiene alla risposta all'antigene TB

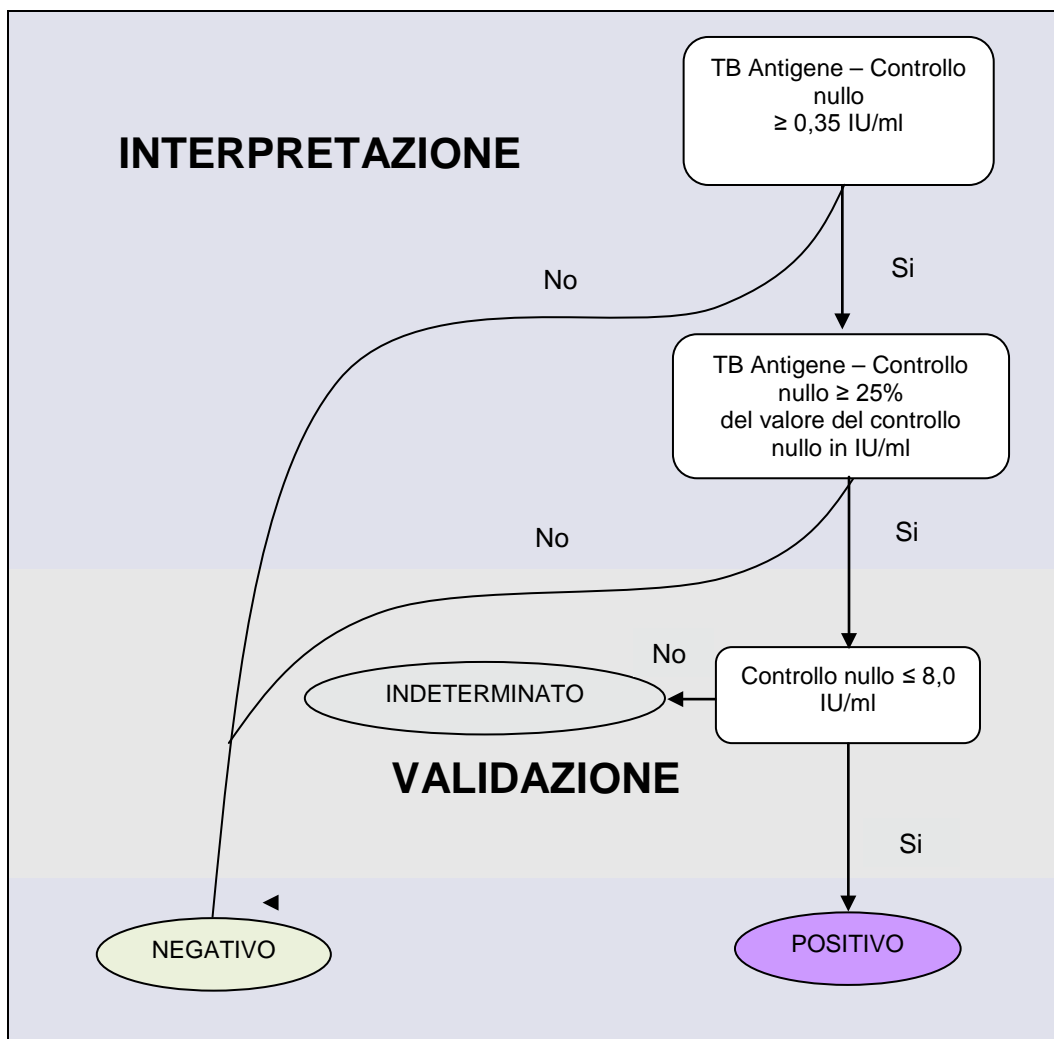
¹ Laddove non si sospetti un'infezione da *M. tuberculosis*, i risultati inizialmente positivi possono essere confermati rianalizzando in duplicato i campioni di plasma originali con il test ELISA QFT. Se alla ripetizione del test uno o entrambi i replicati risultano positivi, il soggetto in esame deve essere considerato positivo al test.

² Negli studi clinici, meno dello 0,25% dei soggetti ha presentato livelli di IFN- γ >8,0 IU/ml per il controllo nullo.

³ Per individuare le possibili cause consultare il capitolo Risoluzione dei problemi.

Il livello di concentrazione di IFN- γ misurato non è correlabile con lo stadio o il grado dell'infezione, il livello di risposta immunologica o la probabilità di progressione a malattia conclamata.

FIGURA 3: INTERPRETAZIONE DEL DIAGRAMMA DI FLUSSO CON L'UTILIZZO DI PROVETTE DI CONTROLLO NULLO E ANTIGENE TB



QUALORA VENGANO UTILIZZATE LE PROVETTE DI CONTROLLO NULLO, ANTIGENE TB E MITOGENO:

<u>Controllo</u> <u>nullo</u> [IU/ml]	<u>Antigene TB</u> <u>meno controllo</u> <u>nullo</u> [IU/ml]	<u>Mitogeno</u> <u>meno</u> <u>controllo nullo</u> [IU/ml] ¹	Risultato QFT	Rapporto/Interpretazione
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativo	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> IMPROBABILE
	≥ 0,35 e < 25% del valore del controllo nullo	≥ 0,5		
	≥ 0,35 e ≥ 25% del valore del controllo nullo	Qualsiasi	Positivo ²	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> probabile
	< 0,35	< 0,5	Indeterminato ³	I risultati sono indeterminati per quanto attiene alla risposta all'antigene TB
	≥ 0,35 e < 25% del valore del controllo nullo	< 0,5		
> 8,0 ⁴	Qualsiasi	Qualsiasi		

¹ Spesso le risposte al controllo positivo del mitogeno (e talvolta dell'antigene TB) risultano al di fuori del range del lettore per micropiastre. Tale fenomeno non ha alcuna ripercussione sui risultati del test.

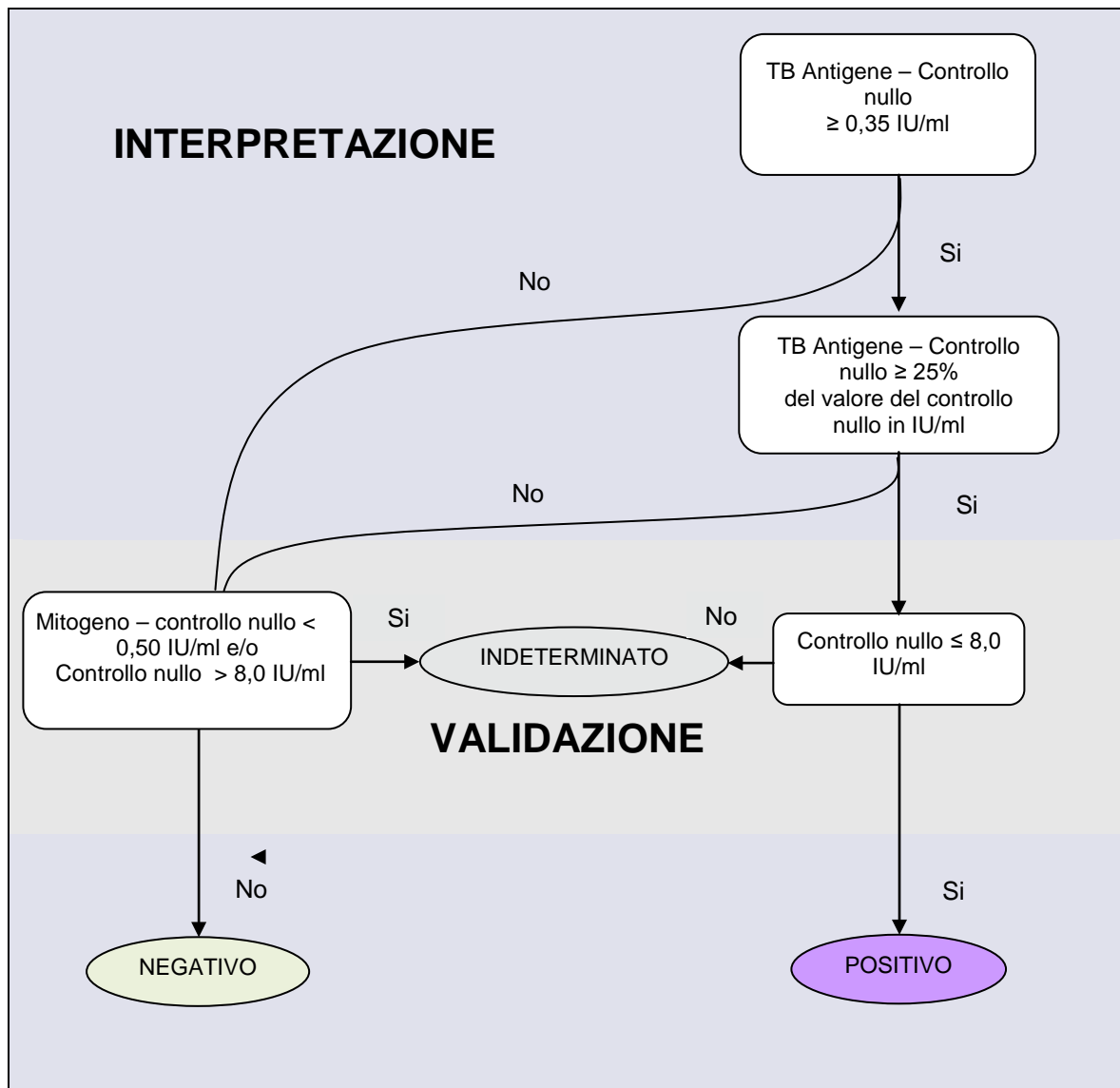
² Laddove non si sospetti un'infezione da *M. tuberculosis*, i risultati inizialmente positivi possono essere confermati rianalizzando in duplicato i campioni di plasma originali con il test ELISA QFT. Se alla ripetizione del test uno o entrambi i replicati risultano positivi, il soggetto in esame deve essere considerato positivo al test.

³ Per individuare le possibili cause consultare il capitolo Risoluzione dei problemi.

⁴ Negli studi clinici, meno dello 0,25% dei soggetti ha presentato livelli di IFN-γ >8,0 IU/ml per il controllo nullo.

Il livello di concentrazione di IFN-γ misurato non è correlabile con lo stadio o il grado dell'infezione, il livello di risposta immunologica o la probabilità di progressione a malattia conclamata.

FIGURA 4: INTERPRETAZIONE DEL DIAGRAMMA DI FLUSSO CON L'UTILIZZO DI PROVETTE DI CONTROLLO NULLO, ANTIGENE TB E MITOGENO



8. LIMITI DEL METODO

I risultati del test QFT devono essere valutati nell'ambito del quadro epidemiologico e clinico attuale di ciascun soggetto, tenendo conto anche di altre valutazioni diagnostiche.

I soggetti con valori nulli superiori a 8 IU/ml vengono classificati come "indeterminati" perché una risposta agli antigeni TB superiore al 25% può risultare al di fuori del range di misura del test.

Le cause di risultati inaffidabili o indeterminati possono essere:

- deviazioni dalla procedura descritta nel foglietto illustrativo;
- livelli eccessivi di IFN- γ in circolo o presenza di anticorpi eterofili;
- lasso di tempo superiore alle 16 ore decorso tra il prelievo del sangue e l'inizio dell'incubazione a 37°C.

9. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Studi clinici

Poiché non esiste uno standard definitivo per l'infezione tubercolare latente (LTBI), non è in pratica possibile valutare la sensibilità e la specificità di QFT. La specificità di QFT è stata calcolata in modo approssimato valutando i tassi di falsi positivi nei soggetti a basso rischio (nessun fattore di rischio noto) di infezione tubercolare. La sensibilità è stata calcolata in modo approssimato valutando gruppi di pazienti con malattia tubercolare attiva confermata da coltura.

Specificità

In uno studio condotto negli Stati Uniti su 866 volontari, sono stati eseguiti dei prelievi di sangue per l'analisi con QFT ogni qualvolta era richiesto un test cutaneo alla tubercolina (TST). I dati demografici e i fattori di rischio per la TB sono stati determinati utilizzando uno studio standard al momento dell'analisi. Sono stati ottenuti risultati relativi al test QFT e al test cutaneo alla tubercolina (TST) per 391 soggetti sui 432 volontari senza fattori di rischio noti di infezione da *M. tuberculosis*. Nessuno era stato vaccinato con BCG. Un secondo studio sulla specificità è stato eseguito con QFT su soggetti a basso rischio in Giappone, il 90% circa dei quali era stato sottoposto a vaccinazione con BCG. I risultati dei due studi sulla specificità sono illustrati nella tabella 2.

Tabella 2. Specificità di QFT: risultati di soggetti senza fattori di rischio riferiti di infezione da *M. tuberculosis*

STUDIO	Stato BCG (% vaccinati)	Totale analizzati	N. indeterminati al QFT	N. positivi al QFT / N. test validi	Specificità QFT (IC 95%)	N. positivi al TST / N. analizzati	Specificità TST* (IC 95%)
USA (inedito)	0%	391	1	3 / 390	99,2% (98-100)	6 / 391	98,5% (97-99)
Giappone ¹⁵	~90%	168	6	2 / 162	98,8% (95-100)	-	-
TOTALE	-	559	7/559 (1,3%)	5 / 552	99,1% (98-100)	-	-

*Utilizzando un valore di cut-off TST pari a 10 mm in soggetti non vaccinati con BCG. La stima sulla specificità del TST è del 99,1% utilizzando un valore di cut-off pari a 15 mm.

Sensibilità alla TB attiva

I soggetti con sospetta malattia tubercolare in USA, Australia e Giappone, per i quali è stata successivamente confermata l'infezione da *M. tuberculosis* mediante coltura, sono stati sottoposti ad analisi per valutare la sensibilità di QFT. Sebbene non esista un test standard definitivo per l'infezione tubercolare latente (LTBI), un surrogato adeguato è la coltura microbiologica di *M. tuberculosis*, dato che i pazienti affetti dalla malattia sono infetti per definizione. I pazienti sono stati sottoposti a meno di 8 giorni di trattamento prima del prelievo dei campioni di sangue per l'analisi con QFT.

La tabella 3 presenta un quadro sintetico dei risultati dei tre gruppi di pazienti risultati positivi alla coltura per *M. tuberculosis*. La sensibilità totale di QFT per la malattia tubercolare attiva è risultata pari all'89% (157/177).

Tabella 3. QFT: soggetti con infezione da *M. tuberculosis* confermata da coltura

STUDIO	N. positivi al QFT / N. test validi	Sensibilità QFT (IC 95%)
Pazienti TB in Giappone ¹⁵	86 / 92	93% (86-97%)
Australia	24 / 27	89% (70-97%)
USA	47 / 58	81% (68-90%)
TOTALE	157 / 177	89% (83-93%)

Diagnosi di LTBI

Sono stati pubblicati diversi studi sulle prestazioni di QFT in varie popolazioni a rischio di LTBI. I risultati principali di alcuni studi selezionati sono illustrati nella tabella 4.

Tabella 4. Studi pubblicati selezionati su QFT in popolazioni a rischio di LTBI

STUDIO	Totale analizzati	Risultati
Operatori sanitari indiani (Pai <i>et al</i> 2005) ²⁶	726	Ambiente con tassi molto elevati di TB. 40% di risultati positivi con QFT rispetto al 41% di risultati positivi con TST a 10 mm. Elevata concordanza con TST, nessun effetto della vaccinazione BCG per entrambi i test. Entrambi i test correlati ai fattori di rischio in base all'età e al periodo di lavoro in ambiente sanitario.
Danesi affetti da HIV (Brock <i>et al</i> 2006) ⁵	590	La prevalenza complessiva di LTBI con QFT è risultata del 4,6% (27/590) in soggetti HIV ⁺ . I risultati positivi erano associati al rischio di TB. Due soggetti risultati positivi al test QFT hanno sviluppato la malattia tubercolare attiva entro un anno. Le risposte indeterminate (n=20, 3,4%) erano associate ad una conta CD4 <100 / µl.
Bambini ospedalizzati (Dogra <i>et al</i> 2006) ¹²	105	I bambini con sospetta malattia tubercolare o che hanno avuto contatti con la TB sono stati sottoposti a test con QFT e TST. 10,5% di risultati positivi con QFT rispetto al 9,5% di risultati positivi con TST a 10 mm. L'indice di concordanza tra i due test era del 95,2% complessivamente e del 100% in soggetti non sottoposti a vaccinazione con BCG.
Contatto con casi indice in Germania (Diel <i>et al</i> 2006) ¹¹	309	Sono stati analizzati i soggetti a stretto contatto con 15 casi indice diversi. Il 51% era vaccinato con BCG, il 27% nato all'estero. Il 70% dei vaccinati BCG e il 18% dei non vaccinati sono risultati positivi al TST (5 mm), mentre il 9% e l'11% rispettivamente sono risultati positivi al test QFT. QFT era associato al rischio di TB, mentre il TST era unicamente associato al vaccino BCG.

Molte altre pubblicazioni descrivono le prestazioni della versione meno sensibile di QuantiFERON[®]-TB Gold ad antigene liquido (precursore di QFT) e del test QFT. Questi studi includono l'utilizzo dei test in casi di contatto con TB attiva^{9,11, 19, 25}, bambini^{6-10, 25, 28}, soggetti HIV positivi^{2, 5, 20}, operatori sanitari^{13, 26, 32}, immunosoppressi^{3, 4, 22, 23, 27, 30, 31}, soggetti con sospetta TB^{7, 8, 10, 18} e a basso rischio¹⁵.

Ripetibilità ed effetti del TST sui successivi test con QFT

Nell'ambito dello studio USA sulla specificità, un sottogruppo di volontari è stato sottoposto alla ripetizione del test 4-5 settimane dopo il primo test con QFT e TST. 260 soggetti sono stati sottoposti alla ripetizione del test QFT e il livello di concordanza è risultato pari al 99,6% (259/260). Il TST precedente non ha determinato risposte positive al test QFT.

10. INFORMAZIONI TECNICHE

Risultati indeterminati

I risultati indeterminati dovrebbero essere rari e potrebbero dipendere dallo stato di immunità del soggetto in esame nonché da una serie di fattori tecnici:

- lasso di tempo superiore alle 16 ore decorso tra il prelievo del sangue e l'inizio dell'incubazione a 37°C
- conservazione del sangue al di fuori del range di temperatura raccomandato (22°C ± 5°C)
- miscelazione insufficiente delle provette per il prelievo del sangue
- lavaggio incompleto della piastra ELISA

Se si sospettano problemi tecnici relativi al prelievo o alla manipolazione dei campioni di sangue, ripetere l'intera procedura del test QFT con un nuovo campione di sangue. È possibile ripetere il test ELISA del plasma stimolato se si sospetta un lavaggio inadeguato o altri scostamenti rispetto alla procedura prevista per il test ELISA. I risultati indeterminati dovuti a valori bassi di mitogeno o elevati nulli non dovrebbero cambiare alla ripetizione del test, salvo il caso in cui si sia verificato un errore con il test ELISA. I risultati indeterminati vanno riportati tali quali. Il medico potrà scegliere di prelevare un nuovo campione o di avvalersi eventualmente di altri metodi.

Campioni di plasma coagulato

Se nei campioni di plasma conservati per lunghi periodi si dovessero formare coaguli di fibrina, centrifugare i campioni per far sedimentare il materiale coagulato e facilitare il pipettaggio del plasma.

Risoluzione dei problemi del test ELISA

Sviluppo di colorazione aspecifica

CAUSA POSSIBILE	SOLUZIONE
Lavaggio incompleto della piastra	Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl/pozzetto di tampone di lavaggio. A seconda del dispositivo di lavaggio utilizzato, potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio. Va osservato un tempo di riposo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.
Contaminazione crociata dei pozzetti ELISA	Pipettare e miscelare con cura il campione per ridurre al minimo i rischi.
Kit o componenti scaduti	Assicurarsi che il kit venga utilizzato entro la data di scadenza. Accertarsi che lo standard e il coniugato concentrato 100X ricostituiti vengano utilizzati entro tre mesi dalla data di ricostituzione.
Contaminazione della soluzione di substrato enzimatico	Eliminare il substrato in caso di colorazione blu. Accertarsi che vengano utilizzati contenitori di reagenti puliti.
Miscelazione del plasma nelle provette da centrifuga prima del prelievo	Accertarsi che i campioni di plasma vengano prelevati con cura da sopra il gel, senza pipettare su e giù e prestando attenzione a non toccare il materiale sulla superficie del gel.

Valori di lettura di densità ottica bassi per gli standard

CAUSA POSSIBILE	SOLUZIONE
Errore nella diluizione dello standard	Assicurarsi che le diluizioni dello standard del kit siano preparate correttamente seguendo le istruzioni riportate nel foglietto illustrativo.
Errore nel pipettaggio	Assicurarsi di calibrare ed utilizzare le pipette secondo le istruzioni del produttore.
Temperatura di incubazione troppo bassa	L'incubazione del test ELISA deve essere effettuata a temperatura ambiente, tra 17°C e 27°C.
Tempo di incubazione troppo breve	L'incubazione della piastra con il coniugato, gli standard e i campioni deve durare 120 ± 5 minuti. La soluzione di substrato enzimatico viene incubata sulla piastra per 30 minuti.
Utilizzo del filtro sbagliato per il lettore delle piastre	La piastra deve essere letta a 450 nm con un filtro di riferimento da 620 a 650 nm.
Reagenti troppo freddi	Tutti i reagenti, ad eccezione del coniugato concentrato 100X, devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'inizio del test. Tale operazione richiede circa un'ora.
Kit o componenti scaduti	Assicurarsi che il kit venga utilizzato entro la data di scadenza. Accertarsi che lo standard e il coniugato concentrato 100X ricostituiti vengano utilizzati entro tre mesi dalla data di ricostituzione.

Background elevato

CAUSA POSSIBILE	SOLUZIONE
Lavaggio incompleto della piastra	Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl/pozzetto di tampone di lavaggio. A seconda del dispositivo di lavaggio utilizzato, potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio. Va osservato un tempo di riposo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.
Temperatura di incubazione troppo alta	L'incubazione del test ELISA deve essere effettuata a temperatura ambiente, tra 17°C e 27°C.
Kit o componenti scaduti	Assicurarsi che il kit venga utilizzato entro la data di scadenza. Assicurarsi che lo standard e il coniugato concentrato 100X ricostituiti vengano utilizzati entro tre mesi dalla data di ricostituzione.
Contaminazione della soluzione di substrato enzimatico	Eliminare il substrato in caso di colorazione blu. Accertarsi che vengano utilizzati contenitori di reagenti puliti.

Curva standard non lineare e variabilità dei duplicati

CAUSA POSSIBILE	SOLUZIONE
Lavaggio incompleto della piastra	Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl/pozzetto di tampone di lavaggio. A seconda del dispositivo di lavaggio utilizzato, potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio. Va osservato un tempo di riposo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.
Errore nella diluizione dello standard	Assicurarsi che le diluizioni dello standard siano preparate correttamente seguendo le istruzioni riportate nel foglietto illustrativo.
Miscelazione insufficiente	Miscelare completamente i reagenti capovolgendo i rispettivi flaconi o agitandoli al Vortex delicatamente prima di aggiungerli alla piastra.
Tecnica di pipettaggio irregolare o interruzione durante la preparazione del test	L'aggiunta del campione e dello standard deve essere effettuata senza interruzione. Tutti i reagenti vanno preparati prima dell'inizio del test.

Il CD-ROM con informazioni sul prodotto e una guida tecnica, che si può richiedere gratuitamente alla Cellestis o al distributore di fiducia, contiene il video della procedura del test e la soluzione alla maggior parte dei problemi tecnici.

11. BIBLIOGRAFIA

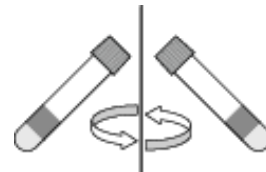
Per un elenco esaustivo dei riferimenti bibliografici di QFT consultare gnowee™ - la biblioteca di riferimento di QuantiFERON, disponibile su www.gnowee.net

1. **Andersen, P., et al.** Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000. 356; 1099-104.
2. **Balcells, M.E., et al.** A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int J Infect Dis.* 2008. 12; 645-52.
3. **Bartalesi, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2009. 33; 586-93.
4. **Bocchino, M., et al.** Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008. 27; 907-13.
5. **Brock, I., et al.** Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res.* 2006. 7; 56.
6. **Chun, J.K., et al.** The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008. 62; 389-94.
7. **Connell, T.G., et al.** A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* 2008. 3; e2624.
8. **Detjen, A.K., et al.** Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007. 45; 322-8.
9. **Diel, R., et al.** Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2009. 135; 1010-8.
10. **Diel, R., et al.** Predictive value of a whole-blood IFN- γ assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008. 177; 1164-70.
11. **Diel, R., et al.** Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006. 7; 77.
12. **Dogra, S., et al.** Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007. 54; 267-76.
13. **Drobniewski, F., et al.** Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* 2007. 4; e55.
14. **Gerogianni, I., et al.** Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology.* 2008. 13; 270-4.
15. **Harada, N., et al.** Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J Infect.* 2008. 56; 348-53.
16. **Higuchi, K., et al.** Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med Microbiol Immunol.* 2009. 198; 33-7.
17. **Kang, Y.A., et al.** Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA.* 2005. 293; 2756-61.
18. **Katiyar, S. K., et al.** Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 1146-52.
19. **Kipfer, B., et al.** Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly.* 2008. 138; 267-72.
20. **Luetkemeyer, A., et al.** Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007. 175; 737-42.
21. **Mackensen, F., et al.** QuantiFERON-TB Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008. 146; 761-6.
22. **Manuel, O., et al.** Comparison of QuantiFERON-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant.* 2007. 7; 2797-801.
23. **Matulis, G., et al.** Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann Rheum Dis.* 2007. 67; 84-90.
24. **Mirtskhulava, V., et al.** Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008. 12; 513-519.
25. **Nakaoka, H., et al.** Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis.* 2006. 12; 1383-8.
26. **Pai, M., et al.** Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. *JAMA.* 2005. 293; 2746-55.
27. **Ponce de Leon, D., et al.** Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol.* 2008. 35; 776-81.

13. PROCEDURA DEL TEST (IN SINTESI)

FASE 1 – INCUBAZIONE DEL SANGUE

1. Raccogliere il sangue del paziente nelle provette dedicate e miscelare dieci (10) volte agitando con decisione quanto basta ad assicurarsi che l'intera superficie interna della provetta sia ricoperta di sangue, in modo da sciogliere gli antigeni presenti sulle pareti della provetta.
2. Incubare le provette **in posizione verticale** a 37°C per 16-24 ore.
3. Dopo l'incubazione, centrifugare le provette per 15 minuti a 2000 – 3000 x g (RCF) per separare il plasma e i globuli rossi.
4. Dopo la centrifugazione, prelevare i campioni di plasma con la pipetta. Non pipettare su e giù né miscelare in altro modo il plasma prima del prelievo.



FASE 2 – IFN- γ ELISA

1. Equilibrare i componenti ELISA, ad eccezione del coniugato concentrato 100X, a temperatura ambiente per almeno 60 minuti.

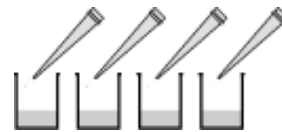


2. Ricostituire lo standard del kit a 8,0 IU/ml con acqua distillata o deionizzata. Preparare quattro (4) diluizioni standard.

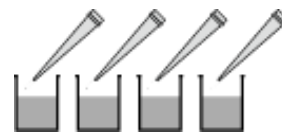


3. Ricostituire il coniugato concentrato 100X liofilizzato con acqua distillata o deionizzata.

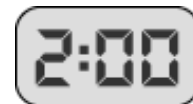
4. Preparare il coniugato pronto per l'uso con il diluente verde (GD) e aggiungere 50 μ l in tutti i pozzetti.



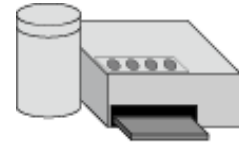
5. Aggiungere 50 μ l di campioni di plasma in esame e 50 μ l degli standard nei relativi pozzetti. Miscelare con un agitatore.



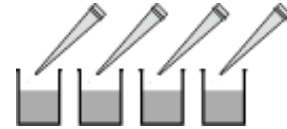
6. Incubare per 120 minuti a temperatura ambiente.



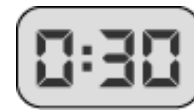
7. Lavare i pozzetti almeno 6 volte con 400 μ l/pozzetto di tampone di lavaggio.



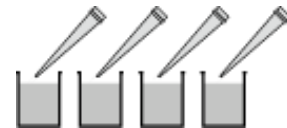
8. Aggiungere nei pozzetti 100 μ l di soluzione di substrato enzimatico. Miscelare con un agitatore.



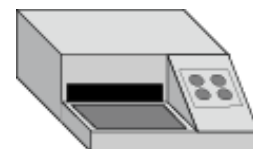
9. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.



10. Aggiungere in tutti i pozzetti 50 μ l di soluzione di arresto. Miscelare con un agitatore.



11. Leggere i risultati a 450 nm con un filtro di riferimento da 620 a 650 nm.



12. Analizzare i risultati.



14. MODIFICHE IMPORTANTI

Le importanti modifiche apportate alla presente versione (05990301G – Luglio 2011) del foglietto illustrativo QFT sono sintetizzate nella seguente tabella:

Capitolo	Pagina	Modifica (modifiche)
5. Prelievo e trattamento dei campioni	9	Modifica della procedura di miscelazione delle provette
6. Istruzioni per l'uso	11	Modifica delle procedure per il trattamento delle provette contenenti sangue
6. Istruzioni per l'uso	11	Modifica delle procedure per il trattamento dei campioni di plasma
10. Informazioni tecniche	23	Aggiunta: "Miscelazione del plasma nelle provette da centrifuga prima del prelievo"
12. Assistenza tecnica	26	Nuovo indirizzo email per l'assistenza tecnica



Prodotto per:
Cellestis Limited (Australia) e Cellestis GmbH (Europa)
Level 1, Office Tower 2, Chadstone Centre
1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia
Tel. (Australia) +61 3 8527 3500, (Europa) +49 6151 428 59-0
E-mail: quantiferon@cellestis.com
Website: www.cellestis.com

N. doc. 05990301G
Luglio 2011



EC	REP
----	-----

Mandatario:
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germania