



Marzo 2023

# Istruzioni per l'uso del QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus ELISA Kit



2 x 96 (622120)



20 x 96 (622822)

Versione 1



Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold Plus Blood Collection Tubes



622120, 622822



QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania



1123669IT



# Indice

Uso previsto .....	5
Utente previsto .....	5
Descrizione e principio .....	6
Informazioni sull'agente patogeno.....	6
Sommario e spiegazioni .....	7
Principi dell'esame .....	9
Materiali in dotazione.....	11
Contenuto del kit.....	11
Componenti del kit .....	12
Piattaforma e software .....	12
Materiale necessario ma non in dotazione .....	13
Reagenti aggiuntivi.....	13
Materiali di consumo .....	13
Strumentazione .....	13
Avvertenze e precauzioni .....	14
Informazioni sulla sicurezza.....	14
Informazioni di emergenza.....	15
Precauzioni .....	16
Conservazione e manipolazione dei reagenti .....	18
Stabilità durante l'uso .....	18
Reagenti ricostituiti e inutilizzati .....	18
Conservazione e manipolazione dei campioni.....	19

Protocollo: esecuzione dell'ELISA.....	20
Risultati (calcoli).....	26
Generazione della curva standard e dei valori del campione .....	26
Controllo della qualità del test.....	28
Interpretazione dei risultati.....	30
Limitazioni .....	32
Caratteristiche delle prestazioni.....	33
Studi clinici.....	33
Sensibilità.....	35
Valori previsti.....	43
Riepilogo di sicurezza e prestazioni .....	49
Caratteristiche delle prestazioni dell'esame.....	50
Prestazioni analitiche .....	50
Smaltimento .....	63
Bibliografia.....	64
Guida alla risoluzione dei problemi.....	66
Simboli.....	69
Appendice A: Informazioni tecniche .....	72
Risultati indeterminati .....	72
Coaguli nei campioni di plasma .....	72
Campioni di plasma lipemici .....	72
Appendice B: Procedura sintetica del test ELISA .....	73
Informazioni per gli ordini .....	75
Cronologia delle revisioni del documento.....	77

## Uso previsto

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

QFT-Plus è un test indiretto per la rilevazione dell'infezione da *M. tuberculosis* (patologia compresa) ed è destinato all'uso in associazione con la valutazione del rischio, le radiografie e altre indagini medico-diagnostiche.

## Utente previsto

Questo kit è destinato all'uso professionale.

L'esame QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) deve essere utilizzato da personale qualificato in ambiente di laboratorio.

# Descrizione e principio

## Informazioni sull'agente patogeno

La tubercolosi è una malattia infettiva contagiosa causata dagli organismi del complesso *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, and *M. caprae*) la cui trasmissione ai nuovi ospiti avviene generalmente per inalazione da nuclei di goccioline di pazienti con tubercolosi polmonare. 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 (LTBI) 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 di LTBI ha come scopo principale la valutazione di una terapia medica idonea, atta a prevenire la malattia. Per più di 100 anni, l'unico metodo esistente per diagnosticare la LTBI era il test cutaneo tubercolinico (Tuberculin Skin Test, TST) (4). 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 e micobatteriologici.

## Sommario e spiegazioni

Il test QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) rappresenta la quarta generazione della tecnologia di test QuantiFERON-TB per la valutazione della risposta cellulo-mediata attraverso una misurazione quantitativa dell'IFN- $\gamma$  in un campione di sangue intero. QFT-Plus è un test qualitativo che misura le risposte immuni cellulo-mediate (CMI) agli antigeni peptidici che simulano le proteine micobatteriche. Queste proteine ESAT-6 e CFP-10 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* (1). 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.

I test cutanei della tuberculina e i test IGRA sono utili, ma insufficienti 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 es. *M. kansasii*) possono generare risultati positivi. Sono dunque necessari ulteriori accertamenti medici e diagnostici per confermare o escludere una diagnosi di tubercolosi.

Gli antigeni utilizzati nel test QFT-Plus sono un cocktail peptidico che simula le proteine ESAT-6 e CFP-10. 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 LTBI (1,2,6,9). 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 e CFP-10, dal momento che i geni che codificano queste proteine sono presenti nei micobatteri *M. kansasii*, *M. szulgai* e *M. marinum* (1, 3, 7).

La popolazione di screening per il test QFT-Plus è composta da pazienti con tubercolosi attiva clinicamente confermata e pazienti con rischio di infezione tubercolare o infezione tubercolare latente (LTBI). Non vi sono limitazioni di età, genere o di altro tipo.

Nelle infezioni da micobatteri tubercolari, i linfociti T CD4<sup>+</sup> svolgono un ruolo centrale ai fini del controllo immunologico, attraverso la secrezione della citochina IFN- $\gamma$ . Le prove fin qui raccolte dimostrano che i linfociti T CD8<sup>+</sup> svolgono un ruolo nella difesa dell'ospite contro i micobatteri tubercolari, attraverso la produzione dell'IFN- $\gamma$  e di altri fattori solubili che attivano i macrofagi per sopprimere la crescita dei micobatteri tubercolari, uccidere le cellule infettate o lisare direttamente i micobatteri intracellulari. Cellule CD8<sup>+</sup> specifiche dei micobatteri tubercolari che producono l'IFN- $\gamma$  sono state rilevate in pazienti con LTBI e con TB attiva. Inoltre i linfociti T CD8<sup>+</sup> specifici per ESAT-6 e CFP-10 sono stati riscontrati con maggiore frequenza nei soggetti con tubercolosi attiva rispetto ai soggetti con tubercolosi latente e ciò suggerisce una possibile associazione con un'esposizione recente a MTB (8,10–12). In più i linfociti T CD8<sup>+</sup>specifici per MTB che producono IFN- $\gamma$  sono stati rilevati anche nei soggetti con tubercolosi attiva e co-infezione da HIV (13, 14) e nei bambini affetti da tubercolosi (15).

Il test QFT-Plus utilizza due provette di antigene TB distinte: TB Antigen Tube 1 (TB1) e TB Antigen Tube 2 (TB2). Entrambe contengono gli antigeni peptidici ottenuti dagli antigeni associati al complesso MTB: ESAT-6 e CFP-10. Sia la provetta TB1 che la provetta TB2 contengono i peptidi ottenuti da ESAT-6 e CFP-10 formulati in modo tale da indurre le risposte CMI dai linfociti T helper CD4<sup>+</sup>; la provetta TB2 contiene un ulteriore gruppo di peptidi il cui scopo è indurre le risposte CMI dai linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup>.

I fattori di rischio per l'infezione da *M. tuberculosis* includono predittori storici, medici o epidemiologici per la tubercolosi o l'esposizione alla tubercolosi. Fare riferimento alle più recenti linee guida dell'OMS <https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-1-prevention-tuberculosis-preventive-treatment> per raccomandazioni dettagliate sulla diagnosi dell'infezione da *M. tuberculosis* (patologia compresa) e la selezione dei soggetti per i test (16). QFT-Plus è stato testato in alcuni gruppi di pazienti indicati per lo screening dell'infezione da TB in conformità alle attuali linee guida dell'OMS (16), tra cui: soggetti risultati positivi al virus dell'immunodeficienza umana (HIV), contatti di recenti pazienti con TB e residenti in comunità che erano stati esposti ad adulti ad alto rischio di TB (5).

## Principi dell'esame

QFT-Plus è un esame qualitativo che utilizza speciali provette di raccolta per prelievo ematico, che contengono antigeni peptidici che simulano le proteine di *M. tuberculosis*, utilizzate per il prelievo di 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.

Nella prima fase il sangue intero viene raccolto in ciascuna delle QFT-Plus Blood Collection Tubes che includono una provetta Nil, una provetta TB1, una provetta TB2 e una provetta Mitogen. In alternativa, è possibile prelevare il sangue in un'unica provetta di raccolta contenente eparina di litio o di sodio come anticoagulante, e quindi trasferire il campione nelle QFT-Plus Blood Collection Tubes.

Le QFT-Plus Blood Collection Tubes vengono agitate per mescolare l'antigene e il sangue e devono essere incubate a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  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 processato e la quantità di IFN- $\gamma$  (UI/ml) viene misurata con il dosaggio ELISA. QFT-Plus ELISA utilizza uno standard IFN- $\gamma$  umano ricombinante che è stato analizzato rispetto a un preparato IFN- $\gamma$  di riferimento (Rif. NIH: Gxg01-902-535). I risultati dei campioni analizzati sono espressi in Unità Internazionali per ml (UI/ml) relative a una curva standard preparata analizzando le diluizioni dello standard incluso nel kit.

È noto che gli anticorpi eterofili (ad es., gli anticorpi umani anti-murini, HAMA) presenti nel siero o nel plasma di alcuni individui possono interferire con gli immunodosaggi. L'effetto degli anticorpi eterofili sul test QFT-Plus ELISA è ridotto al minimo grazie all'aggiunta di siero murino normale nel diluente verde e all'uso di frammenti di anticorpo monoclonale F(ab) $^2$  come anticorpo di cattura dell'IFN- $\gamma$  nel rivestimento dei pozzetti della micropiastra.

Il risultato dell'esame QFT-Plus è considerato positivo per la risposta all'IFN $\gamma$  se una delle due provette con antigene TB è significativamente al di sopra del valore Nil per l'IFN $\gamma$  (UI/ml). Il campione di plasma nella provetta Mitogen agisce da controllo positivo per l'IFN $\gamma$  per ogni campione analizzato. Una bassa risposta al controllo Mitogen (<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, procedura di riempimento/miscelazione della provetta Mitogen o incapacità dei linfociti del paziente di generare IFN $\gamma$ . Livelli elevati di IFN $\gamma$  nel campione Nil possono verificarsi con la presenza di anticorpi eterofili o la secrezione intrinseca di IFN $\gamma$ . La provetta Nil compensa il livello di fondo (ad es., livelli eccessivi di IFN $\gamma$  in circolo o presenza di anticorpi eterofili). Il livello di IFN $\gamma$  della provetta Nil viene sottratto dal livello di IFN $\gamma$  delle provette con antigene TB e della provetta Mitogen. L'intervallo di misurazione del QFT-Plus ELISA arriva a 10 UI/ml.

# Materiali in dotazione

## Contenuto del kit

<b>Componenti ELISA</b>	<b>Kit a 2 piastre</b>	<b>Pacchetto laboratorio di riferimento</b>
<b>Numero di catalogo</b>	<b>622120</b>	<b>622822</b>
Microplate strips (Strisce per micropiastre) (12 x 8 pozzetti) rivestite con anticorpo monoclonale murino anti-IFN- $\gamma$ umano	2 set di 12 strisce per micropiastre da 8	20 set di 12 strisce per micropiastre da 8
IFN- $\gamma$ Standard (Standard IFN), 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 (Coniugato concentrato 100x), liofilizzato (contiene anticorpi murini anti-IFN- $\gamma$ umani coniugati con perossidasi di rafano (HRP) e Thimerosal 0,01%)	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 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	1 x 15 ml	10 x 15 ml
<i>Istruzioni per l'uso di QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA Kit</i>	1	1

## Componenti del kit

### Controlli e calibratori

QFT-Plus ELISA utilizza uno standard IFN- $\gamma$  umano ricombinante che è stato analizzato rispetto a un preparato IFN- $\gamma$  di riferimento (Rif. NIH: Gxg01-902-535).

### Piattaforma e software

QFT-Plus Analysis Software può essere utilizzato, facoltativamente, per analizzare i dati grezzi e calcolare i risultati. È disponibile per il download all'indirizzo [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Materiale necessario ma non in dotazione

## Reagenti aggiuntivi

- QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes
- Acqua deionizzata o distillata, 2 litri

## Materiali di consumo

- Coperchio per piastra da 96 pozzetti
- Opzionale: Microprovette da 1 ml con tappi in rack da 96 pozzetti o micropiastre non rivestite con sigilli in plastica per la conservazione di plasma (rack o piastra da 22 pazienti)
- Contenitori per reagenti

## Strumentazione\*

- Incubatore a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (con o senza  $\text{CO}_2$ )
- Pipette calibrate a volume variabile per l'erogazione di 10–1000  $\mu\text{l}$  con puntali monouso
- Pipetta multicanale calibrata per l'erogazione da 50 a 100  $\mu\text{l}$  con puntali monouso
- Agitatore per micropiastre capace di velocità comprese tra 500 e 1000 rpm
- Sistema di lavaggio per micropiastre (per la sicurezza nella manipolazione dei campioni di plasma, si consiglia un sistema di lavaggio per piastre automatizzato)
- Lettore per micropiastre dotato di filtro da 450 nm e di filtro di riferimento da 620 a 650 nm
- Vortex a velocità variabile
- Centrifuga in grado di centrifugare le provette di raccolta almeno a 3000 RCF (g)
- Cilindro graduato, 1 litro o 2 litri

\* Prima dell'uso, assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

# Avvertenze e precauzioni

Tenere presente che potrebbe essere richiesto di consultare le norme locali per la segnalazione al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità di regolamentazione del Paese dell'utente e/o del paziente di gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.

Per uso diagnostico in vitro.

## Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS sono disponibili online nel pratico formato PDF all'indirizzo [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), dove è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

- I campioni sono potenzialmente infettivi. Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.
- Un risultato negativo al test QFT-Plus 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), a una manipolazione impropria delle provette dopo il prelievo di sangue per venopuntura, a errori nell'esecuzione dell'esame o ad altre variabili immunologiche individuali, comprese quelle correlate a eventuali comorbilità. La produzione di anticorpi eterofili o IFN- $\gamma$  non specifica da altre condizioni infiammatorie possono mascherare risposte specifiche ai peptidi del ESAT-6 o CFP-10.
- Un risultato positivo al test QFT-Plus non può di per sé confermare in modo definitivo la diagnosi di infezione da *M. tuberculosis*. Eventuali errori nell'esecuzione dell'esame possono determinare risposte falso-positive del QFT-Plus.

- In seguito a un risultato positivo al test QFT-Plus sono necessari ulteriori accertamenti medici per confermare la presenza di tubercolosi attiva (ad esempio, striscio e coltura di bacilli acido-resistenti, raggi X toracici).
- Anche se le proteine ESAT-6 e CFP-10 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-Plus 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.
- Un risultato falso negativo del QFT-Plus può essere causato da una raccolta errata dei campioni ematici o da una manipolazione impropria del campione che influisce sulla funzione linfocitaria. Fare riferimento alla sezione "Protocollo: esecuzione dell'ELISA", pagina 20, per una corretta manipolazione dei campioni di sangue. Il ritardo nell'incubazione può causare risultati falso negativi o indeterminati, e altri parametri tecnici possono influenzare la capacità di rilevare una risposta significativa all'IFN- $\gamma$ .

## Informazioni di emergenza

CHEMTREC

Al di fuori di USA e Canada +1 703-527-3887

## Precauzioni

<p><b>CAUTELA</b></p> 	<p>manipolare il sangue umano come se fosse potenzialmente infettivo.</p> <p>Attenersi alle relative linee guida sulla manipolazione del sangue. Smaltire i campioni e i materiali entrati in contatto con sangue o emoderivati nel rispetto dei regolamenti locali, nazionali e internazionali.</p>
---	--

### QuantifERON Enzyme Stopping Solution



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

### QuantifERON Enzyme Substrate Solution

Avvertenza! Causa lieve irritazione cutanea. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

### QuantifERON Green Diluent



Contiene: tartrazina. Avvertenza! Può provocare una reazione allergica cutanea. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

### QuantifERON Wash Buffer 20x Concentrate

Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Evitare l'immissione nell'ambiente.

## Ulteriori informazioni

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

- Il thimerosal viene utilizzato come conservante in alcuni reagenti del QFT-Plus. Può essere tossico per ingestione, inalazione o contatto con la pelle.
- La mancata osservanza delle istruzioni presenti nel Foglietto illustrativo di *QuantiferON-TB Gold Plus (QFT-Plus)* può determinare risultati erranei. Prima dell'uso, leggere attentamente le istruzioni.
- Se un flacone di reagente è danneggiato o presenta perdite prima dell'uso, non utilizzare il kit.
- **Importante:** ispezionare le fiale prima dell'uso. Non utilizzare il coniugato o le fiale di standard IFN- $\gamma$  se appaiono danneggiate o se il sigillo di gomma è rovinato. Non manipolare le fiale rotte. Adottare le precauzioni di sicurezza opportune per smaltire le fiale correttamente. Per ridurre al minimo il rischio di lesioni causate dal tappo di metallo, per aprire le fiale di coniugato o standard IFN- $\gamma$  si raccomanda di usare una decapsulatrice per fiale.
- Non miscelare o utilizzare strisce per micropiastre, standard IFN- $\gamma$ , diluente verde o coniugato concentrato 100x appartenente ad altri lotti di kit QFT-Plus. Per gli altri reagenti (tampone di lavaggio concentrato 20X, 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 non utilizzati e i campioni biologici nel rispetto delle normative locali, statali e federali.
- Non utilizzare il QFT-Plus ELISA Kit oltre la data di scadenza.
- È necessario rispettare sempre delle corrette procedure di laboratorio.
- Assicurarsi che le attrezzature del laboratorio (ad es. i sistemi di lavaggio e lettura delle piastre) siano calibrati e approvati per l'uso.

# Conservazione e manipolazione dei reagenti

Prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

## Stabilità durante l'uso

- Conservare il kit ELISA a 2–8°C.
- Tenere sempre la soluzione di substrato enzimatico lontano dalla luce diretta.

## Reagenti ricostituiti e inutilizzati

- Per istruzioni sulla modalità di ricostituzione dei reagenti, fare riferimento a "Protocollo: esecuzione dell'ELISA", a pagina 20.
- 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 inoltre 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.
- Le strisce per micropiastra sono monouso. Le strisce non utilizzate possono essere rimosse dal telaio della piastra e conservate per un uso futuro.

## Conservazione e manipolazione dei campioni

Fare riferimento alle *Istruzioni per l'uso di QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Blood Collection Tubes* (1123668) per i dettagli sul flusso di lavoro di raccolta del sangue per il test QFT-Plus.

# Protocollo: esecuzione dell'ELISA

## Punti importanti prima di iniziare

### **Impostazione (tempo necessario per l'esecuzione dell'esame)**

- Per ottenere risultati validi dall'esame QFT-Plus, l'operatore deve eseguire attività specifiche entro tempi prestabiliti. Prima dell'uso dell'esame, si consiglia all'operatore di pianificare attentamente ogni fase dell'esame per fare in modo che ci sia il tempo sufficiente a svolgere ogni fase. Il tempo necessario è indicato di seguito, così come il tempo necessario per eseguire l'analisi di più campioni in batch.
  - Circa 3 ore per una piastra ELISA
  - <1 ora di lavoro
  - Aggiungere 10–15 minuti per ogni piastra in più

## IFN- $\gamma$ ELISA

- Fare riferimento a "Contenuto del kit", pagina 11, e "Materiale necessario ma non in dotazione", pagina 13, per i materiali necessari all'esecuzione dell'ELISA.

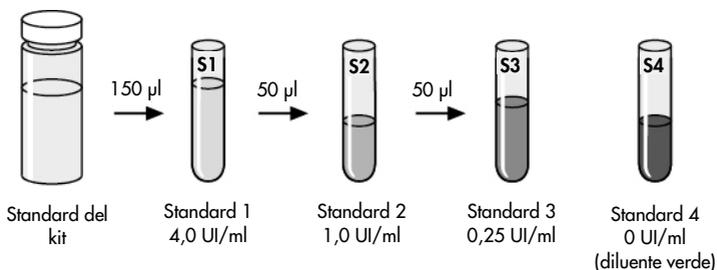
## Procedura

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. Togliere le strisce per piastra ELISA non necessarie dal supporto, risigillare il sacchetto di alluminio e conservare di nuovo in frigorifero fino all'occorrenza.

3. Calcolare almeno 1 striscia per gli standard QFT-Plus e altre strisce sufficienti per il numero di soggetti da analizzare (fare riferimento alla Figura 2 per il formato di piastra consigliato). Dopo l'uso, conservare il supporto e il coperchio in modo da utilizzarli con le strisce rimanenti.
- 3a. Ricostituire lo standard IFN- $\gamma$  con il volume di acqua deionizzata o distillata indicato sull'etichetta del flacone. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e assicurarsi che l'intero contenuto della fiala sia completamente sciolto. Ricostituendo lo standard IFN- $\gamma$  al volume corretto si otterrà una soluzione con una concentrazione pari a 8,0 UI/ml.
- 3b. Utilizzando lo standard ricostituito, preparare una serie di diluizioni di 4 concentrazioni di IFN- $\gamma$  (fare riferimento alla Figura 1).
- 3c. Dovrebbe essere generata una curva standard con le seguenti concentrazioni di IFN- $\gamma$ :
- S1 (Standard 1) contiene 4,0 UI/ml
  - S2 (Standard 2) contiene 1,0 UI/ml
  - S3 (Standard 3) contiene 0,25 UI/ml
  - S4 (Standard 4) contiene 0 UI/ml (solo diluente verde [Green Diluent, GD]).
- 3d. Gli standard devono essere analizzati almeno in duplicato.
- 3e. Preparare nuove diluizioni dello standard del kit per ogni sessione ELISA.

### Procedura

A	Etichettare 4 provette: S1, S2, S3, S4
B	Aggiungere 150 $\mu$ l di GD a S1, S2, S3, 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	Solo GD funge da standard zero (S4)



**Figura 1. Preparazione di serie di diluizioni della curva standard.**

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 assicurarsi che l'intero contenuto della fiala sia completamente sciolto.
  - 4a. Il coniugato pronto per l'uso viene preparato diluendo la quantità necessaria di coniugato concentrato 100x ricostituito nel diluente verde (Tabella 1).
  - 4b. Il coniugato pronto per l'uso deve essere utilizzato entro 6 ore dalla preparazione.
  - 4c. Riportare il coniugato con 100x non utilizzato a una temperatura compresa tra 2 e 8°C subito dopo l'uso.

Tabella 1. Preparazione del coniugato (pronto per l'uso)

Numero di strisce	Volume di 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 di raccolta del sangue e successivamente conservati (refrigerati o congelati), miscelare scrupolosamente i campioni conservati prima di aggiungerli al pozzetto ELISA. I campioni di plasma possono essere conservati in QFT-Plus Blood Collection Tubes centrifugate per un massimo di 28 giorni a una temperatura compresa tra 2 e 8°C; i campioni di plasma raccolto possono essere conservati per un massimo di 28 giorni a 2–8°C. I campioni di plasma raccolto possono anche essere conservati a temperature inferiori a -20°C (preferibilmente fino a -70°C) per periodi prolungati.

I campioni di plasma possono essere caricati/utilizzati direttamente dalle provette di raccolta del sangue centrifugate per la misurazione nella piastra QFT-Plus ELISA.

Importante: se i campioni di plasma devono essere trasferiti direttamente dalle QFT-Plus Blood Collection Tubes centrifugate, la miscelazione del plasma deve essere evitata. Fare sempre attenzione a non alterare il materiale presente sulla superficie del gel.

6. Aggiungere 50 µl di coniugato pronto per l'uso appena preparato in ciascun pozzetto ELISA.
7. Aggiungere 50 µl di campione di plasma da analizzare nei pozzetti opportuni (fare riferimento alla configurazione consigliata per la piastra ELISA nella Figura 2).
8. Infine, aggiungere 50 µl di ognuno degli standard da 1 a 4 nei pozzetti della piastra appropriati (fare riferimento al layout della piastra ELISA consigliato in Figura 2). Gli standard dovrebbero essere analizzati almeno in duplicato.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
C	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 TB1	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
G	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

**Figura 2. Layout consigliato della piastra ELISA.** S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4). 1N (Campione 1. Controllo plasma Nil), 1 TB1 (Campione 1. plasma TB1), 1 TB2 (Campione 1. plasma TB2), 1M (Campione 1. Plasma Mitogen).

9. Coprire la piastra ELISA e miscelare con cura il coniugato e i campioni di plasma/gli standard su un agitatore per micropiastre per 1 minuto a 500–1000 rpm. Evitare spruzzi.
10. Coprire la piastra ELISA e incubare a temperatura ambiente ( $22 \pm 5^\circ\text{C}$ ) per  $120 \pm 5$  minuti. Non esporre la piastra ELISA alla luce solare diretta durante l'incubazione. La mancata osservanza dell'intervallo di temperatura specificato può comportare risultati errati.
11. Durante l'incubazione della piastra ELISA, preparare il tampone di lavaggio pronto per l'uso. 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 20X fornito è sufficiente per preparare 2 litri di tampone di lavaggio pronto per l'uso.

12. Al termine dell'incubazione della piastra ELISA, lavare i pozzetti della piastra ELISA con 400 µl di tampone di lavaggio pronto per l'uso. Eseguire la fase di lavaggio almeno 6 volte. Per motivi di sicurezza, si consiglia di utilizzare un sistema di lavaggio automatico durante la manipolazione dei campioni di plasma.

Per ottenere prestazioni ottimali dell'esame, 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 ciclo di 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.

13. Per rimuovere i residui del tampone di lavaggio, dare dei colpetti alla piastra ELISA capovolta su un panno assorbente senza pelucchi. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato enzimatico in ogni pozzetto della piastra, coprire la piastra e miscelare con cura con un per 1 minuto a 500–1000 rpm con un agitatore per micropiastre.
14. Coprire la piastra ELISA e incubare a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) per 30 minuti. Non esporre la piastra ELISA alla luce solare diretta durante l'incubazione.
15. Dopo l'incubazione di 30 minuti, aggiungere 50 µl di soluzione di arresto enzimatico in ciascun pozzetto della piastra nello stesso ordine in cui è stato aggiunto il substrato e miscelare con cura con un agitatore per micropiastre a 500–1000 rpm.
16. Misurare la densità ottica (Optical Density, OD) di ogni pozzetto della piastra ELISA 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 di densità ottica (Optical Density, OD) vengono utilizzati per calcolare i risultati.

## Risultati (calcoli)

QFT-Plus Analysis Software può essere utilizzato per analizzare i dati grezzi e calcolare i risultati. È disponibile all'indirizzo [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Assicurarsi di utilizzare la versione più aggiornata del QFT-Plus Analysis Software.

Il software effettua un controllo della qualità dell'esame, genera una curva standard e fornisce un risultato del test per ogni paziente, come illustrato nella sezione "Interpretazione dei risultati" a pagina 30. Il software riporta tutte le concentrazioni superiori a 10 UI/ml come ">10", poiché tali valori non rientrano nell'intervallo lineare convalidato dell'ELISA.

In alternativa all'uso del QFT-Plus Analysis Software, per determinare i risultati è possibile adottare il metodo descritto di seguito.

## Generazione della curva standard e dei valori del campione

### Se non viene utilizzato QFT-Plus Analysis Software

La determinazione della curva standard e la determinazione dei valori UI/ml del campione richiedono un programma di foglio di calcolo, ad es. Microsoft® Excel®, se non si usa il QFT-Plus Analysis Software.

### Utilizzo di un programma di foglio di calcolo

1. Determinare i valori medi di OD dei replicati dello standard del kit su ogni piastra.
2. Costruire una curva standard  $\log_{(e)}\text{-}\log_{(e)}$  tracciando il  $\log_{(e)}$  dell'OD media (asse y) rispetto al  $\log_{(e)}$  della concentrazione IFN- $\gamma$  in UI/ml (asse x), omettendo da questi calcoli lo standard zero. Calcolare la bontà di adattamento della curva standard mediante l'analisi di 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 software di foglio di calcolo o statistici (ad es. Microsoft Excel). Si consiglia di utilizzare questi pacchetti per calcolare l'analisi di regressione, il coefficiente di variazione (%CV) degli standard e il coefficiente delle correlazioni ( $r$ ) della curva standard.

## Calcolo del campione

Se si ottenessero le seguenti letture della densità ottica (Optical Density, OD) per gli standard, i calcoli che utilizzano  $-\log(e)$  seguirebbero quelli in Tabella 2.

Tabella 2. Curva standard

Standard	UI/ml	Valori densità ottica (Optical Density, OD) a e b	Densità ottica (Optical Density, OD) media	%CV	Log <sub>(e)</sub> UI/ml	Log <sub>(e)</sub> medio densità ottica (Optical Density, OD)
Standard 1	4	1,089, 1,136	1,113	3,0	1,386	0,107
Standard 2	1	0,357, 0,395	0,376	7,1	0,000	-0,978
Standard 3	0,25	0,114, 0,136	0,125	NA	-1,386	-2,079
Standard 4	0	0,034, 0,037	0,036	NA	NA	NA

L'equazione della curva è  $y = 0,7885(X) - 0,9837$ , dove "m" = 0,7885 e "c" = -0,9837. Questi valori vengono utilizzati nell'equazione  $X = (Y-c)/m$  per risolvere X. Sulla base della curva standard, il coefficiente delle correlazioni calcolato ( $r$ ) = 1,000. NA: Non applicabile.

Utilizzando i criteri specificati in "Controllo della qualità del test", pagina 28, è determinata la validità dell'esame.

La curva standard (Tabella 2) viene utilizzata per convertire le risposte densità ottica (Optical Density, OD) dell'antigene in Unità Internazionali (UI/ml).

Tabella 3. Calcolo del campione

Antigene	Valore densità ottica (Optical Density, OD)	Log <sub>(e)</sub> valore densità ottica (Optical Density, OD)	X	e <sup>X</sup> (UI/ml)	Antigene-Nil (UI/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	–
TB1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,16
TB2	1,356	0,305	1,634	5,12	5,07
Mitogen	1,783	0,578	1,981	7,25	7,20

I valori dell'IFN- $\gamma$  (in UI/ml) per TB1, TB2 e Mitogen vengono corretti per il rumore di fondo, sottraendo il valore UI/ml ottenuto per il rispettivo controllo Nil. Questi valori corretti vengono utilizzati per l'interpretazione dei risultati del test.

## 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 medio della densità ottica (Optical Density, OD) dello Standard 1 deve essere  $\geq 0,600$ .
- Il %CV dei valori dei replicati per Standard 1 e Standard 2 deve essere  $\leq 15\%$ .
- I valori della densità ottica (Optical Density, OD) dei replicati per Standard 3 e Standard 4 non devono discostarsi di oltre 0,040 unità densità ottica (Optical Density, OD) dalla loro media.
- Il coefficiente delle correlazioni ( $r$ ) calcolato a partire dai valori medi di assorbanza degli standard deve essere  $\geq 0,98$ .
- Se i criteri summenzionati non vengono soddisfatti, il test non è valido e va ripetuto.

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

Il QFT-Plus Analysis Software calcola e documenta questi parametri di controllo della qualità.

Ciascun laboratorio deve determinare i tipi appropriati di materiali di controllo e la frequenza dei test in conformità con le organizzazioni di accreditamento locali, statali, federali o di altro tipo. Dovrebbero essere prese in considerazione una valutazione esterna della qualità e procedure di convalida alternative.

Nota: i plasmi addizionati con IFN- $\gamma$  ricombinante hanno mostrato riduzioni fino al 50% della concentrazione se conservati a 2–8°C e -20°C. L'IFN- $\gamma$  ricombinante non è raccomandato per stabilire standard di controllo.

# Interpretazione dei risultati

I risultati del test QFT-Plus sono interpretati rispettando i criteri descritti di seguito (Tabella 4).

Importante: per confermare o escludere la diagnosi di tubercolosi e per valutare la probabilità di LTBI 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-Plus. Vedere le linee guida generali sulla diagnosi e il trattamento della tubercolosi e della LTBI:

(<https://www.cdc.gov/tb/publications/guidelines/default.htm>).

Tabella 4. Interpretazione dei risultati del test QFT-Plus

Nil (UI/ml)	TB1 meno Nil (UI/ml)	TB2 meno Nil (UI/ml)	Mitogen meno Nil (UI/ml)*	Risultato del QFT-Plus	Report/Interpretazione
≤8,0	≥0,35 e ≥25% di Nil	Qualsiasi	Qualsiasi	Positivo <sup>†</sup>	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> probabile
	Qualsiasi	≥0,35 e ≥25% di Nil			
	<0,35 o ≥0,35 e <25% di Nil	<0,35 o ≥0,35 e <25% di Nil	≥0,50	Negativo	Infezione da <i>M. tuberculosis</i> NON probabile
	<0,35 o ≥0,35 e <25% di Nil	<0,35 o ≥0,35 e <25% di Nil	<0,50	Indeterminato <sup>‡</sup>	Non è possibile determinare la probabilità di infezione da <i>M. tuberculosis</i>
> 8,0 <sup>§</sup>	Qualsiasi				

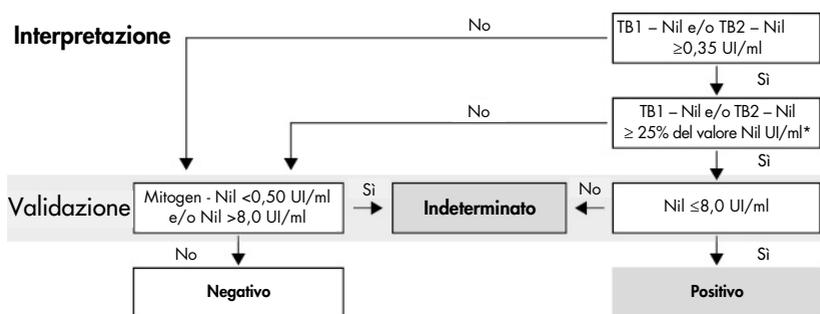
\* Le risposte al controllo positivo Mitogen (e occasionalmente agli antigeni TB) possono essere al di fuori dell'intervallo del lettore per micropiastre. Ciò non influenza i risultati del test. Il software QFT-Plus segnala i valori >10 UI/ml come >10 UI/ml.

<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 QFT-Plus ELISA. Se i test ripetuti su uno o entrambi i replicati generano un risultato positivo, il risultato del test deve essere considerato positivo.

<sup>‡</sup> Per le possibili cause consultare "Guida alla risoluzione dei problemi", pagina 66.

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

L'ampiezza del livello di IFN- $\gamma$  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. Una risposta positiva per TB nei soggetti negativi per il controllo Mitogen è rara ma è stata riscontrata in alcuni pazienti affetti da tubercolosi. Ciò indica che la risposta dell'IFN- $\gamma$  agli antigeni TB è più forte della risposta al controllo Mitogen, il che è possibile in quanto il livello del Mitogen non simula al massimo la produzione dell'IFN- $\gamma$  da parte dei linfociti.



**Figura 3. Interpretazione del test QFT-Plus.** \* Affinché il valore TB1 meno Nil o TB2 meno Nil sia valido,  $\geq 25\%$  del valore Nil UI/ml deve provenire dalla stessa provetta del risultato originale  $\geq 0,35$  UI/ml.

## Limitazioni

I risultati del test QFT-Plus 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 Nil maggiori di 8 UI/ml sono classificati come "Indeterminati" in quanto una risposta più alta del 25% agli antigeni TB potrebbe non rientrare nell'intervallo di misurazione dell'esame.

- Il valore predittivo di un risultato del QFT-Plus positivo nella diagnosi di infezioni da *M. tuberculosis* dipende dalla probabilità di infezione, valutata da dati storici, epidemiologici, diagnostici e di altro tipo.
- Una diagnosi di LTBI necessita l'esclusione della tubercolosi conclamata tramite valutazione medica, che includa una valutazione dei test medici e diagnostici attuali per la malattia, come indicato.
- Un risultato negativo deve essere considerato con i dati medici e storici dell'individuo relativi alla probabilità di infezione da *M. tuberculosis* e al potenziale rischio di progressione in tubercolosi conclamata, in particolare per gli individui con funzione immunitaria compromessa.

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

- mancata osservanza della procedura descritta nelle Istruzioni per l'uso
- Trasporto/manipolazione scorretti del campione di sangue
- Livelli elevati di IFN- $\gamma$  in circolo o presenza di anticorpi eterofili
- Superamento dei tempi del sangue convalidati dal prelievo del campione di sangue all'incubazione. Fare riferimento a *Istruzioni per l'uso delle QFT-Plus Blood Collection Tubes* (1123668).

# Caratteristiche delle prestazioni

## Studi clinici

Dal momento che non esiste un test standard definitivo che consente di confermare o escludere la diagnosi di LTBI, non è sostanzialmente possibile fare una stima della sensibilità e della specificità di QFT-Plus. La specificità di QFT-Plus 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 soggetti con TB attiva confermata tramite coltura. Inoltre, le prestazioni dell'esame sono state valutate per il tasso di positività e negatività in una popolazione di soggetti sani con fattori di rischio identificati per l'infezione da tubercolosi (una popolazione a rischio misto).

## Specificità

Uno studio multicentrico per la valutazione della specificità clinica di QFT-Plus è stato condotto su 733 soggetti considerati a basso rischio di infezione da *M. tuberculosis* o senza fattori di rischio per l'esposizione all'infezione o alla malattia. I dati anagrafici e i fattori di rischio per l'esposizione alla TB sono stati determinati utilizzando un sondaggio standardizzato al momento dell'esecuzione dei test. Lo studio è stato condotto in quattro centri indipendenti: uno negli Stati Uniti, due in Giappone e uno in Australia. Il test QFT-Plus è stato confrontato con il test QuantiFERON-TB Gold-In-Tube (QFT). Nella Tabella 5 è riportata una sintesi dei dati delle prestazioni relative alla specificità clinica, stratificati per sito di studio e regione. I risultati delle prestazioni su basano sul numero totale di test validi. Non vi erano risultati indeterminati.

Tabella 5. Specificità di QFT-Plus in una popolazione a basso rischio

Sito	N	Positivo		Negativo		Indeterminato		Specificità (IC 95%)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Stati Uniti									
(#1) USA-4	212	2	4	210	208	0	0	99,06% (210/212) (96,63– 99,74)	98,11% (208/212) (95,25– 99,26)
Giappone									
(#2) JPN-3	106	1	2	105	104	0	0	99,06% (105/106) (94,85– 99,83)	98,11% (104/106) (93,38– 99,48)
(#3) JPN-1	216	3	5	213	211	0	0	98,61% (213/216) (96,00– 99,53)	97,69% (211/216) (94,70– 99,01)
Totale Giappone	322	4	7	318	315	0	0	98,76% (318/322) (96,85– 99,52)	97,83% (315/322) (95,6–98,9)
Australia									
(#4) AU-3	199	8	9	191	190	0	0	95,98% (191/199) (92,27– 97,95)	95,48% (190/199) (91,63– 97,60)

La specificità di QFT-Plus era del 98,11% negli Stati Uniti, del 97,83% in Giappone e del 95,48% in Australia. La specificità complessiva di QFT-Plus era del 97,27% (713/733). La specificità di QFT era del 99,06% negli Stati Uniti, del 98,76% in Giappone e del 95,98% in Australia. La specificità complessiva QFT era del 98,09% (719/733).

Per fornire un esempio dei risultati attesi in una popolazione a basso rischio, viene mostrata una suddivisione dei risultati per tipo di provetta di antigene TB e relative combinazioni (Tabella 6).

Tabella 6. Risultati dello studio di specificità di QFT-Plus suddivisi per provetta di antigene TB

Interpretazione basata su antigene TB Nil				
UI/ml in	TB1	TB2	QFT-Plus (positivo per TB1 e/o TB2)*	TB1 e TB2 positivi concordanti (analisi alternata)†
Positivo	10	18	20	8
Negativo	723	715	713	725
Indeterminato	0	0	0	0
Specificità (IC 95%)	–	–	97,3% (713/733) (95,8–98,2)	–
Tasso di negatività (IC 95%)	98,6% (723/733) (97,5–99,3)	97,5% (715/733) (96,2–98,4)	–	98,9% (725/733) (97,9–99,5)

\* Interpretazione basata su un valore antigene TB – Nil  $\geq 0,35$  UI/ml in entrambe (TB1 e TB2) o una delle provette, per soddisfare i criteri di interpretazione perché QFT-Plus (TB1 o TB2) risulti positivo.

† Analisi alternata fornita a solo scopo informativo.

Nei soggetti a basso rischio di infezione da TB, un totale di 20/733 ha riportato un risultato positivo. Di questi, solo 8 soggetti hanno riportato un valore  $>0,35$  UI/ml sia nella provetta TB1 che TB2. Un confronto tra gli esami QFT e QFT-Plus è stato effettuato nella coorte dello studio a basso rischio e ha mostrato una concordanza complessiva del 97,5% (715/733) e una concordanza percentuale di negatività del 98,3% (707/719).

## Sensibilità

Sebbene non esista un test standard definitivo per l'infezione tubercolare latente (LTBI), la coltura microbiologica del batterio *M. tuberculosis* rappresenta un valido surrogato, in quanto l'infezione da TB è un precursore necessario per la malattia.

Uno studio multicentrico sulla valutazione della sensibilità clinica di QFT-Plus è stato condotto su 434 soggetti che presentavano segni e sintomi di malattia da *M. tuberculosis* confermata tramite coltura e/o PCR, non in trattamento per TB o con  $\leq 14$  giorni di trattamento prima del prelievo ematico. Lo studio è stato condotto in 7 centri indipendenti: tre negli Stati Uniti, tre in Giappone e uno in Australia. Il test QFT-Plus è stato confrontato con il test QuantiFERON-TB Gold in Tube (QFT). Nella Tabella 7 è riportata una sintesi dei dati delle prestazioni relativi alla sensibilità clinica, stratificati per sito di studio e Paese. I risultati delle prestazioni su basano sul numero totale di test validi. La frequenza dei risultati indeterminati per QFT e QFT-Plus era rispettivamente del 2,3% (10/434) e del 2,5% (11/434).

Tabella 7. Sintesi delle prestazioni dello studio di sensibilità clinica stratificato per sito, Paese e complessiva

Sito	N	Positivo		Negativo		Indeterminato		Sensibilità (IC 95%)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
Stati Uniti									
(#1) USA-5	15	13	13	2	2	0	0	86,67% (13/15) (62,12– 96,26)	86,67% (13/15) (62,12– 96,26)
(#2) USA-1	33	29	29	4	4	0	0	87,88% (29/33) (72,67– 95,18)	87,88% (29/33) (72,67– 95,18)
(#3) USA-4	5	5	5	0	0	0	0	100,0% (5/5) (56,55– 100,0)	100,0% (5/5) (56,55– 100,0)
Totale Stati Uniti	53	47	47	6	6	0	0	88,7% (47/53) (77,4–94,7)	88,7% (47/53) (77,4–94,7)
Giappone									
(#4) JPN-2	76	72	67	1	3	3	6	98,63% (72/73) (92,64– 99,76)	95,71% (67/70) (88,14– 98,53)
(#5) JPN-3	99	97	98	2	1	0	0	97,98% (97/99) (92,93– 99,44)	98,99% (98/99) (94,50– 99,82)

La tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della tabella dalla pagina precedente

**Tabella 7. Sintesi delle prestazioni dello studio di sensibilità clinica stratificato per sito, Paese e complessiva (continua)**

Sito	N	Positivo		Negativo		Indeterminato		Sensibilità (IC 95%)	
		QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus	QFT	QFT-Plus
(#6) JPN-1	177	159	157	12	15	6	5	92,98% (159/171) (88,14– 95,94)	91,28% (157/172) (86,11– 94,64)
Totale Giappone	352	328	322	15	19	9	11	95,63% (328/343) (92,91– 97,33)	94,43% (322/341) (91,5–96,4)
Australia									
(#7) AU-2	29	27	29	1	0	1	0	96,43% (27/28) (82,29– 99,37)	100,0% (29/29) (88,30– 100,0)

L'analisi nella tabella qui sopra non include i risultati indeterminati.

La sensibilità di QFT-Plus era dell'88,7% negli Stati Uniti, del 94,43% in Giappone e del 100,0% in Australia. La sensibilità complessiva di QFT-Plus era del 94,09% (398/423). La sensibilità di QFT era dell'88,7% negli Stati Uniti, del 95,63% in Giappone e del 96,43% in Australia. La sensibilità complessiva di QFT era del 94,81% (402/424).

Per fornire un esempio dei risultati attesi in una popolazione con infezione da TB confermata, viene mostrata una suddivisione dei risultati per tipo di provetta di antigene TB e combinazioni di provette (Tabella 8).

Tabella 8. Risultati dello studio di sensibilità di QFT-Plus suddivisi per provetta di antigene TB

Interpretazione basata su Antigene TB-Nil in UI/ml	QFT-Plus (positivo per TB1 e/o TB2)		
	TB1	TB2	
Positivo	388	397	398
Negativo	32	26	25
Indeterminato	14	11	11
Sensibilità* (IC 95%)	–	–	94% (398/423) (91,4–96,0)
Tasso di positività* (IC 95%)	92,4% (388/420) (89,4–94,6)	93,9% (397/423) (91,1–95,8)	–

\* Esclusi valori indeterminati.

Un confronto degli esami QFT e QFT-Plus è stato valutato nella coorte di TB attiva confermata da coltura (coorti dello studio sulla sensibilità) e ha mostrato una concordanza complessiva del 95,9% e una concordanza percentuale di positività del 97,3% (391/402).

Tabella 9. Quozienti di probabilità di QFT-Plus

Sito*	Sensibilità	Specificità	QP+	QP-
Australia	100,00%	95,48%	22,11	0,00
Giappone	94,43%	97,83%	43,44	0,06
Stati Uniti	88,68%	98,11%	47,00	0,12

\* Totale

## Prestazioni in soggetti con fattori di rischio identificati per un'infezione da MTB (individui a rischio misto)

Una coorte di 601 soggetti con fattori di rischio misto per l'infezione da TB (ad es. positività all'HIV, precedente trattamento di TB attiva o latente, esposizione a casi di TB attiva, stato HCW, ecc.) è stata valutata sia con il test QFT che con il test QFT-Plus. I fattori di rischio sono stati identificati utilizzando un sondaggio standardizzato e i soggetti non mostravano sintomi associati a una TB attiva al momento del reclutamento. I dati demografici e i fattori di rischio sono riportati nella Tabella 10. In questa popolazione 68 soggetti su 601 (11,3%) hanno riportato un risultato QFT-Plus positivo, con una concordanza percentuale di positività (Positive Percent Agreement, PPA) e una concordanza percentuale di negatività (Negative Percent Agreement, NPA) rispettivamente del 98,44% e del 99,07% (Tabella 11). In questa coorte di 68 soggetti con QFT-Plus positivo, un totale di 62 soggetti è risultato positivo per TB1 e TB2, 2 soggetti sono risultati positivi solo per TB1 e 4 solo per TB2. Non sono stati osservati risultati indeterminati (0/601).

**Tabella 10. Dati demografici e fattori associati a rischio di infezione da TB in una coorte mista**

Totale soggetti (601)		Numero	Percentuale
Sesso	Maschile	539	89,7%
	Femminile	62	10,3%
Età (anni)	Intervallo	18-70	-
	Media	46,7	-
Vaccinazione BCG	Sì	15	2,5%
	No	586	97,5%
HIV positivo o test positivo per virus HTLV	Sì	12	2,0%
	No	589	98%
Precedente diagnosi di TB attiva	Sì	11	1,8%
	No	590	98,2%
Test cutaneo tubercolinico (TST)/Test di Mantoux positivo per TB	Sì	47	7,8%
	No	554	92,2%
Precedente trattamento per TB attiva o latente	Sì	35	5,8%
	No	566	94,2%
Vissuto, lavorato o fatto volontariato (>1 mese) in carcere o prigione	Sì	373	62,1%
	No	228	37,9%
Vissuto, lavorato o fatto volontariato (>1 mese) in rifugio per senzatetto	Sì	525	87,4%
	No	76	12,6%
Operatore sanitario	Sì	8	1,3%
	No	593	98,7%
Stretto contatto con persona affetta da o con sospetto di TB attiva	Sì	9	1,5%
	No	592	98,5%

**Tabella 11. Prestazioni in sintesi di QFT-Plus vs QFT in soggetti con fattori di rischio noti per infezione da TB latente**

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

\*Tutti e 6 i campioni discordanti avevano livelli di IFN- $\gamma$  delle provette con antigene TB vicini al cut-off dell'esame.

La concordanza percentuale di positività (PPA) e la concordanza percentuale di negatività (NPA) tra i risultati di QFT e QFT-Plus erano le seguenti:

- PPA: 98,44% (63/64), IC 95% (91,67, 99,72)
- NPA: 99,07% (532/537), IC 95% (97,84, 99,60)

La Tabella 12 di seguito illustra le prestazioni di QFT-Plus a confronto con il test QFT in soggetti dello studio vaccinati con BCG.

**Tabella 12. Prestazioni di QFT-Plus a confronto con il test QFT in soggetti vaccinati con BCG (dati combinati da soggetti degli studi su sensibilità, specificità e LTBI)**

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

\* Due soggetti dello studio sulla sensibilità sono stati esclusi dall'analisi per via di risultati indeterminati

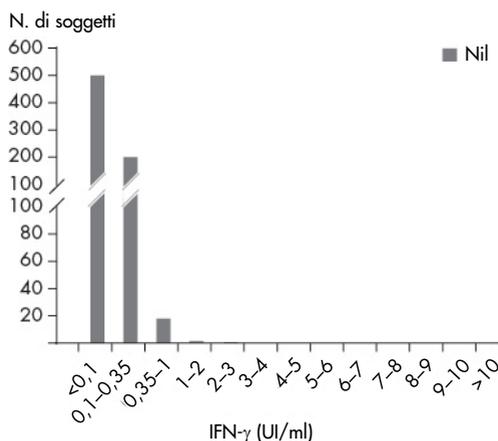
- PPA = 95,6% (66/69), IC 95% (87,98, 98,51)
- NPA = 98,2% (268/273), IC 95% (95,79, 99,22)

## Valori previsti

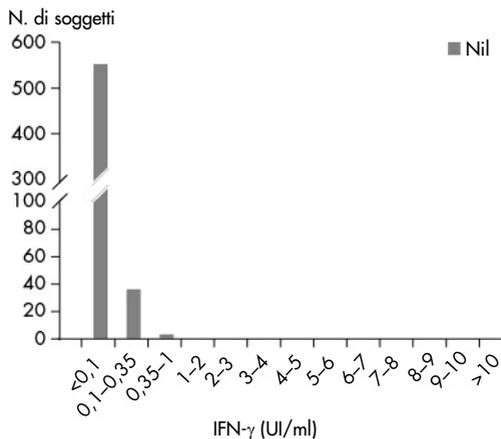
### Distribuzioni della risposta osservata — stratificazione del rischio

Le diverse risposte dell'IFN- $\gamma$  agli antigeni TB1, TB2 e al controllo che sono state osservate nei trial clinici, sono state stratificate in base al rischio di infezione da *M. tuberculosis* (Dalla figura 4 alla Figura 7). Il gruppo a rischio misto comprende soggetti che sono rappresentativi di una popolazione generale di screening, che include soggetti con e senza fattori di rischio relativamente all'esposizione alla TB e con basse probabilità di TB attiva (cioè LTBI).

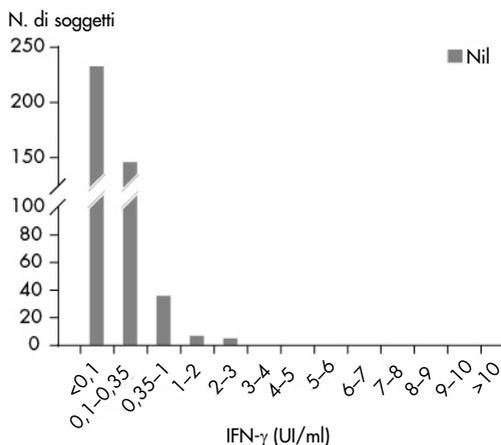
A



B

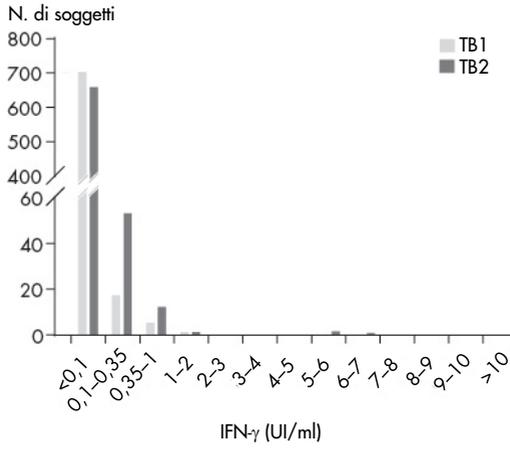


C

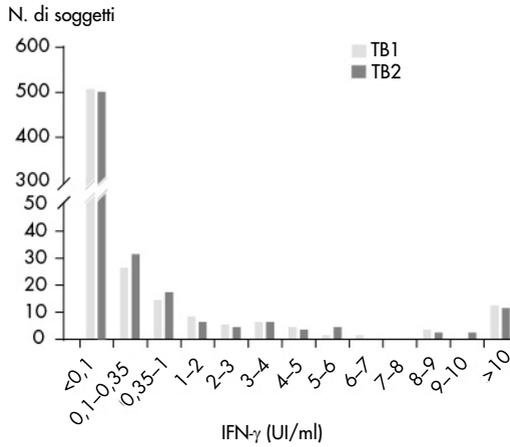


**Figura 4. Distribuzione di risultati Nil.** A Distribuzione di risultati Nil in una popolazione a basso rischio (n=744). B Distribuzione di risultati Nil in una popolazione a rischio misto (n=601). C Distribuzione di risultati Nil in una popolazione con infezione da *M. tuberculosis* confermata tramite coltura (n=416).

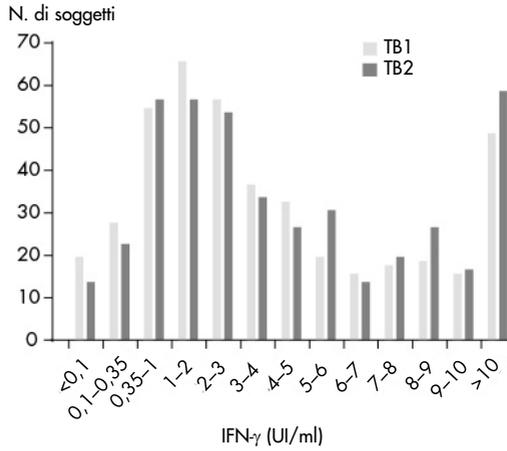
A



B

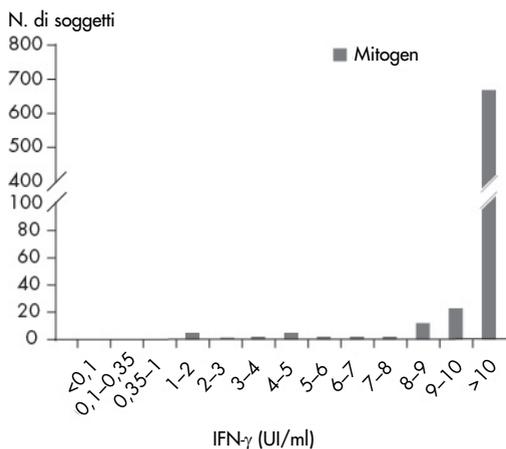


C

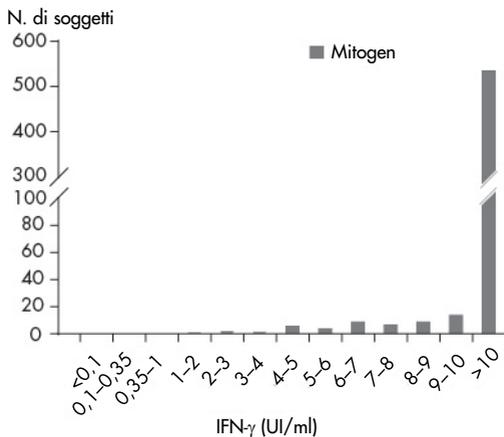


**Figura 5. Distribuzione di TB1 e TB2 (meno Nil).** A Distribuzione di risultati TB1 e TB2 (meno Nil) in una popolazione a basso rischio (n=744). B Distribuzione di risultati TB1 e TB2 (meno Nil) in una popolazione a rischio misto (n=601). C Distribuzione dei risultati TB1 e TB2 (meno Nil) in una popolazione con infezione da *M. tuberculosis* confermata tramite coltura (n=416).

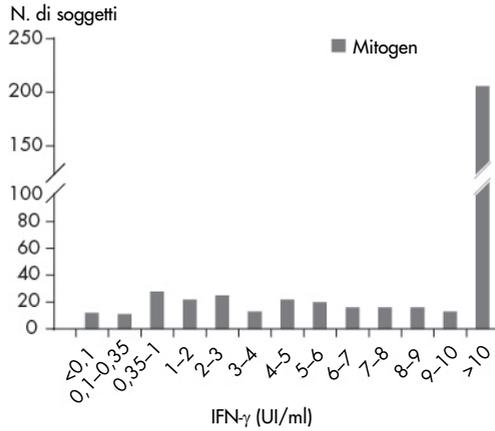
A



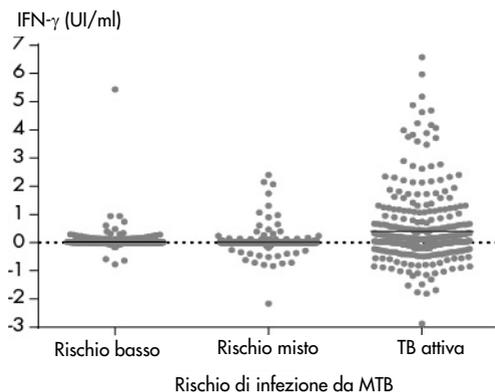
B



C



**Figura 6. Distribuzione dei risultati per Mitogen (meno Nil).** **A** Distribuzione dei risultati per Mitogen (meno Nil) in una popolazione a basso rischio (n=744). **B** Distribuzione dei risultati per Mitogen (meno Nil) in una popolazione a rischio misto (n=601). **C** Distribuzione dei risultati per Mitogen (meno Nil) in una popolazione con infezione da *M. tuberculosis* confermata tramite coltura (n=415).



**Figura 7. Differenza osservata tra i valori TB1 e TB2 (meno Nil), stratificati in base al rischio.** Include dati dallo studio con coorte a rischio misto per mostrare le differenze tra coorte a basso rischio, a rischio attivo e a rischio misto. Questa analisi dei dati include una coorte a rischio misto con fattori di rischio noti. Pertanto, dalla coorte a basso rischio n=733, dalla coorte a rischio misto n=588 e dalla coorte con TB attiva n=357. La differenza quantitativa in UI/ml per ogni soggetto è stata ottenuta sottraendo il valore TB1 dal valore TB2.

## Riepilogo di sicurezza e prestazioni

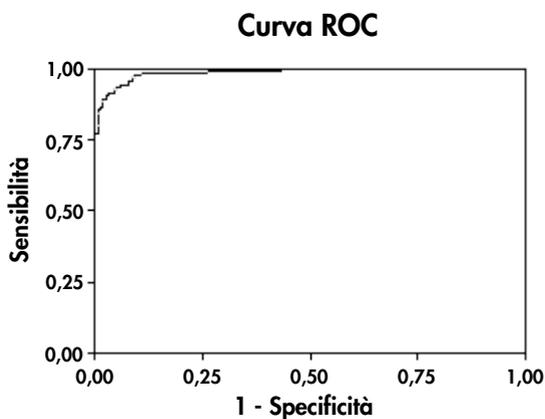
Il riepilogo di sicurezza e prestazioni è disponibile sul sito web di EUDAMED.

# Caratteristiche delle prestazioni dell'esame

## Prestazioni analitiche

### Valore limite dell'esame

Il cut-off dell'esame QFT-Plus è stato determinato utilizzando dati da 216 soggetti senza fattori di rischio identificati per l'esposizione alla TB, vaccinati con BCG e presumibilmente non infetti e 118 soggetti con infezione da *M. tuberculosis* confermata tramite coltura. I dati di sensibilità e specificità sono stati combinati e analizzati mediante analisi della curva ROC (Receiver Operator Characteristic). I dati di sensibilità e specificità analizzati utilizzando l'analisi ROC hanno dimostrato che il cut-off ELISA ottimale era di 0,35 UI/ml (vedere la Figura 8).



**Figura 8.** Curva ROC per le risposte ESAT-6 e CFP-10.

**Tabella 13. Valori di sensibilità e specificità per ELISA a vari cut-off**

Cutoff UI/ml IFN- $\gamma$	Sensibilità %	IC 95%	Specificità %	IC 95%	Sensibilità + specificità
0,20	91,53	84,97%– 95,86%	96,31	92,87%– 98,40%	187,84
0,23	91,53	84,97%– 95,86%	96,77	93,47%– 98,69%	188,30
0,26	90,68	83,93%– 95,25%	96,77	93,47%– 98,69%	187,45
0,28	90,68	83,93%– 95,25%	97,24	94,08%– 98,98%	187,92
0,30	89,83	82,91%– 94,63%	97,24	94,08%– 98,98%	187,07
0,31	88,98	81,90%– 94,00%	97,24	94,08%– 98,98%	186,22
0,33	88,98	81,90%– 94,00%	97,70	94,71%– 99,25%	186,68
0,35	88,98	81,90%– 94,00%	98,16	95,35%– 99,50%	187,14
0,39	88,14	80,90%– 93,36%	98,16	95,35%– 99,50%	186,3
0,42	87,29	79,90%– 92,71%	98,16	95,35%– 99,50%	185,45
0,43	86,44	78,92%– 92,05%	98,16	95,35%– 99,50%	184,6
0,45	86,44	78,92%– 92,05%	98,62	96,01%– 99,71%	185,06

La tabella continua alla pagina seguente

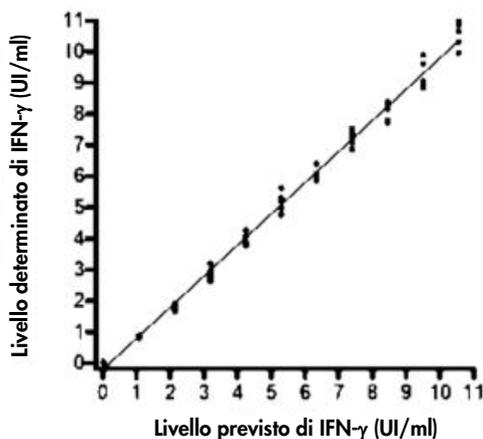
Continuazione della tabella dalla pagina precedente

**Tabella 13.** Valori di sensibilità e specificità per ELISA a vari cut-off

Cutoff UI/ml IFN- $\gamma$	Sensibilità %	IC 95%	Specificità %	IC 95%	Sensibilità + specificità
0,47	85,59	77,94%– 91,38%	99,08	96,71%– 99,89%	184,67
0,48	84,75	76,97%– 90,70%	99,08	96,71%– 99,89%	183,83
0,50	83,90	76,00%– 90,02%	99,08	96,71%– 99,89%	182,98

## Linearità

La linearità del QFT-Plus 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 delle correlazioni di 0,99 (Figura 9).



**Figura 9.** Illustrazione dell'analisi di regressione dello studio di linearità – Media pool alto =  $-0,24 + 0,9964 \cdot \text{Previsto}$ .

## Riproducibilità

È stato condotto uno studio di riproducibilità dello studio multicentrico per valutare le prestazioni di QFT-Plus nei siti di studio con più operatori. Si trattava di uno studio prospettico condotto presso tre centri di test esterni e un sito di raccolta. È stato reclutato un totale di 32 soggetti positivi e 34 negativi (determinato dal test QFT). I soggetti erano operatori sanitari negli Stati Uniti. I soggetti rappresentavano gruppi con rischio misto per l'esposizione alla TB per via della loro professione o in quanto operatori sanitari nati all'estero in aree con un tasso di TB superiore a 50/100.000.

Da ciascun soggetto dello studio sono state ottenute tre provette di raccolta del sangue con eparina di litio presso il sito di raccolta. Le provette di raccolta di sangue con eparina di litio sono quindi state trasferite a ognuno dei tre centri di test, dove sono state aliquotate in due set di QFT-Plus Blood Collection Tubes (QFT-Plus TB1, TB2, Mitogen e Nil), quindi testate come da procedura dell'esame QFT-Plus. Presso ciascun sito, almeno due operatori hanno condotto i due test per ogni soggetto indipendentemente. Ciascun operatore era in cieco rispetto ai risultati ottenuti dall'altro operatore e in cieco rispetto ai risultati del test QFT del soggetto dello studio.

Sono stati generati sei risultati in tutti e tre i siti di test per ciascuno dei 66 soggetti dello studio, per un totale di 396 punti dati. Un riepilogo dei risultati di riproducibilità è fornito nella Tabella 14.

**Tabella 14. Riepilogo dei risultati dello studio di riproducibilità – % di concordanza all'interno del sito dei risultati qualitativi tra gli operatori; N = 66 campioni di paziente**

Sito 1 – 2 operatori	Sito 2 – 2 operatori	Sito 3 – 3 operatori
$64/66 = 96,97\%$	$64/66 = 96,97\%$	$59/66 = 89,39\%$
Concordanza dei risultati qualitativi del set di provette 1 e set di provette 2	Concordanza dei risultati qualitativi del set di provette 1 e set di provette 2	Concordanza dei risultati qualitativi del set di provette 1 e set di provette 2

La concordanza percentuale qualitativa in tutti i siti di studio è del 94,7% (375/396). In questo calcolo, il numero totale dei risultati dei test in concordanza (375) include i casi in cui vi è concordanza di tutti e 6 i risultati, concordanza di 5 risultati su 6, concordanza di 4 risultati su 6 e concordanza di 3 risultati su 6, combinati.

## Ripetibilità tra lotti

È stato condotto uno studio per determinare la variabilità tra lotti delle QFT-Plus Blood Collection Tubes comparate con le provette QFT. È stato testato un totale di 30 soggetti (15 confermati positivi per TB e 15 confermati negativi per TB, determinato dal test QFT). In questo studio sono stati inclusi tre lotti separati di ciascuna QFT-Plus TB1, TB2 e QFT TB Blood Collection Tubes. Sono stati testati tre replicati per donatore per lotto di provette di raccolta del sangue. Le provette Nil e Mitogen sono state testate con un replicato ciascuna.

Il sangue di ciascun soggetto è stato raccolto in provette di raccolta del sangue con eparina di litio e quindi 1 ml di sangue è stato trasferito in ciascuna delle QFT-Plus Blood Collection Tubes e testato secondo la procedura dell'esame. Per ogni gruppo di campioni positivi e negativi, la varianza totale dei risultati delle QFT-Plus Tubes non doveva essere significativamente maggiore rispetto alla varianza totale dei risultati delle provette QFT. Questo è stato determinato dal valore p dato dal test di omogeneità della varianza (homogeneity of variance, HOV) di Levene. Se il valore p non era significativo ( $p > 0,05$ ) e/o la variazione delle QFT-Plus TB Tubes era inferiore a quella della provetta QFT TB, non vi era varianza tra QFT-Plus Tubes e provette QFT TB.

**Tabella 15. Confronto di varianze tra QFT-Plus e QFT TB Blood Collection Tubes utilizzando il test HOV di Levene**

Tipo di campione	Differenza	Effetto	Dipendente	Valore p	Significativo
Positivo	TB2 vs QFT	Sub_Type	Residuo	0,0378	Si
Positivo	TB2 vs QFT	Sub_Type	Residuo	0,0540	No
Negativo	TB2 vs QFT	Sub_Type	Residuo	0,1025	No
Negativo	TB2 vs QFT	Sub_Type	Residuo	0,6344	No

La variazione tra QFT-Plus e QFT TB Blood Collection Tubes non è stata significativa, ad eccezione della provetta QFT-Plus TB2 quando è stata testata con soggetti positivi. Quando è stata analizzata la stima della deviazione standard, la variazione osservata nella provetta QFT-Plus TB2 è risultata inferiore (0,06089) rispetto alla provetta QFT TB (0,07641), come mostrato nella Tabella 16. Pertanto, la varianza delle provette di raccolta del sangue QFT-Plus TB1 e TB2 non era superiore a quella della QFT TB Blood Collection Tube.

**Tabella 16. Deviazione standard per residuo e intervallo di confidenza al 95% per soggetti positivi**

Tipo di campione	Sottotipo	Stima della deviazione standard	95% LCL	95% UCL
Positivo	QFT	0,07641	0,06826	0,08680
Positivo	TB1	0,06275	0,05605	0,07127
Positivo	TB2	0,06089	0,05439	0,06917

## Ripetibilità intra-lotto

È stato condotto uno studio per valutare la riproducibilità intra-lotto delle QFT-Plus Blood Collection Tubes confrontando la concentrazione di IFN- $\gamma$  da replicati di QFT-Plus TB Blood Collection Tubes di sangue.

Sei aliquote di un campione di sangue provenienti dagli stessi soggetti con infezione da TB confermata sono state analizzate in 6 provette di raccolta del sangue ripetute da un lotto ciascuna di entrambe le QFT-Plus Tubes (TB1 e TB2). Il test è stato condotto su 13 soggetti. Il %CV è stato calcolato per ogni donatore e per tutti i donatori, per generare un %CV medio, come indicato nella Tabella 17.

**Tabella 17. Il %CV per media, deviazione standard, minima, mediana e massima in ogni QFT-Plus TB Blood Collection Tube in soggetti positivi per TB**

Provetta QFT-Plus	Quantità di campione	Media (%CV)	Deviazione standard	Minimo	Mediana	Massimo
TB1	13	13,31	6,88	4,17	12,87	29,56
TB2	13	13,04	7,48	4,86	10,75	29,44

I risultati hanno dimostrato che il %CV medio per TB1 e TB2 era ~13%, soddisfacendo i criteri di accettazione  $\leq 30\%$  e dimostrando la ripetibilità intra-lotto.

### Limite del bianco (Limit of Blank, LoB)

Il limite del bianco (Limit of Blank, LoB) è stato valutato per l'esame QFT-Plus. Due replicati ciascuno di 14 campioni individuali di plasma umano normale (come i bianchi) sono stati testati con 2 lotti di QFT-Plus ELISA da 3 operatori o 3 giorni di test, un operatore per giorno di test per un totale di 84 replicati da ciascun lotto di kit ELISA.

I valori LoB (UI/ml) per i 2 lotti di kit ELISA sono stati calcolati separatamente, come mostrato nella Tabella 18.

**Tabella 18. Valori LoB (UI/ml) per i 2 lotti del QFT-Plus ELISA Kit**

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

Il valore LoB più grande, 0,040 UI/ml, in entrambi i lotti del QFT-Plus ELISA kit, è stato segnalato come valore LoB finale.

## Limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD)

Il limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD) è stato valutato per l'esame QFT-Plus. Un pool di plasma umano negativo per TB è stato generato combinando 14 campioni di plasma individuali. Ciascuno dei 3 operatori ha preparato uno stock standard di riferimento di IFN- $\gamma$  a 1,0 UI/ml diluito in tampone. Sono state effettuate una serie di diluizioni di 8 concentrazioni. Lo studio è stato condotto nell'arco di 3 giorni, da 3 operatori alternati utilizzando 2 lotti di QFT-Plus ELISA kit. Per ogni giorno di test, sono stati testati 5 replicati di ciascuna concentrazione all'interno di ciascun set della serie di diluizioni seriali, per un totale di 45 replicati per ciascuna diluizione della concentrazione di IFN- $\gamma$  per ciascun lotto del QFT-Plus ELISA Kit.

Il valore LoD per ciascuno dei lotti del QFT-Plus ELISA Kit testato è stato calcolato separatamente, come mostrato nella Tabella 19.

**Tabella 19. Valori LoD stimati (UI/ml) per i 2 lotti del QFT-Plus ELISA Kit**

QFT-Plus ELISA Kit	Probabilità	Concentrazione stimata (UI/ $\mu$ l)	Limite di confidenza del 95% inferiore per la stima	Limite di confidenza del 95% superiore per la stima
Kit 1	0,95	0,063	0,060	0,067
Kit 2	0,95	0,065	0,060	0,073

Il valore LoD più grande calcolato su entrambi i lotti del QFT-Plus ELISA Kit, 0,065 UI/ml, è stato riportato come valore LoD finale.

### Sostanze interferenti

È stato condotto uno studio per determinare gli effetti di potenziali sostanze interferenti sulle prestazioni del rilevamento del QFT-Plus ELISA di IFN- $\gamma$ . Gli interferenti inclusi in questo test erano: trigliceridi (totali), emoglobina, proteina (siero totale), bilirubina (coniugata), bilirubina (non coniugata), abacavir solfato, ciclosporina e prednisolone. Cinque pool di plasma con concentrazioni note di IFN- $\gamma$  sono stati preparati utilizzando diverse concentrazioni interferenti. Il livello di IFN- $\gamma$  del pool di base è stato precedentemente preparato con una quantità predeterminata di IFN- $\gamma$  presente (circa 0,21, 0,45 e 1,4 UI/ml). Questo pool è stato quindi utilizzato per preparare i pool interferenti. Le concentrazioni di interferenti testate erano 0 mg/dl, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 15 mg/dl e 20 mg/dl. Le concentrazioni target di interferenti erano basate su intervalli di riferimento, valori patologici, intervalli terapeutici e intervalli di tossicità, oppure come raccomandato dal fornitore o dai livelli clinici generali. Sono stati testati sei replicati per ogni livello di concentrazione del campione interferente.

Per ciascuna concentrazione del campione, è stato eseguito un t-test su due campioni, confrontando la differenza nel log<sub>10</sub> medio (UI/ml) del livello di interferente primario rispetto al controllo (cioè livello privo di interferenti) come mostrato in Tabella 20 e Tabella 21. Sono state riportate anche la differenza stimata nella risposta media, insieme ai limiti di confidenza al 95% bilaterali e al valore p corrispondenti.

**Tabella 20. Log10 UI/ml: Tabella riassuntiva del test T per le differenze nelle medie tra il controllo e il livello dell'interferente primario per ciascun interferente e il livello di concentrazione dell'IFN- $\gamma$**

Interferente	Livello interferente	Concentrazione del campione (UI/ml)	Varianza	Differenza media	IC 95% inferiore	IC 95% superiore	Valore p	OK
Trigliceridi	Alto	1,4	Uguale	0,019	-0,040	0,077	0,491	Sì
		0,45	Uguale	0,004	-0,022	0,030	0,732	Sì
		0,21	Uguale	0,006	-0,035	0,047	0,759	Sì
Emoglobina	Alto	1,4	Uguale	-0,005	-0,42	0,032	0,784	Sì
		0,45	Uguale	-0,000	-0,023	0,023	0,981	Sì
		0,21	Uguale	0,000	-0,034	0,035	0,980	Sì
Proteina	Alto	1,4	Uguale	0,004	-0,034	0,042	0,836	Sì
		0,45	Uguale	0,001	-0,38	0,040	0,962	Sì
		0,21	Uguale	-0,008	-0,076	0,060	0,809	Sì
Bilirubina coniugata	Alto	1,4	Uguale	-0,011	-0,057	0,034	0,589	Sì
		0,45	Uguale	-0,002	-0,058	0,053	0,923	Sì
		0,21	Uguale	-0,014	0,074	0,046	0,625	Sì
Bilirubina non coniugata	Alto	1,4	Uguale	-0,008	-0,041	0,026	0,614	Sì
		0,45	Uguale	-0,000	-0,042	0,041	0,982	Sì
		0,21	Uguale	-0,000	-0,048	0,048	0,989	Sì
Abacavir	Alto	1,4	Uguale	0,008	-0,025	0,041	0,601	Sì
		0,45	Uguale	0,012	-0,019	0,044	0,412	Sì
		0,21	Uguale	-0,006	-0,052	0,040	0,770	Sì

La tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della tabella dalla pagina precedente

Tabella 20. Log<sub>10</sub> UI/ml: Tabella riassuntiva del test T per le differenze nelle medie tra il controllo e il livello dell'interferente primario per ciascun interferente e il livello di concentrazione dell'IFN- $\gamma$

Interferente	Livello interferente	Concentrazione del campione (UI/ml)	Varianze	Differenza media	IC 95% inferiore	IC 95% superiore	Valore p	OK
Ciclosporina	Alto	1,4	Uguale	0,014	-0,020	0,047	0,383	Sì
		0,45	Uguale	0,005	-0,035	0,045	0,773	Sì
		0,21	Uguale	0,024	-0,008	0,056	0,131	Sì
Prednisolone	Alto	1,4	Uguale	0,017	-0,017	0,050	0,293	Sì
		0,45	Uguale	0,000	-0,036	0,036	0,979	Sì
		0,21	Uguale	0,015	-0,035	0,065	0,524	Sì

**Tabella 21. Log10 UI/ml: Tabella riassuntiva dei test T per le differenze nelle medie tra il controllo e il livello di interferente alto per ciascun interferente e livello di concentrazione dell'IFN- $\gamma$**

Interferente	Livello interferente	Concentrazione del campione (UI/ml)	Varianza	Differenza media	IC 95% inferiore	IC 95% superiore	Valore p	OK
Trigliceridi	Alto	1,4	Uguale	0,053	-0,004	0,110	0,063	Sì
		0,45	Uguale	0,039	-0,021	0,058	<0,001	Sì
		0,21	Uguale	0,034	-0,002	0,071	0,061	Sì
Emoglobina	Alto	1,4	Uguale	-0,001	-0,042	0,040	0,967	Sì
		0,45	Uguale	0,016	-0,007	0,040	0,152	Sì
		0,21	Uguale	0,014	-0,030	0,059	0,489	Sì
Proteina	Alto	1,4	Uguale	-0,030	-0,071	0,011	0,136	Sì
		0,45	Uguale	0,000	-0,046	0,046	0,992	Sì
		0,21	Uguale	-0,045	-0,103	0,012	0,109	Sì
Bilirubina coniugata	Alto	1,4	Uguale	0,001	-0,046	0,048	0,961	Sì
		0,45	Uguale	0,012	-0,043	0,067	0,639	Sì
		0,21	Uguale	0,015	-0,044	0,074	0,586	Sì
Bilirubina non coniugata	Alto	1,4	Uguale	0,015	-0,011	0,042	0,231	Sì
		0,45	Uguale	0,015	-0,023	0,052	0,411	Sì
		0,21	Uguale	0,012	-0,033	0,057	0,566	Sì
Abacavir	Alto	1,4	Uguale	0,013	-0,015	0,040	0,322	Sì
		0,45	Uguale	0,015	-0,014	0,044	0,283	Sì
		0,21	Uguale	0,008	-0,034	0,050	0,677	Sì

La tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della tabella dalla pagina precedente

Tabella 21. Log10 UI/ml: Tabella riassuntiva del test T per le differenze nelle medie tra il controllo e il livello di interferente alto per ciascun interferente e livello di concentrazione dell'IFN- $\gamma$

Interferente	Livello interferente	Concentrazione del campione (UI/ml)	Varianza	Differenza media	IC 95% inferiore	IC 95% superiore	Valore p	OK
Ciclosporina	Alto	1,4	Uguale	0,002	-0,019	0,024	0,816	Sì
		0,45	Uguale	0,007	-0,030	0,043	0,682	Sì
		0,21	Uguale	0,015	-0,007	0,038	0,155	Sì
Prednisolone	Alto	1,4	Uguale	0,007	-0,016	0,030	0,518	Sì
		0,45	Uguale	-0,001	-0,034	0,033	0,964	Sì
		0,21	Uguale	0,021	-0,025	0,068	0,334	Sì

I risultati non hanno mostrato differenze significative tra il livello di interferente primario e il controllo (livello privo di interferenti) e per il livello alto di interferente a eccezione del livello di concentrazione di trigliceridi 0,45 UI/ml. La differenza media determinata deve rientrare nell'intervallo di deviazione standard  $\pm 2$ . Ciò dimostra che la differenza rientra nella variabilità attesa dell'esame e che i trigliceridi non hanno avuto effetto di interferenza sul QFT-Plus ELISA.

# Smaltimento

Attenersi alle relative linee guida sulla manipolazione del sangue. Smaltire i campioni e i materiali entrati in contatto con sangue o emoderivati nel rispetto dei regolamenti locali, nazionali e internazionali.

# Bibliografia

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. *Int. J. Infect. Dis.* 12, 645.
3. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. *Ann. Rheum. Dis.* 67, 84.
4. Rothel, J.S., Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: Is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 3, 981.
5. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, 681.
6. Lewinsohn, D.M. et al. (2001) Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigenic specificity. *J. Immunol.* 166, 439.
7. Lewinsohn, D.A. et al. (2007) Immunodominant tuberculosis CD8 antigens preferentially restricted by HLA-B. *PLoS Pathol.* 3, 1240.
8. Barcellini, L. et al. (2016) First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur. Respir. J.* 47, 1587.
9. Day, C.L. et al. (2011) Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J. Immunol.* 187, 2222.

10. Rozot, V. et al. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. Eur. J. Immunol. 43, 1568.
11. Nikolava, M. et al. (2013) Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 75, 277.
12. Chicchio, T. et al. (2014) Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in HIV-infected patients. J. Infect. 69, 533.
13. Ongaya, A. et al. (2013) Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with HIV co-infection. Tuberculosis 93, S60.
14. Lanicioni, C. et al. (2012) CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 185, 206.
15. Mazurek, G.H., et al.; IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection – United States, 2010. MMWR Recomm. Rep. 59, 1.
16. WHO consolidated guidelines on tuberculosis: tuberculosis preventive treatment. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

# Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultare il sito del nostro centro di assistenza tecnica [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) (per informazioni di contatto, visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Commenti e suggerimenti

---

### Risoluzione dei problemi ELISA

#### Sviluppo di colorazione aspecifica

- |   |  |
|---|--|
| a) Lavaggio incompleto della piastra  | Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 µl di tampone di lavaggio per pozzetto. È possibile che siano necessari più di 6 cicli di lavaggio a seconda del sistema di lavaggio utilizzato. È opportuno effettuare un ciclo di 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 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.   |
| e) Miscelazione del plasma nelle QFT-Plus Blood Collection Tubes prima del prelievo | 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.   |

## Commenti e suggerimenti

---

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

- |  |   |
|--|---|
| a) Errore di diluizione dello standard                       | Assicurarsi che le diluizioni dello standard del kit siano preparate correttamente in base a queste istruzioni per l'uso.   |
| 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 ( $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).   |
| d) Periodo 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 deve essere incubata sulla piastra per 30 minuti.        |
| e) Filtro utilizzato per il lettore della piastra non valido | La piastra va letta a 450 nm con un filtro di riferimento compreso tra 620 e 650 nm.  |
| f) Reagenti troppo freddi                                    | Tutti i reagenti, tranne il coniugato concentrato 100x, devono essere portati a temperatura ambiente prima di avviare l'esame. È necessaria circa 1 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. |

### Elevato rumore di fondo

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| a) Lavaggio incompleto della piastra | Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 $\mu\text{l}$ di tampone di lavaggio per pozzetto. Potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio. È opportuno effettuare un ciclo di ammollo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro. |
|--------------------------------------|--|

## Commenti e suggerimenti

---

- |  |   |
|--|---|
| b) Temperatura di incubazione troppo elevata     | L'incubazione del test ELISA dovrebbe avvenire a temperatura ambiente ( $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ).   |
| c) Kit/componenti scaduti                        | Assicurarsi di utilizzare il kit entro la 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

- |   |  |
|---|--|
| a) Lavaggio incompleto della piastra  | Lavare la piastra almeno 6 volte con 400 $\mu\text{l}$ di tampone di lavaggio per pozzetto. Potrebbero essere necessari più di 6 cicli di lavaggio. È opportuno effettuare un ciclo di 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 in base a queste istruzioni per l'uso.  |
| 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 dell'esame | L'aggiunta del campione e dello standard deve avvenire in modo ininterrotto. Tutti i reagenti devono essere preparati prima di iniziare l'esame.   |

# Simboli

I seguenti simboli compaiono nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

## Simbolo

## Definizione del simbolo



<N>

Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni



Data di scadenza



Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.

**EC**

**REP**

Rappresentante autorizzato nella Comunità europea/Unione Europea

**IVD**

Dispositivo medico-diagnostico in vitro

**REF**

Numero di catalogo

**LOT**

Numero di lotto

**MAT**

Numero di materiale (vale a dire, l'etichetta del componente)

**COMP**

Componenti

**CONT**

Contenuto

**NUM**

Numero

**GTIN**

Codice GTIN

Rn

"R" indica la revisione delle Istruzioni per l'uso (manuale) e "n" indica il numero della revisione



Limite di temperatura

## Simbolo

## Definizione del simbolo



Produttore



Consultare le istruzioni per l'uso



Tenere al riparo dalla luce



Avvertenza/Cautela o Cautela, consultare la documentazione allegata

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

Un test diagnostico in vitro che utilizza un cocktail peptidico che simula le proteine ESAT-6 e CFP-10 per stimolare le cellule nel sangue intero eparinizzato



Contiene materiali biologici di origine animale



Contiene materiali biologici di origine umana



UDI (identificatore univoco del dispositivo)

Simbolo

Definizione del simbolo

---

**tartrazine**

Contiene tartrazina

**sulfuric acid**

Contiene acido solforico

# Appendice A: Informazioni tecniche

## Risultati indeterminati

I risultati indeterminati non sono frequenti e possono essere correlati allo stato immunitario del soggetto sottoposto al test (5), ma anche a una serie di fattori tecnici (ad es. manipolazione/conservazione inappropriata delle provette di raccolta del sangue, lavaggio incompleto della piastra ELISA) qualora le istruzioni fin qui fornite non dovessero essere rispettate.

Se si sospettano problemi tecnici riguardanti la conservazione dei reagenti, il prelievo ematico o la manipolazione dei campioni, ripetere l'intero test QFT-Plus con nuovi campioni di sangue. 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. Il medico può 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.

## Campioni di plasma lipemici

Prestare attenzione quando si pipettano campioni lipemici, poiché i depositi di grasso possono bloccare i puntali per pipette.

## Appendice B: Procedura sintetica del test ELISA

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 quattro (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 µl in tutti i pozzetti.



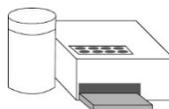
5. Aggiungere 50 µl di campioni di plasma in esame e 50 µl di standard nei pozzetti opportuni. Miscelare con l'agitatore.



6. Incubare per 120 minuti a temperatura ambiente.



7. Lavare i pozzetti almeno 6 volte con 400 µl di tampone di lavaggio per pozzetto.



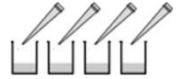
8. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato enzimatico nei pozzetti. Miscelare con l'agitatore.



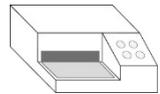
9. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.



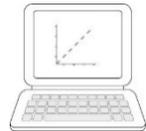
10. Aggiungere 50  $\mu$ l di soluzione di arresto enzimatico a tutti i pozzetti. Miscelare con l'agitatore.



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



12. Analizzare i risultati.



## Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit	Kit ELISA per 2 piastre	622120
QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) Reference Lab Pack	Kit ELISA per 20 piastre	622822
<b>Related products</b>		
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes	200 provette (50 per ciascun Nil, TB1, TB2 e Mitogen)	622526
QuantiFERON-TB Gold Plus Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 provette (25 per ciascun Nil, TB1, TB2 e Mitogen)	622423
QuantiFERON-TB Gold Plus Single Patient Pack	40 provette (1 per ciascun Nil, TB1, TB2 e Mitogen/confezione), confezione da 10	622222
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes	200 provette (50 per ciascun Nil, TB1, TB2 e Mitogen)	623526
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Blood Collection Tubes Dispenser Pack	100 provette (50 per ciascun Nil, TB1, TB2 e Mitogen)	623423
QuantiFERON-TB Gold Plus High Altitude Single Patient Pack	40 provette (1 per ciascun Nil, TB1, TB2 e Mitogen/confezione), confezione da 10	623222

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare le Istruzioni per l'uso del rispettivo kit QIAGEN. Le Istruzioni per l'uso dei kit QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richieste ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

# Cronologia delle revisioni del documento

Data	Modifiche
R2, giugno 2021	Incluse informazioni su Confezione singola paziente Riviste le Tabelle 10 e 11 per distinguere i dati di QFT-GIT vs. QFT-Plus Aggiornata sezione Descrizione e principio per aggiungere informazioni sulla popolazione di screening e l'intervallo di misurazione Aggiunta la Tabella 9 per aggiungere dati sul quoziente di probabilità di QFT-Plus
R3, ottobre 2021	Numero di catalogo tornato ai numeri di catalogo originali Aggiunta indicazione di monouso per le strisce per micropiastra nel Contenuto del kit
R4, marzo 2023	Correzioni della formattazione

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

#### **Contratto di licenza limitata per QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Kit**

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e alle presenti Istruzioni per l'uso e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, le presenti Istruzioni per l'uso e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alcuni di questi 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 alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. Al di fuori delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non garantisce che questo pannello e/o il suo utilizzo non violino i diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello accettano di non prendere o permettere a chiunque altro di prendere misure che potrebbero portare o facilitare qualsiasi atto vietato 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 pannello e/o ai relativi componenti.

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

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (gruppo QIAGEN) Proclin®. I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.

03/2023 L1123669 1123669IT © 2023 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Ordini [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Assistenza tecnica [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Sito web [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)