

# Foglietto illustrativo QuantiFERON Monitor<sup>®</sup> (QFM<sup>®</sup>) ELISA 2 x 96

Il test dell'IFN- $\gamma$  su sangue intero per misurare le risposte agli  
immunostimolanti innati e adattivi

Versione 1

 Per uso diagnostico in vitro

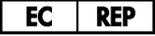
**CE**

 0650-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road

Germantown, MD 20874, USA

 QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, GERMANIA

1079024IT Rev. 03

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





# Indice generale

Uso previsto	4
Riassunto e spiegazione del test	4
Principi del test	5
Tempo necessario per l'esecuzione del test	6
Componenti e conservazione	6
Materiale necessario ma non fornito	8
Conservazione e manipolazione	8
Avvertenze e precauzioni	10
Avvertenze	10
Precauzioni	11
Prelievo e manipolazione dei campioni	13
Istruzioni per l'uso	17
Calcoli e interpretazione del test	24
Generazione della curva standard	24
Controllo della qualità del test	25
Interpretazione dei risultati	25
Limitazioni	27
Caratteristiche prestazionali	27
Studi clinici	27
Caratteristiche prestazionali del test	32
Informazioni tecniche	33
Coaguli nei campioni di plasma	33
Guida alla risoluzione dei problemi	34
Riferimenti bibliografici	37
Simboli	38
Informazioni di contatto	38
Procedura sintetica del test	39

## Uso previsto

QuantiFERON Monitor (QFM) è un test diagnostico in vitro che consente di rilevare la funzionalità immunitaria cellulo-mediata misurando il livello di interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) nel plasma. A tale scopo viene eseguito un saggio immuno-assorbente legato ad un enzima (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) dopo l'incubazione del sangue intero eparinizzato con stimolanti innati e adattivi della risposta immunitaria. Il saggio consente di rilevare la risposta immunitaria cellulo-mediata nei portatori di un trapianto di organo solido sottoposti a terapia immunosoppressiva.

Il test QFM è destinato all'uso contestualmente alla valutazione del rischio e ad altre valutazioni mediche e diagnostiche.

## Riassunto e spiegazione del test

L'immunodeficienza è caratterizzata da una ridotta capacità dell'organismo di produrre una risposta immunitaria efficace. Questa risposta compromessa o addirittura assente può essere causata da immunodeficienza primaria o acquisita (secondaria) (1).

Le immunodeficienze primarie sono ereditate geneticamente e sono caratterizzate da deficienze di specifici componenti del sistema immunitario adattivo o innato (1). Tuttavia nella maggior parte dei casi le immunodeficienze sono acquisite (secondarie) e possono essere indotte da agenti patogeni, da farmaci (ad esempio, terapie immunosoppressive somministrate in seguito ad un trapianto d'organo), da stati patologici (ad esempio cancro, leucemia o linfoma) o da contaminazioni ambientali (1).

La base molecolare dell'immunodeficienza è molto varia, tuttavia l'immunità cellulo-mediata svolge un ruolo centrale nell'indurre molte delle manifestazioni cliniche osservate. Attualmente la diagnosi e la gestione delle sindromi da immunodeficienza sono fortemente influenzate dall'agente causale (2, 3).

Ad esempio, la gestione ad hoc rappresenta la norma per quanto riguarda il monitoraggio dello stato di immunodeficienza cellulare nei pazienti sottoposti a trapianto di organo solido (TOS) che assumono farmaci in grado di sopprimere il loro sistema immunitario. Lo stato della risposta immunitaria del paziente viene generalmente misurato attraverso il monitoraggio dei livelli di sostanze farmacologiche e la valutazione clinica/patologica della ripresa funzionale dell'innesto (2, 3).

Alcuni test della funzionalità dei linfociti T misurano l'immunità cellulo-mediata rispetto a mitogeni quali la Fitoemoagglutinina (PHA), il Pokeweed (PWN) e la Concanavalina A (ConA). Tuttavia questi test misurano esclusivamente la

funzionalità dei linfociti T, che sono solo una parte delle cellule coinvolte nell'immunità cellulo-mediata. È sempre più evidente che anche i meccanismi immunitari innati contribuiscono in modo significativo alla difesa dell'ospite, sia attraverso un'azione individuale, sia attraverso un effetto di potenziamento delle risposte specifiche dei linfociti T. Ne consegue che le risposte funzionali delle cellule immunitarie innate (cellule natural killer, NK) e delle cellule adattive (linfociti T) contribuiscono insieme a formare un'analisi più completa dell'immunità cellulo-mediata (2, 3).

Il test diagnostico in vitro QFM utilizza una combinazione di stimolanti (sotto forma di pellet LyoSphere™) che agiscono in modo specifico sui diversi tipi di cellule coinvolte nei due sistemi immunitari, innato e adattivo. Lo stato immunitario funzionale di un individuo viene valutato misurando la risposta alla stimolazione del sistema immunitario innato e adattivo rispettivamente con gli agonisti Recettore di tipo Toll (Toll Like Receptor, TLR) e Recettore dei linfociti T (T-cell Receptor, TCR). Attraverso la rilevazione del livello di interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ) con il saggio ELISA, è possibile misurare sia qualitativamente, sia quantitativamente la funzionalità immunitaria cellulo-mediata.

## Principi del test

Il saggio QFM utilizza degli stimolanti liofilizzati, denominati QFM LyoSpheres™, che vengono aggiunti al sangue intero eparinizzato. Il sangue viene lasciato incubare dalle 16 alle 24 ore, dopodiché il plasma viene raccolto e analizzato per rilevare la presenza dell'IFN- $\gamma$  prodotto in risposta agli stimolanti.

L'esecuzione del test QFM prevede vari stadi. Prima il sangue intero viene raccolto nella provetta per prelievo ematico QFM. Successivamente un pellet QFM LyoSphere viene aggiunto nella provetta e viene avviata l'incubazione a 37°C il prima possibile o comunque entro 8 ore dal prelievo. Dopo un'incubazione di 16-24 ore, le provette vengono centrifugate, il plasma viene rimosso e la quantità di IFN- $\gamma$  (espresso in Unità Internazionali per ml, UI/ml) viene rilevata dal saggio ELISA e confrontata con un intervallo di valori attesi ai fini della caratterizzazione della risposta immunitaria del paziente.

Il saggio QFM fornisce una misurazione sia qualitativa che quantitativa della funzionalità immunitaria. È possibile che i risultati del test QFM non consentano una quantificazione diretta del livello di immunosoppressione.

Spesso la quantità di IFN- $\gamma$  nei campioni di plasma può superare i limiti massimi della maggior parte dei lettori ELISA, anche quando i soggetti sono sottoposti a immunosoppressione moderata. Si raccomanda di diluire i campioni di plasma

con rapporto 1:10 e/o 1:100 con il diluente verde e di analizzarli con il saggio ELISA insieme al plasma non diluito.

Nota: la soglia del test QFM può variare a seconda del livello di immunosoppressione del paziente e delle condizioni soggettive del trapianto.

Per una descrizione generale dell'interpretazione dei risultati QFM, vedere "Interpretazione dei risultati" a pagina 25 di questo foglio illustrativo.

## Tempo necessario per l'esecuzione del test

Più avanti viene fornita una stima del tempo necessario per l'esecuzione del test QFM. Viene inoltre indicato il tempo necessario per analizzare un batch composto da vari campioni.

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

ELISA: Circa 3 ore per una piastra ELISA  
(max 88 campioni)

<1 ora di lavoro

Aggiungere 10-15 minuti per ogni piastra in più

## Componenti e conservazione

QuantiFERON Monitor LyoSpheres	
N° di catalogo	0650-0701
Numero di preparazioni	10
<hr/>	
QuantiFERON Monitor LyoSpheres	10 fiale
<i>Foglietto illustrativo QuantiFERON Monitor LyoSpheres</i>	1
<hr/>	
QuantiFERON Monitor Blood Collection Tubes	
N° di catalogo	0650-0101
Numero di preparazioni	100
<hr/>	
Provette per prelievo ematico QuantiFERON Monitor (tappo bianco, anello bianco)	100 provette
<i>Foglietto illustrativo per provette per prelievo ematico QuantiFERON Monitor</i>	1

Componenti QuantiFERON Monitor 2 Plate Kit ELISA	Kit ELISA per 2 piastre
N° di catalogo	0650-0201
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
IFN- $\gamma$ Standard, lyophilized (Standard IFN- $\gamma$ , liofilizzato) (contiene IFN- $\gamma$ umano ricombinante, caseina bovina, Thimerosal 0,01% p/v)	1 x fiala (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 fiala
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
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampone di lavaggio concentrato 20x) (con pH 7,2 contiene ProClin® 300 0,05% v/v)	1 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
Enzyme Stopping Solution (Soluzione di arresto enzimatico) (contiene 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )*	1 x 15 ml
Foglietto illustrativo QuantiFERON Monitor ELISA	1

\* Contiene acido solforico. Per ulteriori precauzioni, vedere pagina 11.

## Materiale necessario ma non fornito

- Incubatore a 37°C\*; CO<sub>2</sub> non richiesta
- Pipette a volume variabile calibrate\*
- Pipetta multicanale calibrata† per l'erogazione di 50-100 µl 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
- Cilindro graduato
- Panni assorbenti che non si sfilacciano

## Conservazione e manipolazione

### Provette per prelievo ematico

Conservare le provette per prelievo ematico QFM tra 4 e 25°C. Durante il riempimento e la miscelazione, la temperatura delle provette per prelievo ematico QFM deve essere compresa tra 17 e 25°C.

### LyoSpheres

Conservare le QFM LyoSpheres tra 2 e 8°C.

### Reagenti del kit ELISA

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

\* Assicurarsi che gli strumenti siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore.

## Reagenti ELISA ricostituiti e inutilizzati

Per istruzioni sulla modalità di ricostituzione dei reagenti ELISA, vedere "Fase 2: test ELISA per IFN- $\gamma$ ", a pagina 18.

- Se conservato a una temperatura compresa tra 2 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 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 (Tabella 1).
- Il tampone di lavaggio pronto per l'uso può essere conservato a temperatura ambiente ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ) fino a 2 settimane.

## Avvertenze e precauzioni

### 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/Support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx), dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.

### Avvertenze

- Il saggio QFM fornisce una misurazione sia qualitativa che quantitativa della funzionalità immunitaria. È possibile che i risultati del test QFM non consentano una quantificazione diretta del livello di immunosoppressione.
- Nel definire lo stato immunitario di un paziente, è necessario considerare i risultati del saggio QFM insieme al quadro clinico, alla storia medica e ad altri indicatori clinici.
- La soglia del saggio QFM può variare a seconda del livello di immunosoppressione del paziente e delle condizioni soggettive del trapianto.

## Precauzioni

Solo per uso diagnostico in vitro.



**ATTENZIONE:** manipolare il sangue e il plasma umano come se fosse potenzialmente infettivo. Attenersi alle linee guida sulla manipolazione di sangue ed emoderivati. Smaltire i campioni e i materiali entrati in contatto con sangue o emoderivati nel rispetto dei regolamenti locali, nazionali e internazionali.

Le seguenti frasi precauzionali e di rischio sono valide per i componenti del saggio QuantiFERON Monitor ELISA.

### Frasi di rischio



QuantiFERON Enzyme Stopping Solution  
(Soluzione di arresto enzimatico QuantiFERON)

Contiene: acido solforico. Attenzione! Può essere corrosivo per i metalli. Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution  
(Soluzione di substrato enzimatico QuantiFERON)

Attenzione! Provoca una debole irritazione cutanea. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.



QuantiFERON Green Diluent  
(Diluente verde QuantiFERON)

Contiene: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo) pyrazole-3-carboxylate. Contiene: tartrazina. Attenzione! Può provocare una reazione allergica cutanea. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.



QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate  
(tampone di lavaggio concentrato 20x QuantiFERON)

Contiene: Mixture of 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Methyl-2H-isothiazol-3-one (3:1). Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Non disperdere nell'ambiente.

## 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 Monitor (QFM) ELISA* può determinare risultati erranei. Prima dell'uso, leggere attentamente le istruzioni.
- **Importante:** ispezionare le fiale prima dell'uso. Non utilizzare fiale LyoSphere QFM, Standard IFN- $\gamma$  o Coniugato se appaiono danneggiate o se il sigillo di gomma è rovinato. Non manipolare le fiale rotte. Adottare le precauzioni di sicurezza opportune per smaltirle correttamente. Raccomandazione: per aprire le fiale LyoSphere QFM, Standard IFN- $\gamma$  o Coniugato senza rischiare di ferirsi con il tappo metallico, utilizzare una pinza crimpatrice.
- Se un flacone di reagente è danneggiato o presenta perdite prima dell'uso, non utilizzare il kit ELISA.
- Non miscelare o utilizzare strisce per micropiastre, standard IFN- $\gamma$ , diluenti verdi o coniugati concentrati 100 $\times$  appartenenti ad altri lotti di kit QFM ELISA. Per gli altri reagenti (tamponi di lavaggio concentrato 20 $\times$ , soluzione di substrato 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 e i campioni biologici inutilizzati rispettando i regolamenti locali e nazionali per la sicurezza e la tutela dell'ambiente.
- Non utilizzare le provette per prelievo ematico QFM, le fiale QFM LyoSpheres e il kit QFM ELISA oltre la data di scadenza.
- Assicurarsi che le apparecchiature del laboratorio siano state calibrate e validate per l'uso.

## Prelievo e manipolazione dei campioni

Il test QFM deve essere eseguito esclusivamente con sangue intero raccolto in una provetta per prelievo ematico contenente eparina di litio oppure direttamente in una provetta per prelievo ematico QFM. Per ogni test occorre 1 ml di sangue intero. Le provette per prelievo ematico devono essere etichettate correttamente e devono riportare l'ora del prelievo.

Importante: è necessario ultimare la stimolazione dei campioni di sangue QFM (con l'aggiunta di una QFM LyoSphere in 1 ml di sangue), e la successiva incubazione a 37°C entro 8 ore dal prelievo.

Prima dell'incubazione, conservare i campioni ematici a temperatura ambiente ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ).

Per ottenere risultati ottimali è opportuno attenersi alle seguenti procedure.

1. Etichettare correttamente le provette.  
Assicurarsi che ogni provetta per prelievo ematico QFM sia etichettata correttamente con i dati del paziente e l'ora del prelievo.
2. Per ogni paziente, raccogliere 1 ml di sangue per venopuntura direttamente in una provetta per prelievo ematico QFM. Questa procedura deve essere eseguita da personale abilitato al prelievo di sangue.

Nota importante: la temperatura delle provette deve essere compresa tra 17 e 25°C quando vengono riempite di sangue.

Le provette per prelievo ematico QFM possono essere utilizzate fino ad un'altitudine massima di 810 metri sul livello del mare.

Dato che il sangue fluisce in modo relativamente lento nelle provette da 1 ml, mantenere la provetta sull'ago per 2-3 secondi dopo che appare completamente piena. In questo modo si potrà prelevare il volume corretto.

Il segno nero sul lato dell'etichetta della provetta per prelievo ematico QFM indica un volume di riempimento di 1 ml. Le provette per prelievo ematico QFM sono destinate al prelievo di  $1 \text{ ml} \pm 10\%$  e garantiscono prestazioni ottimali entro questi limiti. Se il livello del sangue non rientra nell'intervallo delimitato dal segno nero, è necessario prelevare un nuovo campione di sangue.

Se il sangue viene prelevato con un ago a farfalla, verificare con una provetta "vuota" che il tubo si sia riempito di sangue prima di utilizzare le provette per prelievo ematico QFM.

Se si utilizzano le provette per prelievo ematico QFM ad un'altitudine superiore ad 810 metri, o se il sangue fluisce con lentezza, effettuare il

prelievo con una siringa e trasferire immediatamente 1 ml di sangue nella provetta per prelievo ematico QFM. Per motivi di sicurezza è opportuno eseguire questa procedura nel modo seguente: togliere l'ago dalla siringa osservando le procedure di sicurezza appropriate, stappare la provetta per prelievo ematico QFM e aggiungere 1 ml di sangue fino al centro del segno nero sul lato dell'etichetta della provetta. Tappare saldamente la provetta e miscelare seguendo le istruzioni riportate di seguito.

Se si utilizza un laccio emostatico, allentarlo non appena l'ago è inserito nella vena, in modo da evitare variazioni della pressione che potrebbero influenzare il volume del sangue.

In alternativa è possibile prelevare il sangue in una provetta generica contenente eparina di litio come anticoagulante e successivamente trasferire il campione in una provetta per prelievo ematico QFM. Utilizzare esclusivamente eparina di litio come anticoagulante, poiché altri tipi di anticoagulanti interferiscono con il saggio. Riempire una provetta per prelievo ematico (volume minimo 3 ml) e miscelare delicatamente il contenuto capovolgendo la provetta svariate volte in modo che l'eparina si dissolva. Conservare il sangue a temperatura ambiente ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ) finché non verrà trasferito nella provetta per prelievo ematico QFM per la stimolazione con QFM LyoSphere. Assicurarsi che il sangue sia miscelato in modo omogeneo capovolgendo la provetta delicatamente appena prima di iniziare l'aliquotazione. Trasferire un'aliquota di 1 ml di sangue in una provetta per prelievo ematico QFM. Il trasferimento deve avvenire in condizioni asettiche, nel rispetto delle procedure di sicurezza appropriate, rimuovendo il tappo dalla provetta per prelievo ematico QFM e aggiungendo 1 ml di sangue (al centro del segno nero sul lato dell'etichetta della provetta). Tappare attentamente le provette e miscelare seguendo le istruzioni riportate di seguito.

3. Subito dopo aver riempito le provette, capovolgerle delicatamente parecchie volte per dissolvere l'eparina.

Importante: non agitare in modo troppo energico per evitare la disgregazione del gel e il conseguente rischio di generare risultati aberranti.

4. Appena prima dell'uso, equilibrare le fiale QFM LyoSpheres a temperatura ambiente ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ).
5. Aggiungere un pellet QFM LyoSphere in 1 ml di sangue in modo asettico. Stappare la provetta per prelievo ematico.

Picchiettare delicatamente la fiala QFM LyoSphere su una superficie dura, facendo in modo che il pellet QFM LyoSphere al suo interno si depositi sul

fondo. Stappare la fiala QFM LyoSphere rimuovendo prima la fascetta metallica e successivamente il tappo di gomma.

Per trasferire il pellet QFM LyoSphere nella provetta contenente 1 ml di sangue, allineare il bordo della fiala di vetro al bordo della provetta per prelievo ematico QFM, quindi capovolgere la fiala delicatamente facendo cadere il pellet (Figura 1).

Importante: se il pellet QFM LyoSphere cade fuori dalla provetta per prelievo ematico, gettare via la fiala QFM LyoSphere e aprirne un'altra.

Importante: non lasciare aperta la fiala QFM LyoSphere per lunghi periodi. Dopo l'apertura della fiala, l'aggiunta del pellet QFM LyoSphere nel sangue deve avvenire immediatamente.

Se il pellet QFM LyoSphere viene aggiunto in una provetta QFM che è stata utilizzata per prelevare il sangue, assicurarsi che il tappo della provetta venga rimontato sul campione corretto.

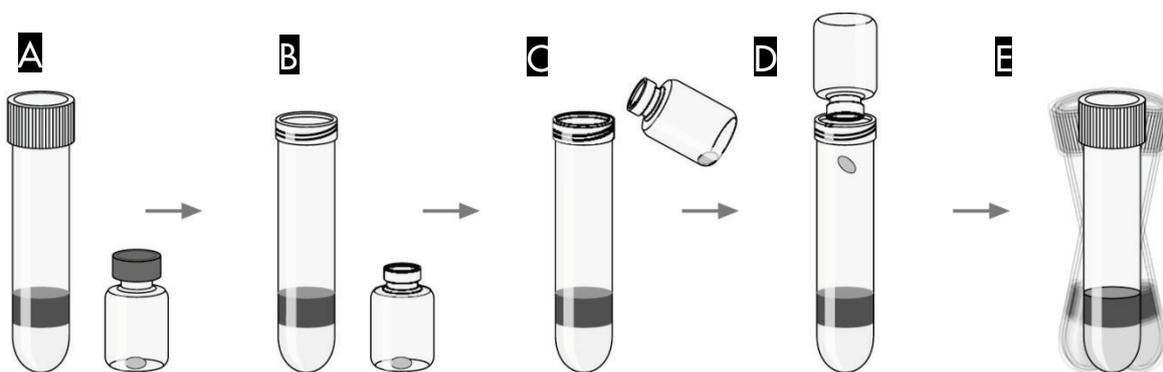


Figura 1. Aggiunta del pellet QFM LyoSphere. **A** Provetta per prelievo ematico QFM e fiala QFM LyoSphere. **B** Rimuovere il tappo della provetta per prelievo ematico QFM e rimuovere la fascetta metallica e il tappo di gomma dalla fiala QFM LyoSphere. **C** Aggiungere immediatamente il pellet QFM LyoSphere nel sangue allineando il bordo della fiala di vetro al bordo della provetta. **D** Capovolgere quindi la fiala delicatamente per trasferire il pellet LyoSphere nella provetta. **E** Ritappare la provetta per prelievo ematico QFM e agitare 5-10 volte.

6. Tappare la provetta per prelievo ematico QFM e agitare per 5-10 volte in modo abbastanza deciso finché il pellet QFM LyoSphere non sarà completamente dissolto.

Il pellet QFM LyoSphere aderisce alla superficie interna della provetta e si dissolve quando viene cosparso di sangue capovolgendo la provetta.

Assicurarsi di tappare la provetta per prelievo ematico QFM subito dopo aver aggiunto il pellet QFM LyoSphere, evitando di aggiungerne un secondo nella stessa provetta.

Nota: il pellet QFM LyoSphere è bianco, pertanto una volta dissolto diventa invisibile nel sangue.

Importante: non agitare in modo troppo energico per evitare la disgregazione del gel e il conseguente rischio di generare risultati aberranti.

7. Dopo che il pellet QFM LyoSphere è stato aggiunto e dissolto, la provetta per prelievo ematico QFM deve essere trasferita in un incubatore a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  il prima possibile (entro 8 ore dal prelievo del sangue).

# Istruzioni per l'uso

## Fase 1: incubazione del sangue e raccolta del plasma

### Materiale fornito

- Provette per prelievo ematico QFM (vedere "Componenti e conservazione", a pagina 6)

### Materiale necessario ma non fornito

- Vedere "Materiale necessario ma non fornito", a pagina 8

### Procedura

1. Incubare le provette per prelievo ematico QFM contenenti 1 ml di sangue con QFM LyoSphere IN POSIZIONE VERTICALE a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  per 16-24 ore.

Nota: l'incubatore non richiede né  $\text{CO}_2$  né umidificazione.

Dopo l'incubazione, le provette per prelievo ematico QFM possono essere conservate a una temperatura compresa tra  $4$  e  $27^\circ\text{C}$  per un massimo di 3 giorni prima della centrifugazione.

2. Centrifugando le provette per prelievo ematico QFM per 15 minuti a  $2000-3000 \times g$  (RCF), si facilita la raccolta del plasma (dopo l'incubazione). Il tampone in gel consente di separare le cellule dal plasma. Se ciò non accade, centrifugare di nuovo le provette.

È possibile raccogliere il plasma senza centrifugazione, tuttavia occorre prestare maggiore attenzione durante la rimozione del plasma per non alterare le cellule.

3. I campioni di plasma dovrebbero essere raccolti soltanto con una pipetta. Importante: dopo la centrifugazione, evitare di pipettare su e giù 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 QFM centrifugate sulla piastra QFM ELISA, anche quando si utilizzano stazioni di lavoro ELISA automatizzate.

I campioni di plasma possono essere conservati per un massimo di 28 giorni tra  $2$  e  $8^\circ\text{C}$  o, dopo la raccolta, a una temperatura inferiore a  $-20^\circ\text{C}$  per periodi prolungati. Le aliquote del plasma raccolto devono essere sigillate prima della conservazione.

Quando si raccolgono i campioni di plasma, occorrono almeno 150 µl di materiale per consentire l'eventuale ripetizione del test.

Spesso la quantità di IFN- $\gamma$  nei campioni di plasma può superare i limiti massimi della maggior parte dei lettori ELISA, anche quando i soggetti sono sottoposti a immunosoppressione moderata. Si raccomanda di diluire i campioni di plasma 1:10 e/o 1:100 con il diluente verde (Green Diluent) e di analizzarli con il saggio ELISA insieme al plasma non diluito (vedere "Fase 2: test ELISA per IFN- $\gamma$ ").

## Fase 2: test ELISA per IFN- $\gamma$

### Materiale fornito

- QuantiFERON Monitor 2 Plate Kit ELISA (vedere "Componenti e conservazione", a pagina 6)

### Materiale necessario ma non fornito

- Vedere "Materiale necessario ma non fornito", a pagina 8

### Preparazione

Spesso l'IFN- $\gamma$  nei campioni di plasma può superare i limiti massimi di molti lettori ELISA, anche quando i soggetti sono sottoposti a immunosoppressione moderata. Raccomandazione: diluire i campioni di plasma 1:10 e/o 1:100 con il diluente verde (Green Diluent) e analizzarli con il saggio ELISA insieme al plasma non diluito.

Nelle situazioni in cui un paziente è sottoposto a forte immunosoppressione, potrebbe essere sufficiente preparare e analizzare un solo campione di plasma non diluito per ottenere un risultato quantitativo.

Nota: per l'interpretazione dei risultati, utilizzare i risultati dei campioni che rientrano nell'intervallo del saggio QFM ELISA (fino a 10 UI/ml). Nel report deve essere indicato il risultato ottenuto dalla diluizione più bassa ad aver generato un risultato compreso entro l'intervallo del saggio QFM ELISA (tenendo conto del fattore di diluizione), se il plasma non diluito è superiore all'intervallo del saggio QFM ELISA.

## Procedura

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

Predisporre almeno una striscia per gli standard QFM e un numero di strisce sufficienti per i pazienti da analizzare. Dopo l'uso, conservare il supporto e il coperchio in modo da utilizzarli con le strisce rimanenti.

3. Ricostituire lo standard IFN- $\gamma$  liofilizzato con il volume di acqua deionizzata o distillata indicato sull'etichetta del flacone Standard. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e assicurare la completa solubilizzazione. La ricostituzione dello standard al volume indicato genera una soluzione con una concentrazione pari a 8,0 UI/ml.

Importante: il volume per la ricostituzione dello standard IFN- $\gamma$  varia in base al lotto. Consultare l'etichetta della fiala di standard per essere certi di utilizzare il giusto volume di acqua deionizzata o distillata.

Utilizzare lo standard ricostituito del kit per ottenere una diluizione 1:2 seguita da una serie di diluizioni 1:4 dell'IFN- $\gamma$  nel diluente verde (Green Diluent, GD) (vedere la Figura 2). Lo Standard 1 (S1) contiene 4,0 UI/ml, lo Standard 2 (S2) contiene 1,0 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 in duplicato. Preparare nuove diluizioni dello standard del kit per ogni sessione ELISA.

### Procedura consigliata per gli standard in duplicato

- a. Etichettare 4 provette "S1", "S2", "S3", "S4".
- b. Aggiungere 150  $\mu$ l di GD a S1, S2, S3 e S4.
- c. Aggiungere 150  $\mu$ l di standard del kit a S1 e miscelare con cura.
- d. Trasferire 50  $\mu$ l da S1 a S2 e miscelare con cura.
- e. Trasferire 50  $\mu$ l da S2 a S3 e miscelare con cura.
- f. Il diluente verde (GD) da solo funge da standard zero (S4).

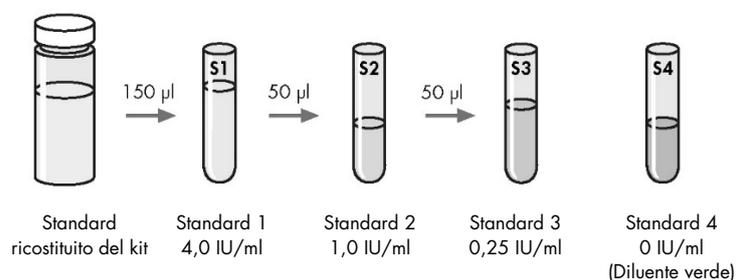


Figura 2. Preparazione della curva standard.

4. Ricostituire il coniugato concentrato 100 $\times$  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 100 $\times$  ricostituito nel diluente verde (GD) (Tabella 1. Preparazione del coniugato). Riportare il coniugato concentrato 100 $\times$  non utilizzato a una temperatura compresa tra 2 e 8 $^{\circ}$ C subito dopo l'uso. Utilizzare esclusivamente diluente verde.

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

5. Per i campioni di plasma raccolti dalle provette per prelievo ematico e successivamente conservati o congelati, miscelare i campioni prima di aggiungerli al pozzetto ELISA.

Importante: se i campioni di plasma vengono aggiunti direttamente dalle provette QFM centrifugate, evitare in ogni modo di miscelare il plasma. Fare sempre attenzione a non alterare il materiale presente sulla superficie del gel.

6. Raccomandazione: diluire i campioni di plasma 1:10.
- Aggiungere 90 µl di Green Diluent (GD) in una provetta etichettata con i dati del paziente e "1:10".
  - Successivamente aggiungere 10 µl del campione di plasma miscelato (vedere il passaggio 5 per maggiori dettagli sui campioni di plasma miscelati rispetto ai campioni aggiunti direttamente dalle provette QFM centrifugate).
  - Miscelare con cura pipettando, riducendo al minimo la formazione di schiuma.

7. Raccomandazione: diluire i campioni di plasma 1:100.
- Preparare una diluizione 1:10 (vedere il passaggio 6 precedente).
  - Aggiungere 90 µl di Green Diluent (GD) in una provetta etichettata con i dati del paziente e "1:100".
  - Aggiungere 10 µl della diluizione 1:10.
  - Miscelare con cura pipettando, riducendo al minimo la formazione di schiuma.

Raccomandazione: analizzare i seguenti campioni in parallelo e in questo ordine:

- Non diluiti, 1:10, 1:100

Il software di analisi QFM supporta anche le seguenti opzioni per i campioni dei pazienti:

- Non diluiti
- 1:10
- 1:100
- 1:10, 1:100
- Non diluiti, 1:10

8. Aggiungere 50 µl di coniugato pronto per l'uso appena preparato nei pozzetti ELISA necessari mediante una pipetta multicanale.
9. Aggiungere 50 µl del campione di plasma da analizzare nei pozzetti opportuni utilizzando una pipetta multicanale. Aggiungere quindi 50 µl di ognuno degli standard, da 1 a 4. Analizzare gli standard in duplicato.
10. Coprire ogni piastra con un coperchio e miscelare con cura il coniugato e i campioni di plasma/gli standard su un agitatore per micropiastre per 1 minuto. Evitare spruzzi.
11. Incubare a temperatura ambiente ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ) per  $120 \pm 5$  minuti.  
Non esporre le piastre alla luce diretta durante l'incubazione.
12. Durante l'incubazione, diluire 1 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 µl di tampone di lavaggio pronto per l'uso per almeno 6 cicli, in un sistema di lavaggio per micropiastre. Si consiglia di utilizzare un sistema di lavaggio automatico.

Per ottenere prestazioni ottimali del test, è molto importante risciacquare abbondantemente. Assicurarsi che tutti i pozzetti siano riempiti completamente con il tampone di lavaggio per ogni ciclo di lavaggio. Raccomandazione: per risultati ottimali, immergere i pozzetti per almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.

Aggiungere un disinfettante standard da laboratorio nel serbatoio di scarico e seguire le procedure previste per la decontaminazione del materiale potenzialmente infettivo.

13. Per rimuovere i residui del tampone di lavaggio, dare dei colpetti alle piastre capovolte su un panno assorbente senza pelucchi. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato enzimatico in ogni pozzetto, coprire ogni piastra con un coperchio e miscelare con cura su un agitatore per micropiastre.
14. Incubare a temperatura ambiente ( $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) per 30 minuti.  
Non esporre le piastre alla luce diretta durante l'incubazione.
15. Dopo l'incubazione, aggiungere 50 µl di soluzione di substrato enzimatico in tutti i pozzetti e miscelare con cura utilizzando un agitatore per micropiastre. È necessario aggiungere la soluzione di arresto enzimatico nei pozzetti seguendo lo stesso ordine e approssimativamente la stessa velocità seguita per aggiungere la soluzione di substrato enzimatico al passaggio 13.
16. Misurare la densità ottica (Optical Density, OD) entro 5 minuti dall'arresto della reazione utilizzando un lettore per micropiastre dotato di filtro da 450 nm e di filtro di riferimento da 620-650 nm. I valori OD vengono utilizzati per calcolare i risultati.

## Calcoli e interpretazione del test

Il software di analisi QuantiFERON Monitor 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 di analisi QuantiFERON Monitor.

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.

Se il plasma non diluito supera il limite massimo ( $> 10$  UI/ml) previsto dal saggio QFM ELISA, il software di analisi QuantiFERON Monitor indica nel report la diluizione più bassa ad aver generato un risultato compreso entro l'intervallo del saggio QFM ELISA, tenendo conto del fattore di diluizione.

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

### Generazione della curva standard

(Se non viene utilizzato il software di analisi QuantiFERON Monitor)

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

Costruire una curva standard  $\log_{(e)}-\log_{(e)}$  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.

Nel report deve essere indicato il risultato ottenuto dalla diluizione più bassa ad aver generato un risultato compreso entro l'intervallo del saggio QFM ELISA (tenendo conto del fattore di diluizione), se il plasma non diluito è superiore all'intervallo del saggio QFM ELISA.

## 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 QuantiFERON Monitor calcola e documenta questi parametri di controllo della qualità.

Se i criteri summenzionati non vengono soddisfatti, il test non è valido e va 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 QFM sono interpretati sulla base della risposta dell'IFN- $\gamma$  agli stimolanti immunitari innati e adattivi. Il test QFM fornisce una misurazione sia qualitativa che quantitativa della funzionalità immunitaria. È possibile che i risultati del test QFM non consentano una quantificazione diretta del livello di immunosoppressione.

Importante: nel definire lo stato immunitario di un paziente, è necessario considerare il livello di IFN- $\gamma$  misurato insieme al quadro clinico, alla storia medica e ad altre valutazioni diagnostiche (Tabella 2). La soglia del test QFM può variare a seconda del livello di immunosoppressione del paziente e delle condizioni soggettive del trapianto.

Tabella 2. Interpretazione dei risultati

Risultato QFM per IFN- $\gamma$ (UI/ml)	Classificazione	Interpretazione
< 15	Basso	Il paziente ha una risposta bassa di IFN- $\gamma$ agli stimolanti immunitari innati e adattivi
15-1000	Moderato	Il paziente ha una risposta moderata di IFN- $\gamma$ agli stimolanti immunitari innati e adattivi
> 1000	Alto	Il paziente ha una risposta elevata di IFN- $\gamma$ agli stimolanti immunitari innati e adattivi alta

Se il livello di IFN- $\gamma$  nel campione di plasma non diluito è inferiore a 0,1 UI/ml:

- Assicurarsi che nel campione di sangue sia stato aggiunto il pellet QFM LyoSphere e che l'incubazione della provetta sia avvenuta nel rispetto delle istruzioni contenute nel foglio illustrativo.
- Assicurarsi che il risultato dell'IFN- $\gamma$  sia corrispondente all'attuale stato clinico del paziente.

Se si sospettano problemi tecnici relativi alla raccolta o alla gestione dei campioni di sangue, ripetere l'intero test QFM con un nuovo campione di sangue. Ripetere il saggio ELISA sui campioni di plasma stimolati se si sospetta che il test originale abbia deviato dalla procedura descritta in questo foglio illustrativo (vedere la sezione Controllo della qualità del test).

Il medico potrebbe avere la necessità di ripetere il test se i risultati non sono coerenti con lo stato clinico del paziente.

## Limitazioni

I risultati dei test QFM devono essere utilizzati tenendo conto della storia clinica, dello stato medico attuale e di altre valutazioni diagnostiche relative a ogni paziente. I laboratori possono definire i propri intervalli per il test.

I laboratori possono inoltre scegliere se eseguire un campione di controllo esterno ottenuto da un soggetto sano parallelamente ai campioni dei pazienti.

In caso di risultati inattendibili o imprecisi, le possibili cause sono:

- Anticoagulante ematico errato: utilizzare solo eparina di litio perché gli altri tipi di anticoagulanti interferiscono con il saggio.
- Deviazioni dalla procedura descritta nel foglietto illustrativo.
- Livelli eccessivi di IFN- $\gamma$  in circolo o presenza di anticorpi eterofili.
- Attesa di più di 8 ore tra il prelievo del sangue e l'incubazione a 37°C.
- Provette per prelievo ematico QFM troppo poco piene o troppo piene (meno di 0,9 o più di 1,1 ml).

## Caratteristiche prestazionali

### Studi clinici

Sono stati svolti due studi clinici per valutare le risposte di soggetti apparentemente sani ( $n = 114$ ) rispetto ai portatori di organi trapiantati ( $n = 30$ ). Tra i portatori di organi trapiantati, 18 facevano parte di una coorte di trapiantati recenti (primi 3 mesi post-trapianto) e 12 facevano parte di una coorte di trapiantati storici, o stabili ( $> 12$  mesi post-trapianto).

- I campioni sono stati raccolti in non più di 5 punti temporali da ciascun paziente della coorte di trapiantati recenti (entro 3 mesi post-trapianto,  $n = 64$  campioni).
- I campioni sono stati raccolti 1 sola volta da ciascun paziente della coorte di trapiantati storici ( $> 12$  mesi post-trapianto,  $n = 12$  campioni).
- I campioni sono stati raccolti 1 sola volta da ciascun soggetto appartenente alla coorte apparentemente sana ( $n = 114$  campioni).

Il test QFM ha prodotto risposte comprese tra valori bassi e valori moderati per quanto riguarda sia i campioni dei trapiantati recenti, sia i campioni dei trapiantati storici. I campioni dei trapiantati recenti hanno prodotto una percentuale più alta (93,8%) di risposte verso i valori bassi e una percentuale più bassa (6,3%) di risposte verso i valori moderati, mentre i campioni dei

trapiantati storici hanno prodotto un 25% di risposte verso i valori bassi e un 66,7% di risposte verso i valori moderati (Tabella 3). Nessuno dei campioni appartenenti ai trapiantati recenti ha prodotto una risposta verso i valori alti, mentre soltanto 1 campione (8,3%) appartenente ai trapiantati storici ha prodotto una risposta alta. Le risposte al test QFM nella coorte di soggetti apparentemente sani sono state tendenzialmente moderate (83,3%) e alte (15,8%) (Tabella 3).

Tabella 3. Intervallo di risposte al test QFM in soggetti apparentemente sani/portatori di organi trapiantati

IFN- $\gamma$ (IU/ml)	Categoria del risultato	Post- trapianto recente %*	Post- trapianto storico %*	Apparente- mente sani %*	Risultati totali
		IC 95%	IC 95%	IC 95%	
		n	n	n	
< 15	Basso	93,8% 85,0-97,5 n = 60	25,0% 8,9-53,2 n = 3	0,9% 0,2-4,8 n = 1	64
15-1000	Moderato	6,3% 2,5-15,0 n = 4	66,7% 39,1-86,2 n = 8	83,3% 75,4-89,1 n = 95	107
> 1000	Alto	0,0% 0-5,7 n = 0	8,3% 1,5-35,4 n = 1	15,8% 10,2-23,6 n = 18	19
Campioni totali		64	12	114	190

\* Le percentuali indicano la proporzione di campioni, all'interno di ciascuna coorte di donatori, che rientrano nei limiti di risposta specifici.

## Risultati attesi

La distribuzione delle risposte dell'IFN- $\gamma$  al test QFM nei trapiantati recenti (entro 3 mesi post-trapianto) è stata determinata eseguendo il saggio QFM ELISA su 64 campioni ottenuti da 18 portatori di organo trapiantato (Figura 3).

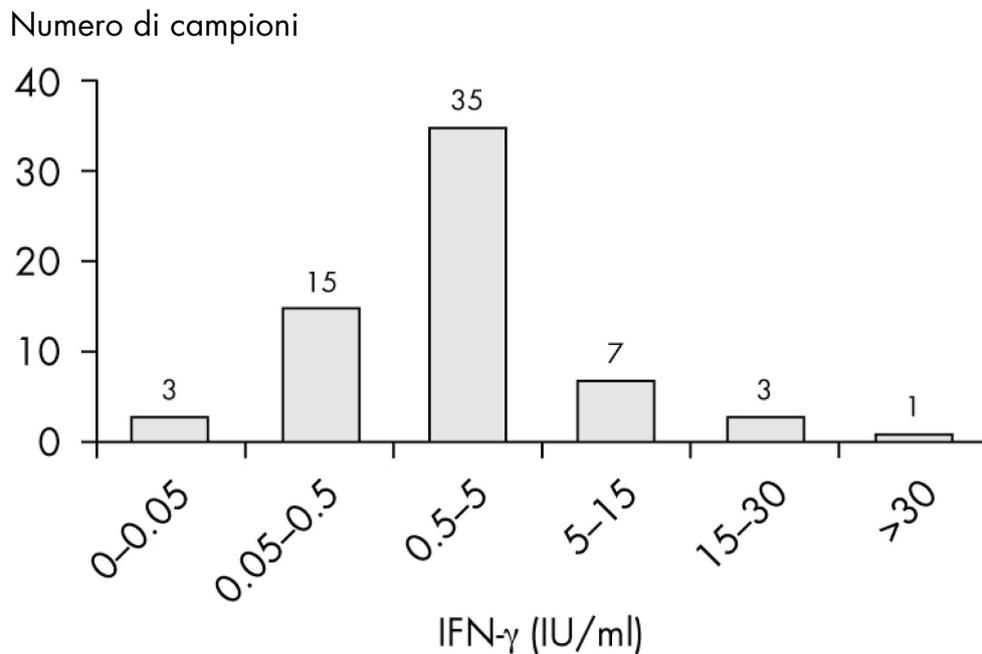


Figura 3. Distribuzione delle risposte dell'IFN- $\gamma$  al test QFM trapiantati recenti (n = 64; mediana = 1,5 UI/ml).

La distribuzione delle risposte dell'IFN- $\gamma$  al test QFM nei trapiantati storici (> 12 mesi post-trapianto) è stata determinata eseguendo il saggio QFM ELISA su 12 campioni (Figura 4).

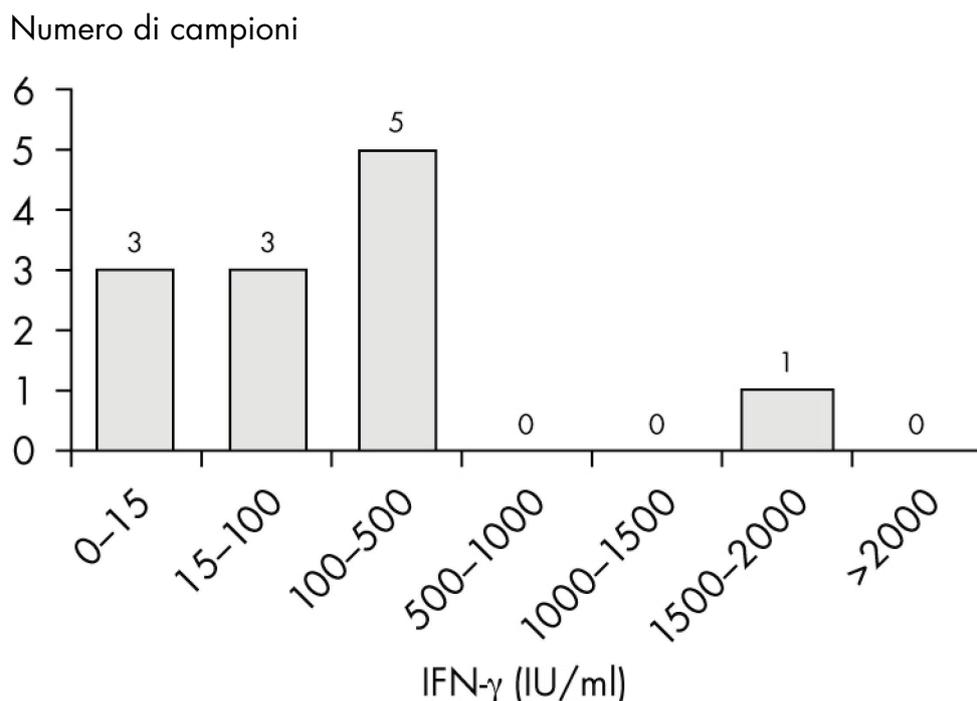


Figura 4. Distribuzione delle risposte dell'IFN- $\gamma$  al test QFM nei trapiantati storici (n = 12; mediana = 98,8 UI/ml).

La distribuzione delle risposte dell'IFN- $\gamma$  al test QuantiFERON Monitor nei soggetti apparentemente sani è stata determinata eseguendo il saggio QFM ELISA su 114 campioni (Figura 5).

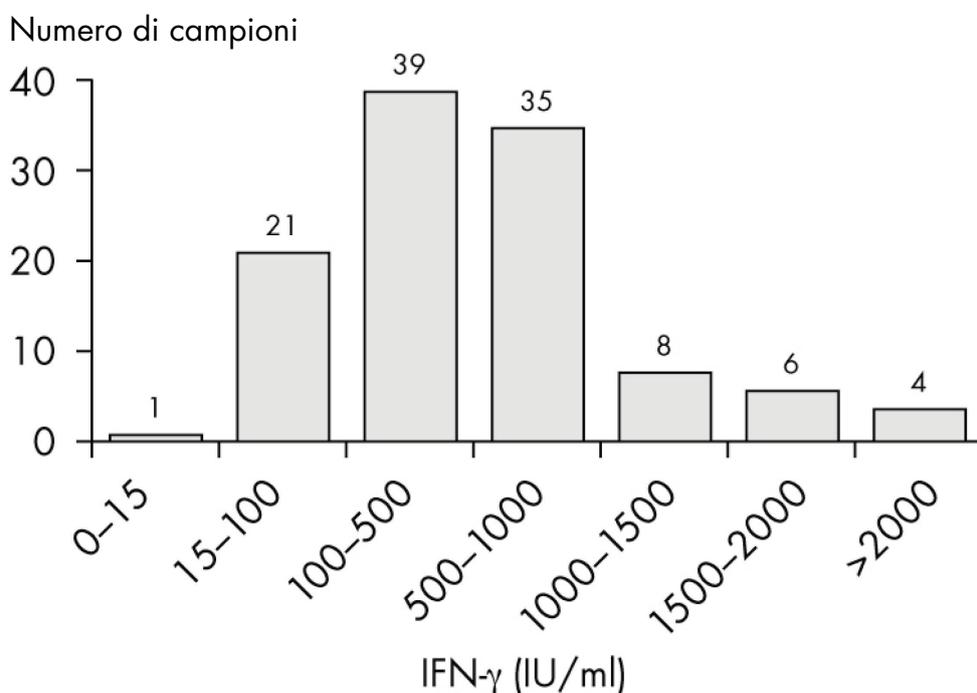


Figura 5. Distribuzione delle risposte dell'IFN- $\gamma$  al test QFM in soggetti apparentemente sani (n = 114; mediana = 400,5 UI/ml).

## Risposte al test QFM in pazienti TOS

Il test QFM è stato sottoposto a valutazione con uno studio osservazionale trasversale dei pazienti sottoposti a trapianto di organi solidi, o TOS (4). Lo studio includeva: 212 soggetti sani con un sottogruppo di 30 controlli abbinati per età e sesso, 30 pazienti pre-trapianto, 18 pazienti post-trapianto recente (66 campioni; tempo mediano post-trapianto = 21 giorni) e 11 pazienti post-trapianto storico (tempo mediano post-trapianto = 2290 giorni). La produzione media dell'IFN- $\gamma$  è stata di 555,2 UI/ml nei controlli sani e di 614,6 UI/ml nei controlli abbinati per età e sesso. La produzione media dell'IFN- $\gamma$  è risultata significativamente più bassa nei pazienti pre-trapianto (IFN- $\gamma$  = 89,3 UI/ml) e nei pazienti post-trapianto recente (IFN- $\gamma$  = 3,76 UI/ml) rispetto ai controlli abbinati per età e sesso ( $p < 0,001$ ). Il ripristino della funzionalità immunitaria è risultato significativamente più alto nei pazienti post-trapianto storico (IFN- $\gamma$  medio = 256,1 UI/ml) rispetto ai pazienti post-trapianto recente ( $p < 0,05$ ). Lo studio indica che il test QFM può essere utilizzato per valutare la funzionalità immunitaria cellulo-mediata nei pazienti TOS sottoposti a terapia immuno-soppressiva.

## Caratteristiche prestazionali del test

La linearità del test QFM ELISA è stata dimostrata distribuendo in modo casuale, sulla piastra ELISA, 5 repliche di 11 pool di plasma con concentrazioni note di IFN- $\gamma$ . La retta di regressione lineare ha una pendenza di  $1,002 \pm 0,011$  e un coefficiente di correlazione di 0,99 (Figura 6).

Il limite di sensibilità del test QFM ELISA è di 0,065 UI/ml e non vi sono prove di un effetto gancio (prozona) a dosi elevate con concentrazioni di IFN- $\gamma$  fino a 10.000 UI/ml.

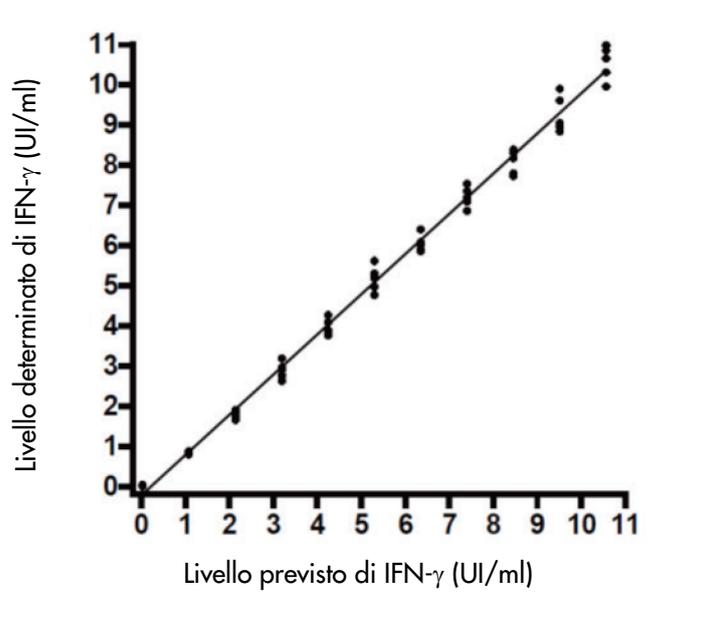


Figura 6. Profilo di linearità del test QFM ELISA determinato analizzando 5 repliche di 11 campioni di plasma di concentrazioni di IFN- $\gamma$  note.

La riproducibilità del test QFM (Fase 1) è stata determinata utilizzando campioni di sangue appartenenti a 20 soggetti sani. Sono stati valutati tre diversi operatori, tre lotti di fiale QFM LyoSpheres e tre set di attrezzature. Eseguendo il saggio QFM ELISA con tre lotti di fiale QFM LyoSpheres nelle tre condizioni descritte, si è ottenuto un coefficiente di variazione dei livelli della risposta dell'IFN- $\gamma$  pari al 22,22% (IC 95%: 17,20-27,25).

La ripetibilità del test QFM (Fase 1) è stata valutata misurando la variabilità di 5-6 ripetizioni di stimolazioni con QFM LyoSpheres con lo stesso donatore su 14 soggetti. Il coefficiente di variazione medio tra i 14 soggetti analizzati è stato del 14,7% (IC 95%: 10,2-19,2). Il %CV per i singoli soggetti è stato inferiore al 30%.

La riproducibilità del saggio QFM ELISA (Fase 2) è stata stimata analizzando 20 campioni di plasma con concentrazioni variabili di IFN- $\gamma$  in repliche di 3,

presso 3 laboratori, su 3 giorni non consecutivi e con 3 operatori. Pertanto ogni campione è stato analizzato 27 volte, in 9 sedute analitiche indipendenti. Un campione era un controllo nullo e aveva una concentrazione calcolata di IFN- $\gamma$  pari a 0,08 UI/ml (IC 95%: 0,07-0,09). Per i restanti 19 campioni di plasma, la concentrazione era compresa tra 0,33 (IC 95%: 0,31-0,34) e 7,7 UI/ml (IC 95%: 7,48-7,92).

L'imprecisione nell'ambito della stessa seduta o tra sedute diverse è stata calcolata stimando una media dei %CV per ciascun campione di plasma analizzato, contenente l'IFN- $\gamma$ , da ciascuna seduta della piastra (n = 9).

L'imprecisione è compresa tra 4,1 e 9,1 %CV. La media interna alla seduta %CV ( $\pm$  95% CI) è stata di  $6,6 \pm 0,6\%$ . La media del plasma a zero IFN- $\gamma$  è stata del 14,1 %CV.

L'imprecisione totale o tra i test è stata determinata confrontando 27 concentrazioni calcolate di IFN- $\gamma$  per ogni campione di plasma. L'imprecisione tra i test è compresa tra 6,6 e 12,3 %CV. La media complessiva dei %CV ( $\pm$  95% CI) è di  $8,7 \pm 0,7\%$ . Il plasma con IFN- $\gamma$  zero ha prodotto un risultato di 26,1 %CV. Questo livello di variazione è prevedibile perché la concentrazione calcolata di IFN- $\gamma$  è bassa e la variazione di una stima bassa di concentrazione sarà superiore rispetto a quella delle concentrazioni più alte.

## Informazioni tecniche

### 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

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) Contaminazione crociata dei pozzetti ELISA	Pipettare e miscelare il campione con la massima cura per contenere i rischi.
c) Kit/componenti scaduti	Assicurarsi 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) Soluzione di substrato enzimatico contaminato	Se si osserva una colorazione blu, gettare via il substrato. Assicurarsi di utilizzare serbatoi puliti per i reagenti.
e) Miscelazione del plasma nelle provette QFM prima della raccolta	Dopo la centrifugazione, evitare di pipettare su e giù 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.

## Risoluzione dei problemi ELISA

---

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

Possibile causa	Soluzione
a) Errore di diluizione dello standard	Assicurarsi che le diluizioni dello standard del kit siano preparate correttamente, secondo le istruzioni fornite in questo foglietto informativo.
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 (tra i 17°C e i 27°C).
d) Periodo di incubazione troppo corto	Incubare la piastra con il coniugato, gli standard e i campioni per $120 \pm 5$ minuti. Incubare la soluzione di substrato enzimatico sulla piastra per 30 minuti.
e) Filtro utilizzato per il lettore della piastra non valido	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.
g) Kit/componenti scaduti	Assicurarsi 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.

## Risoluzione dei problemi ELISA

---

### 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 (tra i 17 e i 27°C).
c) Kit/componenti scaduti	Assicurarsi di utilizzare il kit prima della data di scadenza. Assicurarsi di utilizzare lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100x entro tre mesi dalla data di ricostituzione.
d) Soluzione di substrato enzimatico contaminata	Se si osserva una colorazione blu, gettare via il substrato. Assicurarsi di utilizzare 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 siano preparate correttamente, secondo le istruzioni fornite in questo foglietto illustrativo.
c) Miscelazione inadeguata	Miscelare perfettamente i reagenti capovolgendo i flaconi o agitandoli in vortex prima di aggiungerli alla piastra.

## Risoluzione dei problemi ELISA

---

- 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.

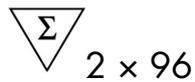
QIAGEN mette a disposizione gratuitamente informazioni sui prodotti e guide tecniche. È possibile richiederle direttamente al distributore o visitare il sito [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com).

## Riferimenti bibliografici

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

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

## Simboli



Sufficiente per 2 × 96 preparazioni di campioni



Produttore legale



Simbolo del marchio CE-IVD



Per uso diagnostico in vitro



Codice lotto



Numero di catalogo



Utilizzare entro la data indicata



Limiti di temperatura



Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale



Non riutilizzare



Tenere al riparo dalla luce



Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea

## Informazioni di contatto

Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, è possibile chiamare il numero 00800-22-44-6000, visitare il sito del servizio di assistenza tecnica [www.qiagen.com/contact](http://www.qiagen.com/contact) o contattare uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN (vedere il retro di copertina o il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Procedura sintetica del test

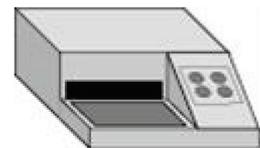
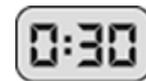
## Fase 1: incubazione del sangue

1. Raccogliere il sangue del paziente in una provetta per prelievo ematico QFM o una provetta contenente eparina di litio. Etichettare le provette con i dati del paziente e l'ora del prelievo, quindi trasportarle in laboratorio a temperatura ambiente entro 8 ore dal prelievo.
  - a. Se il sangue è stato raccolto in una provetta contenente eparina di litio, aliquotare 1 ml di sangue in una provetta per prelievo ematico QFM ed etichettare la provetta con i dati del paziente e l'ora del prelievo.
2. Aggiungere 1 pellet QFM LyoSphere in ogni provetta per prelievo ematico QFM contenente 1 ml di sangue, dissolvere il pellet LyoSphere e quindi incubare le provette il prima possibile (entro 8 ore dal prelievo del sangue) in posizione verticale per 16-24 ore a 37°C.
3. Dopo l'incubazione, centrifugare le provette per 15 minuti tra 2000 e 3000 × g (RCF) per separare il plasma dai globuli rossi.
4. Dopo la centrifugazione, evitare di pipettare su e giù 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. Tenere i componenti ELISA, tranne il coniugato concentrato 100x, a temperatura ambiente per almeno 60 minuti.
2. Ricostituire lo standard del kit a 8,0 UI/ml con acqua distillata o deionizzata. Preparare 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  $\mu$ l in tutti i pozzetti.
5. Aggiungere 50  $\mu$ l di campioni di plasma da analizzare (non diluiti o diluiti 1:10 e 1:100) e 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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.



Note

## Modifiche rilevanti

Le principali modifiche apportate a questa edizione del foglietto illustrativo del pacchetto QuantiFERON Monitor® (QFM®) ELISA sono riassunte nella tabella seguente:

Sezione	Pagina	Modifiche
Precauzioni	11	Nuove informazioni GHS (Globally Harmonized System)
Precauzioni	12	Aggiunte istruzioni di sicurezza relative alle fiale con tappi metallici.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QFM®, QuantiFERON®, QuantiFERON Monitor® (Gruppo QIAGEN); LyoSphere™, LyoSpheres™ (BioLymph); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Contratto di licenza limitata per il kit QuantiFERON Monitor

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 al relativo manuale 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, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alcuni protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre nessuna garanzia in merito alla violazione di eventuali diritti di terzi.
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 terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
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).

© 2014 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

---

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

Australia ■ [techservice-au@qiagen.com](mailto:techservice-au@qiagen.com)

Austria ■ [techservice-at@qiagen.com](mailto:techservice-at@qiagen.com)

Belgium ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

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

Canada ■ [techservice-ca@qiagen.com](mailto:techservice-ca@qiagen.com)

China ■ [techservice-cn@qiagen.com](mailto:techservice-cn@qiagen.com)

Denmark ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Finland ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

France ■ [techservice-fr@qiagen.com](mailto:techservice-fr@qiagen.com)

Germany ■ [techservice-de@qiagen.com](mailto:techservice-de@qiagen.com)

Hong Kong ■ [techservice-hk@qiagen.com](mailto:techservice-hk@qiagen.com)

India ■ [techservice-india@qiagen.com](mailto:techservice-india@qiagen.com)

Ireland ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

Italy ■ [techservice-it@qiagen.com](mailto:techservice-it@qiagen.com)

Japan ■ [techservice-jp@qiagen.com](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

Korea (South) ■ [techservice-kr@qiagen.com](mailto:techservice-kr@qiagen.com)

Luxembourg ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

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

The Netherlands ■ [techservice-bnl@qiagen.com](mailto:techservice-bnl@qiagen.com)

Norway ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Singapore ■ [techservice-sg@qiagen.com](mailto:techservice-sg@qiagen.com)

Sweden ■ [techservice-nordic@qiagen.com](mailto:techservice-nordic@qiagen.com)

Switzerland ■ [techservice-ch@qiagen.com](mailto:techservice-ch@qiagen.com)

UK ■ [techservice-uk@qiagen.com](mailto:techservice-uk@qiagen.com)

