

# Foglio illustrativo QuantiFERON<sup>®</sup>-TB

## Gold (QFT<sup>®</sup>) ELISA



2 x 96 (n° di catalogo 0594-0201)



20 x 96 (n° di catalogo 0594-0501)

Test dell'IFN- $\gamma$  sul sangue intero per la misurazione delle risposte agli antigeni peptidici ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4)



Per uso diagnostico in vitro



0594-0201, 0594-0501

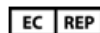


Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148 Australia

Tel.: (Australia) +613-9840-9800



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden, GERMANIA

1075115IT Rev. 01



[www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com)





# Indice generale

<b>1. Uso previsto</b>	<b>4</b>
<b>2. Riassunto e spiegazione del test</b>	<b>4</b>
Principi del test	5
Tempo necessario per l'esecuzione del test	5
<b>3. Componenti e conservazione</b>	<b>6</b>
Materiale necessario ma non fornito	7
Conservazione e manipolazione	7
<b>4. Avvertenze e precauzioni</b>	<b>8</b>
Per uso diagnostico in vitro	8
Avvertenze	8
Precauzioni	9
<b>5. Prelievo e manipolazione dei campioni</b>	<b>10</b>
<b>6. Istruzioni per l'uso</b>	<b>12</b>
Fase 1 - Incubazione del sangue e raccolta del plasma	12
Fase 2 - Saggio ELISA per IFN- $\gamma$ umano	13
<b>7. Calcoli e interpretazione del test</b>	<b>17</b>
Generazione della curva standard	17
Controllo della qualità del test	17
<b>8. Limitazioni</b>	<b>19</b>
<b>9. Caratteristiche prestazionali</b>	<b>20</b>
Studi clinici	20
<b>10. Informazioni tecniche</b>	<b>22</b>
Risultati indeterminati	22
Coaguli nei campioni di plasma	22
Guida alla risoluzione dei problemi	23
<b>11. Bibliografia</b>	<b>25</b>
<b>12. Assistenza tecnica</b>	<b>27</b>
<b>13. Procedura sintetica del test</b>	<b>28</b>
Fase 1 - Incubazione del sangue	28
Fase 2 - Test ELISA per IFN- $\gamma$	28
Modifiche rilevanti	30

# 1. Uso previsto

QuantiferON-TB Gold (QFT®) è un test diagnostico in vitro che utilizza un cocktail peptidico per simulare le proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4) e stimolare le cellule del sangue intero eparinizzato. La rilevazione dell'interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mediante ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, test immuno-assorbente legato agli enzimi) consente di identificare le risposte in vitro agli antigeni peptidici associati all'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT è un test indiretto per la rilevazione dell'infezione da *M. tuberculosis* (patologia compresa) ed è destinato all'uso congiuntamente ad altri strumenti (valutazione del rischio, radiografie e altre indagini medico-diagnostiche).

# 2. Riassunto e spiegazione del test

La tubercolosi è una malattia infettiva contagiosa causata dagli organismi del complesso *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) la cui trasmissione ai nuovi ospiti avviene generalmente per inalazione da nuclei di goccioline di pazienti infetti. Un soggetto contagiato può ammalarsi settimane o mesi dopo aver contratto l'infezione, anche se la maggior parte dei soggetti contagiati non manifesta alcuna sintomatologia. L'infezione tubercolare latente (ITBL) è una patologia asintomatica non trasmissibile che in alcuni soggetti può persistere anche per mesi o anni prima che la malattia diventi conclamata. La diagnosi della ITBL ha come scopo principale la valutazione di una terapia medica idonea, atta a prevenire la malattia. Fino a poco tempo fa l'unico metodo esistente per diagnosticare la ITBL era il test cutaneo tubercolinico (TST). La sensibilità cutanea alla tubercolina si sviluppa quando sono trascorse da 2 a 10 settimane dall'infezione. Tuttavia alcuni soggetti contagiati non manifestano reazioni alla tubercolina (tra questi, sia soggetti affetti da una serie di patologie che compromettono le funzioni immunitarie, sia altri soggetti non affetti da queste patologie). Viceversa alcuni soggetti con scarse probabilità di aver contratto un'infezione da *M. tuberculosis* sono sensibili alla tubercolina e risultano positivi al test TST dopo una vaccinazione antitubercolare con bacillo di Calmette-Guérin (BCG), in seguito ad un'infezione da micobatteri diversi dal complesso *M. tuberculosis* o per altri fattori imprecisati.

È necessario distinguere tra tubercolosi latente e tubercolosi conclamata, una patologia con interessamento dei polmoni e delle basse vie respiratorie che può però interessare anche altri sistemi di organi. La diagnosi della tubercolosi in atto si basa su riscontri anamnestici, fisici, radiologici, istologici e micobatteriologici.

Il test QFT rileva le risposte immuni cellulo-mediate (CMI) agli antigeni peptidici che simulano le proteine micobatteriche. Queste 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, fatta eccezione per *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*.<sup>(1)</sup> Il sangue dei soggetti infettati da organismi del complesso *M. tuberculosis* contiene in genere linfociti che sono in grado di riconoscere questi e altri antigeni micobatterici. Il processo di riconoscimento comporta la generazione e la secrezione della citochina, IFN- $\gamma$ . La rilevazione e la successiva quantificazione dell'IFN- $\gamma$  costituiscono il principio di questo 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 questi antigeni peptidici stimolano la risposta all'IFN- $\gamma$  nelle cellule T dei soggetti contagiati da *M. tuberculosis* ma non in quelle di soggetti non infetti o vaccinati con BCG in assenza della malattia o del rischio di ITBL.<sup>(1-32)</sup> Vi sono tuttavia terapie mediche e malattie con effetto immunosoppressivo che potenzialmente possono ridurre le risposte all'IFN- $\gamma$ . Anche pazienti con altre infezioni micobatteriche potrebbero avere una reazione alle proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4), dal momento che i geni che codificano queste proteine

sono presenti nei micobatteri *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum*.(1, 23) Il test QFT è sia un test per l'ITBL, sia uno strumento utile per la diagnosi dell'infezione da complesso *M. tuberculosis* in pazienti malati. Un risultato positivo corrobora il sospetto di tubercolosi, tuttavia anche infezioni causate da altri micobatteri (ad esempio *M. kansasii*) possono generare risultati positivi. Sono dunque necessari ulteriori accertamenti medici e diagnostici per confermare o escludere una diagnosi di tubercolosi.

## Principi del test

Il sistema QFT prevede l'uso di speciali provette per il prelievo del sangue intero. Il sangue viene lasciato incubare all'interno delle provette tra 16 e 24 ore, dopodiché viene raccolto il plasma e viene eseguito il test per rilevare la presenza dell'IFN- $\gamma$  prodotto in risposta agli antigeni peptidici.

Il test QFT prevede due fasi. Nella prima fase il sangue intero viene raccolto in ciascuna delle provette per il prelievo ematico QFT, che comprendono una provetta per controllo nullo (Nil), una provetta con antigene TB e una provetta con mitogeno.

La provetta con mitogeno può essere utilizzata con il test QFT come controllo positivo. Tale controllo potrebbe essere richiesto soprattutto nei casi in cui sussistano dubbi circa lo stato immunitario del soggetto. La provetta con mitogeno può anche servire a controllare che la manipolazione e l'incubazione del sangue siano avvenute correttamente.

È opportuno incubare le provette a 37°C il prima possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo. Dopo un periodo di incubazione compreso tra 16 e 24 ore, le provette vengono centrifugate, il plasma viene rimosso e la quantità di IFN- $\gamma$  (UI/ml) viene misurata con il dosaggio ELISA.

Un test è considerato positivo se la risposta IFN- $\gamma$  alla provetta con antigene TB è significativamente al di sopra del valore previsto per l'IFN- $\gamma$  (UI/ml) del controllo nullo. Se utilizzato, il campione di plasma della provetta con mitogeno funge da controllo positivo all'IFN- $\gamma$  per ogni campione analizzato. Una bassa risposta al mitogeno (<0,5 UI/ml) è indicativa di un risultato indeterminato se il campione di sangue ha anche generato una risposta negativa agli antigeni TB. Tale quadro potrebbe verificarsi in caso di linfociti insufficienti, ridotta attività dei linfociti per manipolazione impropria del campione, errata procedura di riempimento/miscelazione della provetta con mitogeno o incapacità dei linfociti del paziente di generare l'IFN- $\gamma$ . Il campione nullo compensa il livello di fondo, gli effetti di anticorpi eterofili o l'IFN- $\gamma$  non specifico nei campioni di sangue. Il livello di IFN- $\gamma$  della provetta nulla viene sottratto dal livello di IFN- $\gamma$  delle provette con antigene TB e con mitogeno (se usata).

## Tempo necessario per l'esecuzione del test

Il tempo necessario per effettuare il test QFT è indicato di seguito, così come il tempo necessario per eseguire l'analisi di più campioni in batch.

Incubazione a 37°C delle provette di sangue: da 16 a 24 ore

ELISA: circa 3 ore per una piastra ELISA

(da 28 a 44 soggetti)

<1 ora di lavoro

Aggiungere da 10 a 15 minuti per ogni piastra in più

### 3. Componenti e conservazione

<b>Blood Collection Tubes (Provette per prelievo ematico)*</b>	<b>300 provette</b>	<b>200 provette</b>	<b>100 provette</b>
<b>N° di catalogo</b>	<b>T0590-0301</b>	<b>0590-0201</b>	<b>T0593-0201</b>
<b>Numero di preparazioni</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
QuantiFERON Nil Tube (provetta nulla: tappo grigio, anello bianco)	100 provette	100 provette	
QuantiFERON TB Antigen Tube (provetta con antigene: tappo rosso, anello bianco)	100 provette	100 provette	
QuantiFERON Mitogen (provetta con mitogeno: tappo viola, anello bianco)	100 provette		100 provette
Foglietto illustrativo per provette per prelievo ematico QFT	1	1	1
<b>High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (provette per prelievo ematico in altitudini da utilizzare tra 1020 e 1875 metri)*</b>	<b>300 provette</b>	<b>100 provette</b>	<b>100 provette</b>
<b>N° di catalogo</b>	<b>T0590-0505</b>	<b>0590-0501</b>	<b>T0593-0501</b>
QuantiFERON HA Nil Tube (provetta nulla: tappo grigio, anello giallo)	100 provette	100 provette	
QuantiFERON HA TB Antigen Tube (provetta con antigene: tappo rosso, anello giallo)	100 provette	100 provette	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (provetta con mitogeno: tappo viola, anello giallo)	100 provette		100 provette
Foglietto illustrativo per provette per prelievo ematico QFT	1	1	1

\* Non tutte le configurazioni del prodotto sono disponibili in tutti i Paesi. Per ulteriori informazioni su quali configurazioni è possibile ordinare, rivolgersi ad un rappresentante locale del Servizio Clienti QIAGEN (vedere [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

<b>Componenti ELISA</b>	<b>Kit ELISA per 2 piastre</b>	<b>Pacchetto laboratorio di riferimento</b>
<b>N° di catalogo</b>	<b>0594-0201</b>	<b>0594-0501</b>
Microplate Strips (strisce per micropiastre) da 12 x 8 pozzetti. Rivestite con anticorpo monoclonale murino anti-IFN- $\gamma$ umano	2 set di strisce per micropiastre da 12 x 8 pozzetti	20 set di strisce per micropiastre da 12 x 8 pozzetti
Human IFN- $\gamma$ Standard, lyophilized (Standard IFN- $\gamma$ umano, liofilizzato) (contiene IFN- $\gamma$ umano ricombinante, caseina bovina, Thimerosal 0,01% p/v)	1 x fiala (8 UI/ml dopo la ricostituzione)	10 x fiale (8 UI/ml dopo la ricostituzione)
Green Diluent (Diluente verde) (contiene caseina bovina, siero murino normale, Thimerosal 0,01% p/v)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (Coniugato concentrato 100X, liofilizzato) (contiene anticorpi anti-IFN- $\gamma$ umano coniugati con perossidasi di rafano (HRP) e Thimerosal 0,01% p/v)	1 x 0,3 ml (dopo la ricostituzione)	10 x 0,3 ml (dopo la ricostituzione)
Wash Buffer 20X Concentrate (tampone di lavaggio concentrato 20X). Con pH 7,2 contiene ProClin® 300 0,05% v/v	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Soluzione di substrato enzimatico) (contiene H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Soluzione di arresto enzimatico) (contiene 0,5M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )†	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Foglietto illustrativo QFT ELISA	1	1

† Contiene acido solforico. Per ulteriori precauzioni, vedere pagina 9.

## Materiale necessario ma non fornito

- Incubatore a 37°C. CO<sub>2</sub> non richiesta.
- Pipette calibrate a volume variabile per l'erogazione di 10-1000  $\mu$ l con puntali monouso
- Pipetta calibrata multicanale per l'erogazione di 50-100  $\mu$ l con puntali monouso
- Agitatore per micropiastre
- Acqua deionizzata o distillata, 2 litri
- Sistema di lavaggio per micropiastre (si consigliano dispositivi di lavaggio automatici)
- Lettore per micropiastre dotato di filtro da 450 nm e di filtro di riferimento da 620-650 nm

## Conservazione e manipolazione

### Provette per prelievo ematico

- Conservare le provette per prelievo ematico a una temperatura compresa tra 4°C e 25°C.

## Reagenti del kit

- Conservare i reagenti del kit a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.
- Tenere sempre la soluzione di substrato enzimatico lontano dalla luce diretta.

## Reagenti ricostituiti e inutilizzati

Per istruzioni sulla modalità di ricostituzione dei reagenti, consultare la sezione 6 (pagina 13)

- Se conservato a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C, lo standard ricostituito del kit si mantiene fino a 3 mesi.  
Prendere nota della data in cui è stato ricostituito lo standard del kit.
- Dopo la ricostituzione, il coniugato concentrato 100X inutilizzato deve essere conservato in frigorifero a una temperatura 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 fino a 2 settimane.

## 4. Avvertenze e precauzioni

### Per uso diagnostico in vitro

#### Avvertenze

- Un risultato negativo al test QFT non esclude la possibilità di un'infezione da *M. tuberculosis* o di una malattia in atto. Infatti risultati falsi negativi possono essere dovuti allo stadio dell'infezione (ad esempio il campione è stato prelevato prima dello sviluppo della risposta immuno-cellulare), all'esistenza di patologie concomitanti che alterano le funzioni immunitarie, ad una manipolazione impropria delle provette dopo il prelievo di sangue per venopuntura, ad errori nell'esecuzione del test o ad altre variabili immunologiche.
- Un risultato positivo al test QFT non può di per sé confermare in modo definitivo la diagnosi di infezione da *M. tuberculosis*. Eventuali errori nell'esecuzione del test possono determinare risposte false-positive.
- In seguito ad un risultato positivo al test QFT sono necessari ulteriori accertamenti medico-diagnostici per confermare la presenza di tubercolosi attiva (ad esempio, striscio e coltura di AFB, raggi X toracici).
- Anche se le proteine ESAT-6, CFP-10 e TB7.7(p4) sono assenti in tutti i ceppi BCG e nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari conosciuti, è possibile che un risultato positivo al test QFT sia causato da un'infezione da *M. kansasii*, *M. szulgai* o *M. marinum*. Se si sospettano infezioni di questo tipo, è necessario eseguire test alternativi.



## Precauzioni

Solo per uso diagnostico in vitro.

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS). Le schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.



**ATTENZIONE: manipolare il sangue umano come se fosse potenzialmente infettivo.**

Attenersi alle relative linee guida sulla manipolazione del sangue.

Le seguenti frasi relative ai rischi e alla sicurezza si applicano ai componenti del saggio QuantiFERON-TB Gold ELISA.

### QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (soluzione di arresto enzimatico QuantiFERON)



Xi

Contiene acido solforico: irritante. Frasi di rischio e di sicurezza:\* R36/38, S26-36/37/39

- Il **diluente verde** contiene siero normale di topo e caseina, che possono provocare reazioni allergiche; evitare il contatto con la pelle.

#### Per emergenza chimica

#### Fuoriuscita, perdita, esposizione o incidente

Chiamare CHEMTREC giorno e notte

Negli USA e in Canada: 1-800-424-9300

Al di fuori di USA e Canada: +1-703-527-3887 (chiamate a carico accettate)

#### Ulteriori informazioni

Schede tecniche di sicurezza: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

- La mancata osservanza delle istruzioni presenti nel *Foglietto illustrativo QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA* può determinare risultati erranei. Prima dell'uso, leggere attentamente le istruzioni.
- Se un flacone di reagente è danneggiato o perde prima dell'uso, non utilizzare il kit.
- Non miscelare o utilizzare strisce per micropiastre, standard IFN- $\gamma$  umani, diluenti verdi o coniugati concentrati 100X appartenenti ad altri lotti di kit QFT. Per gli altri reagenti (tampone di lavaggio concentrato 20X, soluzione di arresto enzimatico e soluzione di arresto enzimatico) è possibile effettuare uno scambio con altri kit a condizione che la data di scadenza non sia trascorsa e solo dopo aver annotato i dettagli relativi al lotto. Smaltire i reagenti non utilizzati e i campioni biologici nel rispetto delle normative locali, statali e federali.

\* R36/38: irritante per gli occhi e la pelle. S26: in caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico; S36/37/39: usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

- Non utilizzare le provette per prelievo ematico QFT o il kit ELISA oltre la data di scadenza.
- Assicurarsi che le attrezzature del laboratorio (ad esempio i sistemi di lavaggio e lettura delle piastre) siano calibrati e approvati per l'uso.

## 5. Prelievo e manipolazione dei campioni

Il test QFT comporta l'uso delle provette di raccolta seguenti:

1. Provette QuantiFERON Nil (nulle; tappo grigio e anello bianco; usare tra livello del mare e 810 m di altitudine)
2. Provette TB Antigen (con antigene; tappo rosso e anello bianco; usare tra livello del mare e 810 m di altitudine)
3. Provette QuantiFERON Mitogen (con mitogeno; tappo viola e anello bianco; usare tra livello del mare e 810 m di altitudine)

Provette High Altitude (HA):

4. Provette QuantiFERON HA Nil (nulle; tappo grigio e anello giallo; usare tra 1020 m e 1875 m di altitudine)
5. Provette HA TB Antigen (con antigene; tappo rosso e anello giallo; usare tra 1020 m e 1875 m di altitudine)
6. Provette QuantiFERON HA Mitogen (con mitogeno; tappo viola e anello giallo; usare tra 1020 m e 1875 m di altitudine)

Gli antigeni aderiscono alle pareti interne delle provette per il prelievo ematico, pertanto è fondamentale miscelare con cura il contenuto delle provette con il sangue. Le provette devono essere trasferite in un incubatore a 37°C il prima possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo.

**Per ottenere risultati ottimali è opportuno attenersi alle seguenti procedure.**

1. **Per ciascun paziente prelevare 1 ml di sangue per venopuntura direttamente in ognuna delle provette per il prelievo ematico QFT. Questa procedura deve essere eseguita da personale qualificato e addetto al prelievo di sangue per analisi.**
  - Utilizzare le provette standard QFT per il prelievo ematico fino ad un'altitudine di 810 metri. Utilizzare le provette High Altitude (HA) per il prelievo ematico in altitudine, ovvero tra 1020 e 1875 metri.
  - Per il prelievo ematico QFT ad altitudini diverse da quelle specificate oppure se il volume del sangue prelevato è scarso, è possibile eseguire il prelievo con una siringa e trasferire immediatamente 1 ml di sangue in ciascuna delle tre provette. Per motivi di sicurezza, eseguire la procedura togliendo l'ago dalla siringa, osservando le procedure di sicurezza opportune, togliendo i tappi dalle 3 provette QFT e aggiungendo 1 ml di sangue in ognuna (fino alla tacca nera sul lato dell'etichetta della provetta). Tappare saldamente le provette e miscelare seguendo le istruzioni riportate di seguito.

- Dato che nelle provette da 1 ml il sangue fluisce in modo relativamente lento, mantenere la provetta sull'ago per 2-3 secondi quando sembra completamente piena per assicurarsi che il volume prelevato sia corretto.

La tacca nera sul lato delle provette indica il volume di riempimento di 1 ml. Le provette per prelievo ematico QFT sono state approvate per volumi compresi tra 0,8 e 1,2 ml. Se il livello di sangue in una delle provette non raggiunge la linea indicata, si consiglia di prelevare un altro campione di sangue.

- Se per il prelievo del sangue viene impiegato un ago a farfalla, prima delle provette per prelievo ematico QFT è opportuno utilizzare una provetta "vuota" per verificare che il tubicino si sia riempito di sangue.
- In alternativa è possibile prelevare il sangue in un'unica provetta generica contenente eparina di litio come anticoagulante e quindi trasferire il campione nelle provette QFT. **Utilizzare esclusivamente eparina di litio** come anticoagulante, poiché altri tipi di anticoagulanti interferiscono con il saggio. Riempire una provetta per prelievo ematico (volume minimo 5 ml) e miscelare delicatamente il contenuto capovolgendo la provetta svariate volte in modo che l'eparina si dissolva. Il sangue deve essere conservato a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) prima di essere trasferito nelle provette QFT per la fase di incubazione, che **deve** iniziare entro 16 ore dal prelievo.

## 2. Subito dopo aver riempito le provette, scuoterle in modo deciso per dieci (10) volte per assicurare che l'intera superficie interna della provetta sia ricoperta di sangue e che gli antigeni sulle pareti si dissolvano.

- Le provette devono essere ad una temperatura di  $17-25^{\circ}\text{C}$  quando vengono riempite di sangue.
- Non agitare in modo troppo energico per evitare la disgregazione del gel e il conseguente rischio di generare risultati aberranti.
- Se il sangue è stato raccolto in una provetta contenente eparina, è necessario miscelare in modo omogeneo i campioni prima di aliquotarli nelle provette QFT. Assicurarsi che il sangue sia miscelato in modo omogeneo capovolgendo la provetta delicatamente **appena prima di iniziare l'aliquotazione**. Aggiungere 1,0 ml di campione (un'aliquota per ogni provetta QFT) nelle corrispondenti provette contrassegnate con le etichette Nil, TB Antigen e Mitogen. La procedura deve essere eseguita in condizioni asettiche, **osservando le procedure di sicurezza opportune**, rimuovendo i tappi dalle tre provette QFT e aggiungendo 1 ml di sangue in ognuna (fino alla tacca nera sul lato dell'etichetta della provetta). Tappare saldamente le provette e miscelare seguendo le istruzioni riportate in precedenza.

## 3. Etichettare correttamente le provette.

- Assicurarsi che ogni provetta (Nil, TB Antigen, Mitogen) sia identificabile attraverso l'etichetta o altri indizi quando il tappo viene rimosso.

## 4. Dopo aver riempito, agitato ed etichettato le provette, trasferirle in un incubatore a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ il prima possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo del sangue. Prima dell'incubazione, le provette devono essere lasciate a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Non refrigerare né congelare i campioni di sangue.

## 6. Istruzioni per l'uso

### Fase 1 - Incubazione del sangue e raccolta del plasma

#### Materiale fornito

- Provette per prelievo ematico QFT (vedere la sezione 3).

#### Materiale necessario ma non fornito

- Vedere la sezione 3.

#### Procedura

1. **Se il sangue non viene messo in incubazione subito dopo il prelievo, è necessario miscelare nuovamente le provette capovolgendole per 10 volte appena prima di metterle nell'incubatore.**
2. **Incubare le provette IN POSIZIONE VERTICALE a 37°C ± 1°C per 16-24 ore. L'incubatore non richiede né CO<sub>2</sub> né umidificazione.**
3. **Dopo l'incubazione a 37°C, le provette per il prelievo ematico possono essere conservate a una temperatura compresa tra 4°C e 27°C per un massimo di 3 giorni prima della centrifugazione.**
4. **Dopo l'incubazione a 37°C, la raccolta del plasma è più semplice centrifugando le provette per 15 minuti a 2000-3000 RCF (g). Il tampone in gel consente di separare le cellule dal plasma. Se non dovesse accadere, è necessario centrifugare di nuovo le provette ad una velocità più elevata.**
  - È possibile raccogliere il plasma senza centrifugazione, ma occorre prestare maggior attenzione durante la rimozione del plasma senza alterare le cellule.
5. **I campioni di plasma dovrebbero essere raccolti soltanto con una pipetta.**
  - **Dopo la centrifugazione, evitare di pipettare in alto o in basso o di miscelare il plasma in qualsiasi modo prima di effettuare la raccolta. Fare sempre attenzione a non alterare il materiale presente sulla superficie del gel.**
  - I campioni di plasma possono essere caricati direttamente dalle provette per il prelievo ematico centrifugate sulla piastra QFT ELISA, anche quando si utilizzano stazioni di lavoro ELISA automatizzate.
  - I campioni di plasma possono essere conservati per un massimo di 28 giorni tra 2°C e 8°C o, dopo la raccolta, a una temperatura inferiore a -20°C per periodi prolungati.
  - Per ottenere campioni di analisi sufficienti, raccogliere almeno 150 µl di plasma.

## Fase 2 - Saggio ELISA per IFN- $\gamma$ umano

### Materiale fornito

- Kit QFT ELISA (vedere la sezione 3).

### Materiale necessario ma non fornito

- Vedere la sezione 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. Calcolare almeno 60 minuti per equilibrare.**
2. **Togliere le strisce non necessarie dal supporto, risigillare il sacchetto di alluminio e conservare di nuovo in frigorifero fino all'occorrenza.**

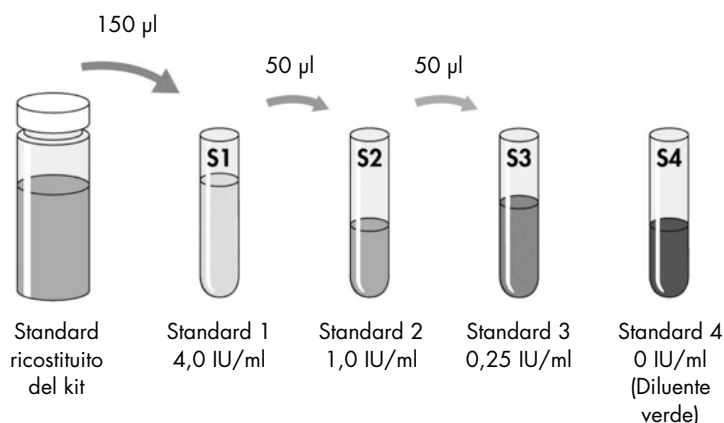
Calcolare almeno 1 striscia per gli standard QFT e altre strisce sufficienti in base al numero di campioni da analizzare (per i formati con 3 e con 2 provette, fare riferimento rispettivamente alla Figura 2A e alla Figura 2B). Dopo l'uso, conservare il supporto e il coperchio in modo da utilizzarli con le strisce rimanenti.

3. **Ricostituire lo standard liofilizzato del kit con il volume di acqua deionizzata o distillata indicato sull'etichetta del flacone dello standard. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e assicurare la completa solubilizzazione. Ricostituendo lo standard al volume indicato si otterrà una soluzione con una concentrazione pari a 8,0 UI/ml.**

**Nota:** il volume per la ricostituzione dello standard del kit varia in base al lotto.

Utilizzare lo standard ricostituito del kit per ottenere una serie di diluizioni 1:4 dell'IFN- $\gamma$  in diluente verde (Green Diluent, GD) (vedere la Figura 1). Lo Standard 1 (S1) contiene 4 UI/ml, lo Standard 2 (S2) contiene 1 UI/ml, lo Standard 3 (S3) contiene 0,25 UI/ml e lo Standard 4 (S4) contiene 0 UI/ml (solo GD). Gli standard dovrebbero essere analizzati almeno in duplicato.

Procedura consigliata per gli standard in duplicato	Procedura consigliata per gli standard in triplicato
a. Etichettare 4 provette "S1", "S2", "S3", "S4".	a. Etichettare 4 provette "S1", "S2", "S3", "S4".
b. Aggiungere <b>150 <math>\mu\text{l}</math></b> di GD a S1, S2, S3, S4.	b. Aggiungere <b>150 <math>\mu\text{l}</math></b> di GD a S1.
c. Aggiungere <b>150 <math>\mu\text{l}</math></b> di standard del kit a S1 e miscelare con cura.	b. Aggiungere <b>210 <math>\mu\text{l}</math></b> di GD a S2, S3, S4.
d. Trasferire <b>50 <math>\mu\text{l}</math></b> da S1 a S2 e miscelare con cura.	d. Aggiungere <b>150 <math>\mu\text{l}</math></b> di standard del kit a S1 e miscelare con cura.
e. Trasferire <b>50 <math>\mu\text{l}</math></b> da S2 a S3 e miscelare con cura.	e. Trasferire <b>70 <math>\mu\text{l}</math></b> da S1 a S2 e miscelare con cura.
f. <b>Solo GD</b> funge da standard zero (S4).	f. Trasferire <b>70 <math>\mu\text{l}</math></b> da S2 a S3 e miscelare con cura.
	g. <b>Solo GD</b> funge da standard zero (S4).



**Figura 1. Preparazione della curva standard.** Preparare nuove diluizioni dello standard del kit per ogni sessione ELISA.

**4. Ricostituire il coniugato concentrato 100X liofilizzato con 0,3 ml di acqua deionizzata o distillata. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e assicurare la completa solubilizzazione del coniugato**

Il coniugato pronto per l'uso viene preparato diluendo la quantità necessaria di coniugato concentrato 100X ricostituito nel diluente verde, come indicato nella Tabella 1 Preparazione del coniugato.

**Tabella 1. Preparazione del coniugato**

Numero di strisce	Volume del coniugato concentrato 100X	Volume del diluente verde
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

- Per evitare la formazione di schiuma, mescolare con cura e delicatezza.
- Riportare il coniugato concentrato 100X non utilizzato a una temperatura compresa tra 2°C e 8°C subito dopo l'uso.
- Utilizzare esclusivamente diluente verde.

5. Nel caso di campioni di plasma raccolti dalle provette per prelievo ematico e successivamente congelati o conservati per più di 24 ore prima dell'analisi, è necessaria una miscelazione accurata prima dell'aggiunta al pozzetto ELISA.
  - Se i campioni di plasma devono essere aggiunti direttamente dalle provette QFT centrifugate, la miscelazione del plasma deve essere evitata.
6. Nei pozzetti ELISA opportuni aggiungere 50 µl di coniugato pronto per l'uso appena preparato utilizzando una pipetta multicanale.
7. Nei pozzetti opportuni aggiungere 50 µl di campioni di plasma da analizzare utilizzando una pipetta multicanale (fare riferimento alla configurazione consigliata per la piastra a pagina 15, Figure 2A e 2B). Aggiungere infine 50 µl di ognuno degli standard da 1 a 4.

	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

**Figura 2A. Configurazione dei campioni consigliata per le provette nulla, antigene TB e mitogeno (28 test per piastra).**

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4)
- 1N (Campione 1. Nullo, plasma), 1A (Campione 1. Antigene TB, plasma), 1M (Campione 1. Mitogeno, plasma)

	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	30A	34A	38A	42A
E	3N	7N	11N	15N	19N	21N	23N	27N	31N	35N	39N	43N
F	3A	7A	11A	15A	19A	21A	23A	27A	31A	35A	39A	43A
G	4N	8N	12N	16N	20N	22N	24N	28N	32N	36N	40N	44N
H	4A	8A	12A	16A	20A	22A	24A	28A	32A	36A	40A	44A

**Figura 2B. Configurazione dei campioni consigliata per le provette nulla e antigene TB (44 test per piastra).**

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4)
- 1N (Campione 1. Nullo, plasma), 1A (Campione 1. Antigene TB, plasma)

8. **Miscelare con cura il coniugato e i campioni di plasma/gli standard per 1 minuto con un agitatore per micropiastre.**
9. **Coprire ogni piastra con un coperchio e incubare a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) per  $120 \pm 5$  minuti.**
  - È opportuno 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 deionizzata o distillata e miscelare con cura. Il tampone di lavaggio concentrato 20X è sufficiente per preparare 2 litri di tampone di lavaggio pronto per l'uso.**

Lavare i pozzetti con **400  $\mu\text{l}$**  di tampone di lavaggio pronto per l'uso per almeno 6 cicli. Si consiglia di utilizzare un sistema di lavaggio automatico.

  - Per ottenere prestazioni ottimali del test, è molto importante risciacquare abbondantemente. Verificare che tutti i pozzetti siano **riempiti completamente** di tampone di lavaggio fino al bordo ad ogni ciclo di lavaggio. Si consiglia di effettuare un ammollo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.
  - È necessario aggiungere un disinfettante standard da laboratorio al serbatoio di scarico e seguire le procedure previste per la decontaminazione del materiale potenzialmente infettivo.
11. **Per rimuovere i residui del tampone di lavaggio, dare dei colpetti alle piastre capovolte su un panno non sfilacciato. Aggiungere 100  $\mu\text{l}$  di soluzione di substrato enzimatico in ogni pozzetto e miscelare con cura 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.**
  - È opportuno non esporre le piastre alla luce diretta durante l'incubazione.
13. **Trascorsi i 30 minuti di incubazione, aggiungere 50  $\mu\text{l}$  di soluzione di arresto enzimatico in ogni pozzetto e miscelare.**
  - È necessario aggiungere la soluzione di arresto enzimatico nei pozzetti seguendo lo stesso ordine e circa alla stessa velocità del substrato (passaggio 11).
14. **Misurare la densità ottica (Optical Density, OD) di ogni pozzetto entro 5 minuti dall'arresto della reazione utilizzando un lettore per micropiastre dotato di filtro da 450 nm e di filtro di riferimento da 620 nm a 650 nm. I valori OD vengono utilizzati per calcolare i risultati.**



## 7. Calcoli e interpretazione del test

Il software di analisi QFT consente di analizzare i dati grezzi e calcolare i risultati. È disponibile per il download dal sito [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Assicurarsi di utilizzare la versione più aggiornata del software.

Il software effettua un controllo della qualità del test, genera una curva standard e fornisce un risultato del test per ogni paziente, come illustrato nella sezione Interpretazione dei risultati.

In alternativa all'uso del software di analisi QFT, per determinare i risultati è possibile adottare il metodo descritto di seguito.

### Generazione della curva standard

#### (se non viene utilizzato il software di analisi QFT)

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

Costruire una curva standard  $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$  tracciando il  $\log_{(e)}$  dell'OD media (asse-y) rispetto al  $\log_{(e)}$  della concentrazione dell'IFN- $\gamma$  degli standard espressa in UI/ml (asse-x), omettendo da questi calcoli lo standard zero. Calcolare la bontà di adattamento della curva standard mediante l'analisi della regressione.

Utilizzare la curva standard per determinare la concentrazione dell'IFN- $\gamma$  (UI/ml) per ognuno dei campioni di plasma da analizzare, utilizzando il valore dell'OD di ogni campione.

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

### Controllo della qualità del test

La precisione dei risultati analitici dipende dalla generazione di una curva standard accurata. Pertanto, i risultati ottenuti dagli standard devono essere esaminati prima di poter interpretare i risultati dei campioni in esame.

Perché il test ELISA possa considerarsi valido:

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

Il software di analisi QFT calcola e documenta questi parametri di controllo della qualità.

Se i criteri descritti non vengono soddisfatti, il test non è valido e deve essere ripetuto.

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

## Interpretazione dei risultati

I risultati del test QFT devono essere interpretati rispettando i criteri descritti di seguito.

Nota: per confermare o escludere la diagnosi di tubercolosi e per valutare la probabilità di ITBL occorre basarsi su una serie di riscontri epidemiologici, anamnestici, medici e diagnostici che devono essere tenuti nella giusta considerazione in fase di interpretazione dei risultati del test QFT (Tabella 2 e Tabella 3).

**Tabella 2. Con uso delle provette nulla, con antigene TB e con mitogeno**

Nulla (UI/ml)	Con antigene TB meno Nulla (UI/ml)	Con mitogeno meno Nulla (UI/ml)	Risultato QFT	Report/Interpretazione
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativo	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> NON probabile
	≥ 0,35 e < 25% del valore Nullo	≥ 0,5	Negativo	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> NON probabile
	≥ 0,35 e ≥ 25% del valore Nullo	Qualsiasi	Positivo <sup>†</sup>	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> probabile
	< 0,35	< 0,5	Indeterminato <sup>‡</sup>	Risultati indeterminati per la risposta all'Antigene-TB
	≥ 0,35 e < 25% del valore Nullo	< 0,5	Indeterminato <sup>‡</sup>	Risultati indeterminati per la risposta all'Antigene-TB
> 8,0 <sup>§</sup>	Qualsiasi	Qualsiasi	Indeterminato <sup>‡</sup>	Risultati indeterminati per la risposta all'Antigene-TB

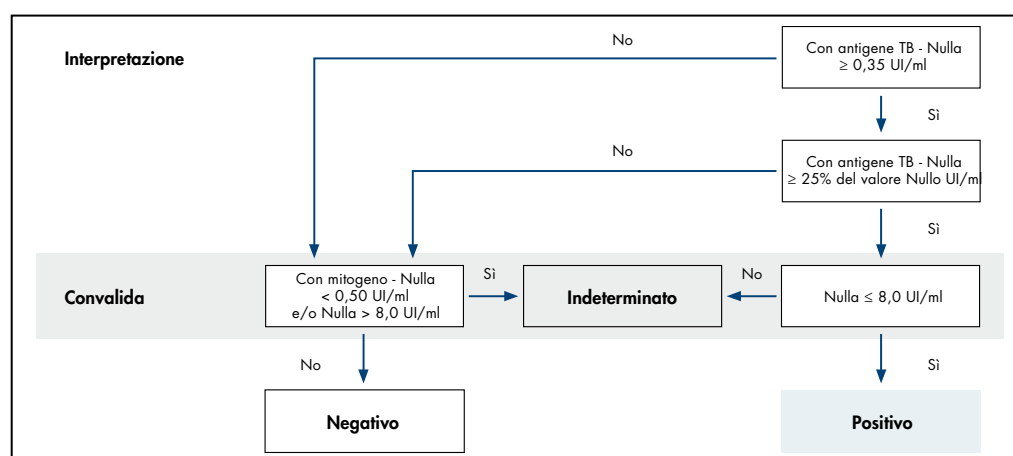
\* Le risposte al controllo positivo Mitogeno (e talvolta all'Antigene TB) possono essere comunemente al di fuori dell'intervallo del lettore per micropiastre. Ciò non influenza i risultati del test.

<sup>†</sup> Ove non vi sia il sospetto di infezione da *M. tuberculosis*, è possibile confermare risultati inizialmente positivi ripetendo il test sui campioni di plasma originali in duplicato con il metodo ELISA QFT. Se i test ripetuti su uno o entrambi i replicati generano un risultato positivo, il paziente deve essere considerato positivo al test.

<sup>‡</sup> Per le possibili cause consultare la sezione "Risoluzione dei problemi".

<sup>§</sup> Negli studi clinici, meno dello 0,25% dei pazienti presentava livelli di IFN-γ > 8,0 UI/ml per il valore Nullo.

L'ampiezza del livello di IFN-γ misurato non può essere correlata allo stadio o al grado dell'infezione, al livello della risposta immunitaria o alle probabilità di progressione della malattia attiva.



**Figura 3. Diagramma di flusso interpretativo (con uso delle provette nulla, con antigene TB e con mitogeno)**

**Tabella 3. Con uso solo delle provette QuantiFERON nulla e con antigene TB**

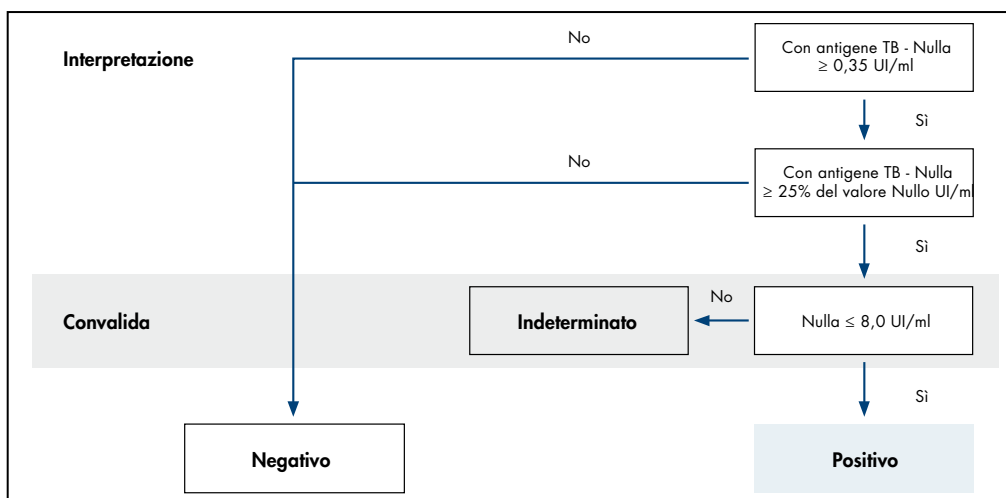
Nulla (UI/ml)	Con antigene TB meno Nulla (UI/ml)	Risultato QFT	Report/Interpretazione
	< 0,35	Negativo	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> NON probabile
≤ 8,0	≥ 0,35 e < 25% del valore Nullo	Negativo	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> NON probabile
	≥ 0,35 e ≥ 25% del valore Nullo	Positivo*	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> probabile
> 8.0†	Qualsiasi	Indeterminato‡	Risultati indeterminati per la risposta all'Antigene-TB

\* Ove non vi sia il sospetto di infezione da *M. tuberculosis*, è possibile confermare risultati inizialmente positivi ripetendo il test sui campioni di plasma originali in duplicato con il metodo ELISA QFT. Se i test ripetuti su uno o entrambi i replicati generano un risultato positivo, il paziente deve essere considerato positivo al test.

† Negli studi clinici, meno dello 0,25% dei pazienti presentava livelli di IFN-γ > 8,0 UI/ml per il valore Nullo.

‡ Per le possibili cause consultare la sezione "Risoluzione dei problemi".

L'ampiezza del livello di IFN-γ misurato non può essere correlata allo stadio o al grado dell'infezione, al livello della risposta immunitaria o alle probabilità di progressione della malattia attiva.



**Figura 4. Diagramma di flusso interpretativo con uso solo delle provette nulla e con antigene TB**

## 8. Limitazioni

I risultati del test QFT devono essere utilizzati tenendo conto della storia epidemiologica, dello stato clinico attuale e di altre valutazioni diagnostiche relative a ogni paziente.

I pazienti con valori nulli maggiori di 8 UI/ml sono classificati come "indeterminati" in quanto una risposta più alta del 25% agli antigeni TB potrebbe cadere al di fuori dell'intervallo di misurazione del test.

È possibile che i risultati inaffidabili o indeterminati siano dovuti a:

- Mancata osservanza della procedura descritta nel *Foglietto illustrativo QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*
- Livelli eccessivi di IFN-γ in circolo o presenza di anticorpi eterofili
- Attesa di più di 16 ore tra il prelievo del sangue e l'incubazione a 37°C.

## 9. Caratteristiche prestazionali

### Studi clinici

Poiché non esiste uno standard definitivo per la diagnosi dell'infezione tubercolare latente (ITBL), in pratica non è possibile stimare la sensibilità e la specificità del test QFT. La specificità del test QFT è stata stimata per approssimazione, valutando le percentuali di falsi positivi nei soggetti considerati a basso rischio (nessun fattore di rischio noto) relativamente all'infezione tubercolare. La sensibilità è stata stimata per approssimazione, valutando gruppi di pazienti con patologia TB attiva confermata tramite coltura.

### Specificità

Nell'ambito di uno studio statunitense che ha coinvolto 866 volontari, sono stati effettuati prelievi di sangue per il test QFT in occasione della somministrazione dell'esame TST. I dati anagrafici e i fattori di rischio per la TB sono stati determinati attraverso un normale sondaggio al momento dell'esame. Su 432 volontari che non presentavano fattori di rischio noti relativamente all'infezione da *M. tuberculosis*, i risultati QFT e TST ottenuti riguardavano 391 soggetti. Nessun paziente era stato sottoposto alla vaccinazione BCG. Un secondo studio di specificità del test QFT è stato condotto in Giappone su soggetti a basso rischio, dei quali il 90% circa era stato sottoposto alla vaccinazione BCG. I risultati di questi 2 studi di specificità sono riportati nella Tabella 4.

**Tabella 4. Specificità del test QFT: Risultati per i soggetti senza rischi riferiti di infezione da *M. tuberculosis***

Studio	Condizione BCG (% vaccinati)	Totale esaminati	N° di indeterminati al test QFT	N° di positivi al test QFT/ numero di test validi	Specificità QFT (IC 95%)	N° di positivi al test TST/ numero di test validi	Specificità TST* (IC 95%)
USA (non pubblicato)	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)	–	–

\* Applicazione di un valore cut-off di 10 mm per il test TST in soggetti non vaccinati con BCG. La stima della specificità del test TST è del 99,1% se si usa un valore cut-off di 15 mm.

### Sensibilità alla TB attiva

Per valutare la sensibilità, il test QFT è stato eseguito su campioni di soggetti con sospetta infezione da *M. tuberculosis* provenienti da USA, Australia e Giappone, la cui diagnosi è stata successivamente confermata tramite coltura. Sebbene non esista un test standard definitivo per l'infezione tubercolare latente (ITBL), un valido surrogato è costituito dalla coltura microbiologica del batterio *M. tuberculosis*, in quanto nei pazienti con patologia conclamata l'infezione è ovviamente presente. I pazienti erano in cura da meno di 8 giorni quando sono stati sottoposti al test QFT.

Nella Tabella 5 sono riportate le conclusioni ricavate dai 3 gruppi di pazienti positivi al batterio *M. tuberculosis*. La sensibilità complessiva del test QFT per la malattia TB attiva è risultata dell'89% (157/177).

**Tabella 5. QFT: soggetti con infezione da *M. tuberculosis* confermata tramite coltura**

Studio	N° di positivi al test QFT/numero di test validi	Sensibilità QFT (IC 95%)
Soggetti TB giapponesi (15)	86/92	93% (86-97%)
Australiani	24/27	89% (70-97%)
Statunitensi	47/58	81% (68-90%)
Totale	157/177	89% (83-93%)

### Diagnosi di ITBL

Sono stati pubblicati svariati studi a dimostrazione delle prestazioni del test QFT in varie popolazioni considerate ad alto rischio di ITBL. Le principali conclusioni alle quali sono giunti alcuni studi selezionati sono illustrate nella Tabella 6.

**Tabella 6. Studi selezionati pubblicati sul test QFT in popolazioni a rischio di ITBL**

Studio	Totale esaminati	Risultati e conclusioni
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Ambiente con percentuali di TB molto elevate. 40% di positivi a QFT e 41% di positivi a TST a 10 mm. Concordanza elevata con TST, nessun effetto del vaccino BCG su entrambi i fronti. Entrambi i test sono risultati correlati ai fattori di rischio per età e per periodo di lavoro nel settore sanitario.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	Prevalenza complessiva di ITBL in base al test QFT pari al 4,6% (27/590) nei soggetti HIV+. Risultati positivi associati ai rischi di TB. Due soggetti positivi al test QFT hanno sviluppato TB attiva entro 1 anno. Risposte indeterminate (n=20, 3,4%) significativamente associate ad un conteggio CD4 < 100/µl.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Pazienti pediatriche con sospetta TB o con una storia di contatto con TB sono stati sottoposti ai test QFT e TST, con un 10,5% di risultati positivi a QFT e un 9,5% di risultati positivi a TST a 10 mm. La concordanza tra i test è stata del 95,2% complessivamente e del 100% nei soggetti non vaccinati con BCG.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	Sono stati analizzati i contatti ravvicinati di 15 diversi Pazienti Zero: il 51% era vaccinato con BCG, il 27% era nato all'estero; il 70% dei vaccinati con BCG e il 18% dei non vaccinati sono risultati positivi al test TST (5 mm), mentre il 9% e l'11% sono risultati rispettivamente positivi al test QFT. Associazione del test QFT al rischio di TB. Associazione del test TST soltanto con la vaccinazione BCG.

In molte altre pubblicazioni vengono descritte le prestazioni di una versione di QuantiFERON-TB Gold con antigene liquido meno sensibile (il precursore di QFT) e del test QFT. Questi studi

includono l'uso del test (o dei test) nei contatti di casi di TB attiva (9, 11, 19, 25), pazienti pediatrici (6-10, 25, 28), pazienti HIV-positivi (2, 5, 20), operatori sanitari (13, 26, 32), pazienti immunosoppressi (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), nonché casi sospetti di TB (7, 8, 10, 18) e soggetti a basso rischio (15).

### **Ripetibilità ed effetto del test TST sui successivi test QFT**

Nell'ambito dello studio statunitense sulla specificità, un sottogruppo di volontari si è sottoposto nuovamente al test a distanza di 4-5 settimane dai test QFT e TST iniziali. Sono stati messi a disposizione i risultati dei test QFT relativi a 260 partecipanti in entrambe le occasioni e il livello di concordanza era del 99,6% (259/260). Un precedente test TST non induce risposte positive al test QFT.

## **10. Informazioni tecniche**

### **Risultati indeterminati**

I risultati indeterminati non dovrebbero essere comuni e possono essere correlati allo stato immunitario del soggetto sottoposto al test, ma anche a una serie di fattori tecnici:

- Attesa di più di 16 ore tra il prelievo del sangue e l'incubazione a 37°C
- Conservazione del sangue a una temperatura non compresa nell'intervallo consigliato (tra 17°C e 27°C)
- Miscelazione insufficiente delle provette per prelievo ematico
- Lavaggio incompleto della piastra ELISA

Se si sospettano problemi tecnici relativi alla raccolta e alla manipolazione dei campioni di sangue, ripetere l'intero test QFT con un nuovo campione. Se si sospettano scostamenti rispetto alle istruzioni di lavaggio o alle procedure di esecuzione del test ELISA approvate, ripetere il test ELISA dei plasma stimolati. I risultati indeterminati che sono dovuti a valori di mitogeno bassi o a valori nulli alti non dovrebbero cambiare ripetendo il test, a meno che non si sia verificato un errore nel test ELISA. I risultati indeterminati devono essere segnalati con questa definizione nel referto. Il medico dovrà decidere se prelevare un nuovo campione o adottare le procedure che riterrà più opportune.

### **Coaguli nei campioni di plasma**

In caso di formazione di coaguli di fibrina durante la conservazione a lungo termine del plasma, è necessario centrifugare i campioni per favorire la sedimentazione del materiale coagulato e il pipettamento del plasma.

## Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per ulteriori informazioni, consultare anche le informazioni tecniche disponibili su: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Per informazioni sui contatti, consultare il retro di copertina.

### Risoluzione dei problemi ELISA

---

#### *Sviluppo di colorazione aspecifica*

<b>Possibile causa</b>	<b>Soluzione</b>
a) Lavaggio incompleto della piastra	Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio a seconda del sistema di lavaggio utilizzato. È opportuno effettuare un ammollo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.
b) Contaminazione crociata dei pozzetti ELISA	Pipettare e miscelare il campione con la massima cura per contenere i rischi.
c) Kit/componenti scaduti	Verificare di utilizzare il kit prima della data di scadenza. Assicurarsi che lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100X vengano utilizzati entro tre mesi dalla data di ricostituzione.
d) Contaminazione della soluzione di substrato enzimatico	Eliminare il substrato in caso di colorazione blu. Assicurarsi che vengano utilizzati serbatoi puliti per i reagenti.
e) Miscelazione del plasma nelle provette QFT prima della raccolta	Dopo la centrifugazione, evitare di pipettare in alto o in basso o di miscelare il plasma in qualsiasi modo prima di effettuare la raccolta. Fare sempre attenzione a non alterare il materiale presente sulla superficie del gel.

#### *Valori bassi delle letture della densità ottica per gli standard*

<b>Possibile causa</b>	<b>Soluzione</b>
a) Errore di diluizione dello standard	Assicurarsi che le diluizioni dello standard del kit vengano preparate correttamente, secondo le istruzioni contenute nel foglietto illustrativo del test QFT ELISA.
b) Errore di pipettamento	Assicurarsi che le pipette siano calibrate e utilizzate in conformità alle istruzioni del produttore.
c) Temperatura di incubazione troppo bassa	L'incubazione del test ELISA dovrebbe avvenire a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).
d) Tempo di incubazione troppo breve	L'incubazione della piastra con il coniugato, gli standard e i campioni deve durare $120 \pm 5$ minuti. La soluzione di substrato enzimatico viene incubata sulla piastra per 30 minuti.
e) Uso del filtro errato per il lettore per piastre	La lettura della piastra deve avvenire a 450 nm con un filtro di riferimento da 620 a 650 nm.
f) Reagenti troppo freddi	Tutti i reagenti, tranne il coniugato concentrato 100X, devono essere portati a temperatura ambiente prima di avviare il test. Ciò richiede circa un'ora.

## Risoluzione dei problemi ELISA

---

- g) Kit/componenti scaduti      Verificare di utilizzare il kit prima della data di scadenza. Assicurarsi che lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100X vengano utilizzati entro 3 mesi dalla data di ricostituzione.

### *Fondo elevato*

#### **Possibile causa**

#### **Soluzione**

- a) Lavaggio incompleto della piastra      Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio a seconda del sistema di lavaggio utilizzato. È opportuno effettuare un ammollo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.
- b) Temperatura di incubazione troppo elevata      L'incubazione del test ELISA dovrebbe avvenire a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).
- c) Kit/componenti scaduti      Verificare di utilizzare il kit prima della data di scadenza. Assicurarsi che lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100X vengano utilizzati entro 3 mesi dalla data di ricostituzione.
- d) Contaminazione della soluzione di substrato enzimatico      Eliminare il substrato in caso di colorazione blu. Assicurarsi che vengano utilizzati serbatoi puliti per i reagenti.

### *Curva standard non lineare e variabilità dei duplicati*

#### **Possibile causa**

#### **Soluzione**

- a) Lavaggio incompleto della piastra      Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. Potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio a seconda del sistema di lavaggio utilizzato. È opportuno effettuare un ammollo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.
- b) Errore di diluizione dello standard      Assicurarsi che le diluizioni dello standard vengano preparate correttamente, secondo le istruzioni contenute nel foglietto illustrativo del test QFT ELISA.
- c) Miscelazione inadeguata      Miscelare perfettamente i reagenti capovolgendo i flaconi o agitandoli in vortex prima di aggiungerli alla piastra.
- d) Tecnica di pipettamento incostante o interruzione durante la preparazione del test      L'aggiunta del campione e dello standard deve avvenire in modo ininterrotto. Tutti i reagenti devono essere preparati prima di iniziare il test.

**Per vedere un video della procedura corretta e trovare le soluzioni ai problemi più tecnici, visitare Gnowee™ effettuando direttamente la registrazione sul sito [www.gnowee.net](http://www.gnowee.net) per ottenere l'accesso online. QIAGEN mette a disposizione gratuitamente informazioni sui prodotti e guide tecniche. È possibile richiederle direttamente al distributore o visitare il sito [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).**



# 11. Bibliografia

Un elenco completo dei riferimenti al test QFT è disponibile su Gnowee (la bibliografia QuantiFERON) sul sito [www.gnowee.net](http://www.gnowee.net).

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* **356**, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* **12**, 645.
3. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. *Eur. Respir. J.* **33**, 586.
4. Bocchino, M. et al. (2008) 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.* **27**, 907.
5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir. Res.* **7**, 56.
6. Chun, J.K. et al. (2008) 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.* **62**, 389.
7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS ONE* **3**, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.
8. Detjen, A.K. et al. (2007) 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.* **45**, 322.
9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* **135**, 1010.
10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN- $\gamma$  assay for the development of active TB disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 1164.
11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir. Res.* **7**, 77.
12. Dogra, S. et al. (2007) 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.* **54**, 267.
13. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med.* **4**, e55.
14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology* **13**, 270.
15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. *J. Infect.* **56**, 348.
16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 33.
17. Kang, Y.A. et al. (2005) 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* **293**, 2756.
18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 1146.

19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. *Swiss. Med. Wkly.* **138**, 267.
20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 737.
21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. *Am. J. Ophthalmol.* **146**, 761.
22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am. J. Transplant.* **7**, 2797.
23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 84.
24. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **12**, 513.
25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. *Emerging Infect. Dis.* **12**, 1383.
26. Pai, M. et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA* **293**, 2746.
27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) 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.* **35**, 776.
28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur. Respir. J.* **32**, 524.
29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **3**, 981.
30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 2799.
31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin. Biochem.* **40**, 913.
32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 681.

## 12. Assistenza tecnica

Per contattare l'assistenza tecnica rivolgersi a:

[www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com)

Asia-Pacific ■ [techservice-ap@qiagen.com](mailto:techservice-ap@qiagen.com)

Europe ■ [techserviceQFT-eu@qiagen.com](mailto:techserviceQFT-eu@qiagen.com)

Middle East/Africa ■ [techserviceQFT-eu@qiagen.com](mailto:techserviceQFT-eu@qiagen.com)

USA/Canada ■ [techservice-na@qiagen.com](mailto:techservice-na@qiagen.com)

Latin America (not including Brazil or Mexico) ■ [techservice-latam@qiagen.com](mailto:techservice-latam@qiagen.com)

Mexico ■ [techservice-MX@qiagen.com](mailto:techservice-MX@qiagen.com)

Brazil ■ [techsebr@qiagen.com](mailto:techsebr@qiagen.com)

## 13. Procedura sintetica del test

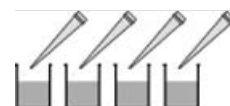
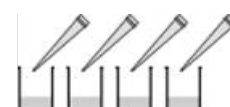
### Fase 1 - Incubazione del sangue

1. Raccogliere il sangue del paziente nelle provette per il prelievo ematico e miscelare scuotendole in modo deciso per dieci (10) volte, in modo da assicurare che l'intera superficie interna della provetta sia ricoperta di sangue e che gli antigeni si dissolvano sulle pareti.
2. Incubare le provette in posizione verticale a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 16-24 ore.
3. Dopo l'incubazione, centrifugare le provette per 15 minuti a 2000-3000 RCF (g) per separare il plasma dai globuli rossi.
4. Dopo la centrifugazione, evitare di pipettare in alto o in basso o di miscelare il plasma in qualsiasi modo prima di effettuare la raccolta. Fare sempre attenzione a non alterare il materiale presente sulla superficie del gel.

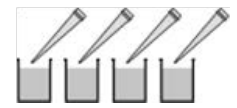
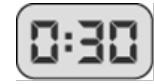
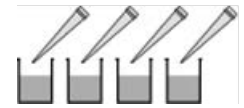


### Fase 2 - Test ELISA per IFN- $\gamma$

1. Equilibrare i componenti ELISA, tranne il coniugato concentrato 100X, a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) per almeno 60 minuti.
2. Ricostituire lo standard del kit a 8,0 UI/ml con acqua distillata o deionizzata. Preparare quattro<sup>o</sup>(4) diluizioni dello 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 e aggiungerne 50  $\mu\text{l}$  in tutti i pozzetti.
5. Aggiungere 50  $\mu\text{l}$  di campioni di plasma da analizzare e 50  $\mu\text{l}$  di standard nei pozzetti opportuni. Miscelare con l'agitatore.
6. Incubare per  $120 \pm 5$  minuti a temperatura ambiente.
7. Lavare i pozzetti almeno 6 volte con 400  $\mu\text{l}$  di tampone di lavaggio per pozzetto.



8. Aggiungere 100  $\mu$ l di soluzione di substrato enzimatico nei pozzetti.  
Miscelare con l'agitatore.
9. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
10. Aggiungere 50  $\mu$ l di soluzione di arresto enzimatico in tutti i pozzetti.  
Miscelare con l'agitatore.
11. Leggere i risultati a 450 nm con un filtro di riferimento da 620 a 650 nm.
12. Analizzare i risultati.



## Modifiche rilevanti

Le principali modifiche apportate a questa edizione (1075115IT Rev. 01) del foglietto illustrativo del test QFT ELISA sono riassunte nella tabella seguente:

<b>Sezione</b>	<b>Pagina</b>	<b>Modifiche</b>
4. Avvertenze e precauzioni	8-10	Rettifiche relative all'uso di taluni componenti ELISA tra lotti di kit.
12. Assistenza tecnica	27	Nuovi indirizzi email dell'assistenza tecnica.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (Gruppo QIAGEN); Microsoft®, Excel® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Contratto di licenza limitata per il test QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e a questo foglietto illustrativo e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo Kit. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo Kit con qualsiasi componente non incluso in questo Kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto e questo foglietto illustrativo.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo Kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terze parti.
3. Questo Kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti, salvo indicazioni contrarie di QIAGEN.
4. QIAGEN nega espressamente qualsiasi altra licenza, esplicita o implicita, ad eccezione delle licenze espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del Kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo Kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

© 2013 Cellestis, a QIAGEN Company. Tutti i diritti riservati.

---

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: [quantiferon@qiagen.com](mailto:quantiferon@qiagen.com)

