

Aprile 2022

Istruzioni per l'uso del QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 ELISA Kit



2 x 96

Versione 1



Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con QuantiFERON[®] SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes



626420



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, USA
Tel.: +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, Germania



1124420IT

Sommario

Uso previsto	5
Utente previsto.....	6
Descrizione e principio	7
Sommario e spiegazioni.....	7
Materiali in dotazione.....	9
Contenuto del kit.....	9
Componenti del kit	10
Piattaforma e software.....	10
Materiali necessari ma non in dotazione.....	11
Reagenti aggiuntivi.....	11
Strumentazione	11
Avvertenze e precauzioni	12
Informazioni sulla sicurezza	12
Precauzioni	13
Conservazione e manipolazione dei reagenti	16
Stabilità durante l'uso	16
Reagenti ricostituiti e inutilizzati	16
Conservazione e manipolazione dei campioni	17
Procedura: esecuzione dell'ELISA.....	18
Protocollo: IFN- γ ELISA	18
Risultati (calcoli)	23
Generazione della curva standard e dei valori del campione.....	23

Controllo della qualità del test	25
Interpretazione dei risultati.....	27
Limitazioni	28
Caratteristiche delle prestazioni dell'esame	29
Prestazioni analitiche	29
Prestazioni cliniche.....	38
Bibliografia.....	45
Guida alla risoluzione dei problemi	50
Simboli.....	53
Informazioni di contatto.....	54
Appendice A: Informazioni tecniche	55
Risultati indeterminati	55
Coaguli nei campioni di plasma	55
Campioni di plasma lipemici	55
Appendice B: Procedura sintetica del test ELISA	56
Informazioni per gli ordini	58
Cronologia delle revisioni del documento.....	59

Uso previsto

L'esame QuantiFERON SARS-CoV-2 è un test diagnostico in vitro progettato per il rilevamento qualitativo di interferoni- γ (IFN- γ) prodotti dalle cellule T CD4+ e CD8+ in risposta alla stimolazione da parte di un cocktail peptidico SARS-CoV-2 in sangue intero eparinizzato. La quantità di IFN- γ prodotta viene misurata usando un esame immuno-assorbente legato agli enzimi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

L'esame QuantiFERON SARS-CoV-2 è progettato per assistere nella valutazione della risposta immunologica cellulo-mediata (Cell-Mediated Immune, CMI) in individui senza una storia di infezione da SARS-CoV-2 e che hanno ricevuto la vaccinazione per COVID-19 usando vaccini che abbiano come bersaglio la proteina virale spike (S) del virus SARS-CoV-2.

L'esame QuantiFERON SARS-CoV-2 deve essere usato in combinazione ad altri test di laboratorio e valutazioni epidemiologiche/cliniche, al fine di valutare la risposta immunologica di un individuo alla vaccinazione per COVID-19.

Potrebbero essere necessari diversi giorni, in seguito alla vaccinazione, per sviluppare le risposte immunologiche delle cellule T, sebbene il periodo durante il quale tali risposte siano presenti non è ben caratterizzato negli individui vaccinati.

I risultati non reattivi non escludono l'infezione attiva da SARS-CoV-2 né determinano l'efficacia dei vaccini per COVID-19. Se si sospetta un'infezione attiva, confermare il sospetto usando un altro test antigenico o molecolare per SARS-CoV-2. I risultati ottenuti dal test devono sempre essere usati in combinazione ad esame clinico, anamnesi e altri risultati.

Per uso diagnostico in vitro.

Utente previsto

Questo kit è destinato all'uso professionale.

Il prodotto deve essere utilizzato esclusivamente da personale preparato e addestrato in modo specifico all'uso delle tecnologie di biologia molecolare e con competenze specifiche su questa tecnologia.

Descrizione e principio

Sommario e spiegazioni

QuantIFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) è un esame qualitativo che prevede l'uso di speciali provette per il prelievo ematico, contenenti antigeni peptidici che stimolano le cellule immunitarie utilizzando proteine specifiche del SARS CoV-2. 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- γ prodotto in risposta agli antigeni peptidici. Risposte specifiche mediate dalle cellule T all'infezione da SARS-CoV-2 sono state segnalate dopo la vaccinazione con diversi tipi di vaccini che abbiano come bersaglio la proteina spike [1– 34].

Nella prima fase il sangue intero viene raccolto in ciascuna delle QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes che includono una provetta Nil, una provetta Ag1, una provetta Ag2 e una provetta Mitogen. In alternativa, è possibile prelevare il sangue in un'unica provetta di raccolta generica contenente eparina di litio o eparina di sodio come anticoagulante e quindi trasferire il campione nelle QuantIFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes.

Le QuantIFERON SARS-CoV-2 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- γ (UI/ml) viene misurata con il dosaggio ELISA. Il QuantIFERON SARS-CoV-2 ELISA utilizza uno standard IFN- γ umano ricombinante che è stato analizzato rispetto a un preparato IFN- γ 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 QuantiFERON SARS-CoV-2 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- γ nel rivestimento dei pozzetti della micropiastra.

Il campione di plasma nella provetta Mitogen agisce da controllo positivo per l'IFN- γ per ogni campione analizzato. La provetta Nil compensa il livello di fondo (ad es., livelli eccessivi di IFN- γ in circolo o presenza di anticorpi eterofili). Il livello di IFN- γ della provetta Nil viene sottratto dal livello di IFN- γ delle provette Ag1, Ag2 e Mitogen.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

Componenti ELISA	Kit a 2 piastra
Numero di catalogo	626420
Microplate Strips (Strisce per micropiastre) (12 x 8 pozzetti) rivestite con anticorpo monoclonale murino anti-IFN- γ umano	2 set di 12 strisce per micropiastre da 8
IFN- γ Standard (Standard IFN), liofilizzato (contiene IFN- γ umano ricombinante, caseina bovina, Thimerosal 0,01% p/v)	1 x fiala (8 UI/ml dopo la ricostituzione)
Green Diluent (Diluyente verde) (contiene caseina bovina, siero murino normale, Thimerosal 0,01% p/v)	1 x 30 ml
Coniugato concentrato 100x, liofilizzato (contiene anticorpi murini anti-IFN- γ umani coniugati con perossidasi di rafano (HRP) e Thimerosal 0,01%)	1 x 0,3 ml (dopo la ricostituzione)
Tampone di lavaggio concentrato 20x (con pH 7,2 contiene ProClin® 300 0,05% v/v)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Soluzione di substrato enzimatico) (contiene H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Soluzione di arresto enzimatico) (contiene 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
<i>QuantiFERON SARS-CoV-2 ELISA Kit Istruzioni per l'uso</i>	1

*Contiene acido solforico

Componenti del kit

Controlli e calibratori

L'esame QFN-SARS ELISA utilizza uno standard IFN- γ umano ricombinante che è stato analizzato rispetto a un preparato IFN- γ di riferimento (Rif. NIH: Gxg01-902-535).

Piattaforma e software

Il software di analisi QFN SARS può essere utilizzato, facoltativamente, per analizzare i dati grezzi e calcolare i risultati. È disponibile per il download all'indirizzo www.qiagen.com.

Materiali necessari ma non in dotazione

Reagenti aggiuntivi

- Acqua deionizzata o distillata, 2 litri

Strumentazione*

- Incubatore a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (con o senza CO_2)
- Pipette calibrate a volume variabile per l'erogazione di 10–1000 μl con puntali monouso
- Pipetta multicanale calibrata per l'erogazione da 50 a 100 μl con puntali monouso
- Agitatore per micropiastre capace di velocità comprese tra 500 e 1000 giri/min
- 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
- Coperchio per piastra
- Panni assorbenti che non si sfilacciano

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

Avvertenze e precauzioni

I clienti nell'Unione Europea devono tenere presente che potrebbe essere richiesto di segnalare al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui si trova l'utente e/o il paziente gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.

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 schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) appropriate. Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

- Tutte le sostanze chimiche e i materiali biologici sono potenzialmente pericolosi. I campioni dei pazienti e i campioni analitici sono potenzialmente infettivi e devono essere trattati come materiale a rischio biologico.
- Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.
- I campioni sono potenzialmente infettivi. Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.
- L'esame QFN SARS deve essere usato in combinazione ad altri test di laboratorio e valutazioni epidemiologiche/cliniche, al fine di valutare la risposta immunologica di un individuo alla vaccinazione per COVID-19.
- Un risultato QFN SARS non reattivo non esclude la possibilità di infezione da SARS-CoV-2 né determina l'efficacia dei vaccini per COVID-19. Risultati non reattivi falsi possono essere dovuti a una manipolazione errata delle provette di raccolta ematica a seguito di venopuntura, esecuzione errata dell'esame o altre singole variabili immunologiche, comprese quelle relative a eventuali comorbidità. La produzione di anticorpi eterofili o IFN- γ non specifica da altre condizioni infiammatorie possono mascherare risposte specifiche ai peptidi del SARS-CoV-2.

- Un risultato reattivo del QFN SARS non può essere l'unica e definitiva base per determinare l'efficacia del vaccino per COVID-19. Eventuali errori nell'esecuzione dell'esame possono determinare risposte reattive false del QFN SARS.
- Un risultato reattivo del QFN SARS falso 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 "Procedura: esecuzione dell'ELISA", pagina 18, per una corretta manipolazione dei campioni di sangue. Il ritardo nell'incubazione può causare risultati non reattivi falsi o indeterminati, e altri parametri tecnici possono influenzare la capacità di rilevare una risposta significativa all'IFN- γ .
- 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 non reattiva alle proteine del SARS CoV-2. 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- γ . Livelli elevati di IFN- γ nel campione Nil possono verificarsi con la presenza di anticorpi eterofili o la secrezione intrinseca di IFN- γ .

Precauzioni

<p>CAUTELA</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

- Il thimerosal viene utilizzato come conservante in alcuni reagenti QFN SARS. Può essere tossico per ingestione, inalazione o contatto con la pelle.
- La mancata osservanza delle istruzioni presenti nelle *Istruzioni per l'uso del QuantiFERON ELISA Kit* 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- γ 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- γ si raccomanda di usare una decapsulatrice per fiale.

-
- Non miscelare o utilizzare strisce per micropiastre, standard IFN γ , diluente verde o coniugato concentrato 100x appartenenti ad altri lotti di kit QFN SARS. 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 kit QFN SARS ELISA 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 Procedura: esecuzione dell'ELISA", a pagina 18.
- Se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8°C, lo standard ricostituito del kit si mantiene fino a 3 mesi.
Prendere nota della data in cui è stato ricostituito lo standard del kit.
- Dopo la ricostituzione, il coniugato concentrato 100X inutilizzato deve essere conservato in frigorifero a una temperatura compresa tra 2 e 8°C e deve 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.

Conservazione e manipolazione dei campioni

Fare riferimento a *QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) Blood Collection Tubes Istruzioni per l'uso* (1124422) per i dettagli sul flusso di lavoro di raccolta del sangue per il test QFN SARS.

Procedura: esecuzione dell'ELISA

Protocollo: IFN- γ ELISA

Punti importanti

- Fare riferimento a "Contenuto del kit", pagina 9, e "Materiali necessari ma non in dotazione", pagina 11, per i materiali necessari all'esecuzione dell'ELISA.

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

Per ottenere risultati validi dall'esame QFN SARS, 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

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 QFN SARS e altre strisce sufficienti per il numero di soggetti da analizzare (fare riferimento alla Figura 2 per il formato della piastra consigliato). Dopo l'uso, conservare il supporto e il coperchio in modo da utilizzarli con le strisce rimanenti.

- 3a. Ricostituire lo standard IFN- γ 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- γ 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- γ (fare riferimento alla Figura 1).
- 3c. Dovrebbe essere generata una curva standard con le seguenti concentrazioni di IFN- γ :
- 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 μ l di GD a S1, S2, S3, S4.
C	Aggiungere 150 μ l di standard del kit a S1 e miscelare con cura.
D	Trasferire 50 μ l da S1 a S2 e miscelare con cura.
E	Trasferire 50 μ l da S2 a S3 e miscelare con cura.
F	Solo GD funge da standard zero (S4).

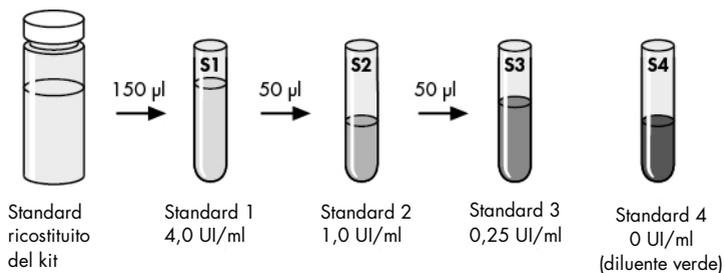


Figura 1. Preparazione di serie di diluizioni della curva standard.

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 concentrato 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 per prelievo ematico 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 QFN SARS Blood Collection Tube centrifugate per un massimo di 28 giorni a una temperatura compresa tra 2 e 8°C; i campioni di plasma raccolti possono essere conservati per un massimo di 28 giorni a una temperatura compresa tra 2 e 8°C. I campioni di plasma raccolti possono anche essere conservati a temperature inferiori a -20°C (preferibilmente fino a -70°C) per un massimo di 24 mesi.

I campioni di plasma possono essere caricati/utilizzati direttamente dalle provette per il prelievo ematico centrifugate per la misurazione nella piastra QFN SARS ELISA.

Importante: se i campioni di plasma devono essere trasferiti direttamente dalle QFN SARS Blood Collection Tube 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 Ag1	3 Ag1	5 Ag1	7 Ag1	9 Ag1	S2	S2	13 Ag1	15 Ag1	17 Ag1	19 Ag1	21 Ag1
C	1 Ag2	3 Ag2	5 Ag2	7 Ag2	9 Ag2	S3	S3	13 Ag2	15 Ag2	17 Ag2	19 Ag2	21 Ag2
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 Ag1	4 Ag1	6 Ag1	8 Ag1	10 Ag1	11 Ag1	12 Ag1	14 Ag1	16 Ag1	18 Ag1	20 Ag1	22 Ag1
G	2 Ag2	4 Ag2	6 Ag2	8 Ag2	10 Ag2	11 Ag2	12 Ag2	14 Ag2	16 Ag2	18 Ag2	20 Ag2	22 Ag2
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 Ag1 (Campione 1. plasma Ag1), 1 Ag2 (Campione 1. plasma Ag2), 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 ± 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 tra 500 a 1000 giri/min con un agitatore per micropiastre.
14. Coprire la piastra ELISA e incubare a temperatura ambiente ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) 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)

Il software di analisi QFN SARS può essere utilizzato per analizzare i dati grezzi e calcolare i risultati. È disponibile all'indirizzo www.qiagen.com. Assicurarsi di utilizzare la versione più aggiornata del software di analisi QFN SARS.

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 27. Il software riporta tutte le concentrazioni superiori a 10 UI/ml come ">10", poiché tali valori non rientrano nell'intervallo lineare convalidato dell'ELISA.

Un'alternativa all'impiego del software di analisi QFN SARS per la generazione dei risultati è costituita dal metodo seguente.

Generazione della curva standard e dei valori del campione

Se non viene utilizzato il software di analisi QFN SARS

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 software di analisi QFN SARS.

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 $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ tracciando il $\log_{(e)}$ dell'OD media (asse y) rispetto al $\log_{(e)}$ della concentrazione IFN- γ in UI/ml (asse x), omettendo da questi calcoli lo standard zero. Calcolare la bontà di adattamento della curva standard mediante l'analisi della regressione.
3. Utilizzare la curva standard per determinare la concentrazione dell'IFN- γ (UI/ml) per ognuno dei campioni di plasma da analizzare, utilizzando il valore dell'OD di ogni campione.

4. 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 della regressione, il coefficiente di variazione (%CV) degli standard e il coefficiente di correlazione (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	$\text{Log}_{(e)}$ UI/ml	$\text{Log}_{(e)}$ 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 di correlazione calcolato (r) = 1,000. NA: Non applicabile.

Utilizzando i criteri specificati in "Controllo della qualità del test", pagina 25, 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 _(e) valore densità ottica (Optical Density, OD)	X	e ^X (UI/ml)	Antigene –Nil (UI/ml)
Nil	0,037	-3,297	-2,934	0,05	–
Ag1	1,161	0,149	1,437	4,21	4,15
Ag2	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- γ (in UI/ml) per Ag1, Ag2 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 di correlazione (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 software di analisi QFN SARS 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- γ ricombinante hanno mostrato riduzioni fino al 50% della concentrazione se conservati a 2–8°C e -20°C. L'IFN- γ ricombinante non è raccomandato per stabilire standard di controllo in campioni di plasma.

Interpretazione dei risultati

I risultati del test QFN SARS sono interpretati rispettando i criteri descritti di seguito (Tabella 4).

Importante: L'esame QFN SARS deve essere usato in combinazione ad altri test di laboratorio e valutazioni epidemiologiche/cliniche al fine di valutare la risposta immunologica di un individuo alla vaccinazione per COVID-19.

Tabella 4. Interpretazione dei risultati del test QFN SARS

Nil (UI/ml)	Antigene Ag1 meno Nil (UI/ml)	Antigene Ag2 meno Nil (UI/ml)	Mitogen meno Nil (UI/ml)*	Risultato del QFN SARS	Report/Interpretazione
≤8,0	≥0,15 e ≥25% di Nil	Qualsiasi	Qualsiasi	Reattivi	<i>Rilevata risposta SARS-CoV-2</i>
	Qualsiasi	≥0,15 e ≥25% di Nil			
≤8,0	<0,15 o ≥0,15 e <25% di Nil	<0,15 o ≥0,15 e <25% di Nil	≥0,50	Non reattivi	<i>Risposta a SARS-CoV-2 NON rilevata</i>
	<0,15 o ≥0,15 e <25% di Nil	<0,15 o ≥0,15 e <25% di Nil	<0,50	Indeterminato [†]	<i>Risposta a SARS-CoV-2 e Mitogen non possono essere rilevati</i>
>8,0 [§]	Qualsiasi				

*Le risposte al controllo positivo Mitogen (e occasionalmente le risposte all'antigene Ag) possono essere al di fuori dell'intervallo del lettore per micropiastre. Ciò non influenza i risultati del test. Il software QFN SARS segnala i valori >10 UI/ml come >10 UI/ml.

[†] Per le possibili cause consultare "Guida alla risoluzione dei problemi", pagina 50s.

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

Limitazioni

I risultati del test QFN SARS 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 Ag potrebbe non rientrare nell'intervallo di misurazione dell'esame.

- Un risultato non reattivo deve essere considerato con i dati medici e storici dell'individuo relativi alla probabilità di risposta immunitaria alla vaccinazione, in particolare per gli individui con funzione immunitaria compromessa.
- L'esame QFN SARS deve essere usato in combinazione ad altri test di laboratorio e valutazioni epidemiologiche/cliniche al fine di valutare la risposta immunologica di un individuo alla vaccinazione per COVID-19.

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- γ in circolo o presenza di anticorpi eterofili
- Superamento dei tempi del sangue convalidati dal prelievo del campione di sangue all'incubazione. Fare riferimento a *QFN SARS Blood Collection Tubes Istruzioni per l'uso* (1124422).

Caratteristiche delle prestazioni dell'esame

Prestazioni analitiche

Valore limite del test

Il cut-off dell'esame QFN SARS è stato determinato utilizzando i dati di venti (20) soggetti che hanno testato SARS-CoV-2 non reattivo con un test RT-PCR o un test sierologico e venti (20) donatori completamente vaccinati (tra 2 e 16 settimane dopo lo stato di vaccinazione completa) con un vaccino autorizzato da EUA della FDA. I dati di sensibilità e specificità insieme agli intervalli di confidenza (IC) al 95% bilaterali sono stati analizzati e hanno dimostrato che il cut-off ELISA ottimale era di 0,15 UI/ml (vedere la Tabella 5).

Tabella 5. Valori cut-off del QFN SARS (UI/ml) con sensibilità e specificità corrispondenti e IC esatto bilaterale al 95%

Valore cut-off	Sensibilità			Specificità		
	Valore	IC 95% inferiore	IC 95% superiore	Valore	IC 95% inferiore	IC 95% superiore
0,1	1,000	0,940	1,000	0,933	0,838	0,982
0,15	0,983	0,911	1,000	1,000	0,940	1,000
0,2	0,900	0,795	0,962	1,000	0,940	1,000
0,25	0,733	0,603	0,839	1,000	0,940	1,000
0,3	0,717	0,586	0,825	1,000	0,940	1,000
0,35	0,650	0,516	0,769	1,000	0,940	1,000
0,4	0,600	0,465	0,724	1,000	0,940	1,000
0,45	0,567	0,432	0,694	1,000	0,940	1,000
0,5	0,467	0,337	0,600	1,000	0,940	1,000
0,55	0,433	0,306	0,568	1,000	0,940	1,000
0,6	0,400	0,276	0,535	1,000	0,940	1,000
0,65	0,333	0,217	0,467	1,000	0,940	1,000
0,7	0,317	0,203	0,450	1,000	0,940	1,000
0,75	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000
0,8	0,300	0,188	0,432	1,000	0,940	1,000

Linearità

La linearità del QFN SARS ELISA è stata dimostrata distribuendo in modo casuale, sulla piastra ELISA, 5 repliche di 11 pool di plasma con concentrazioni note di IFN- γ . La retta di regressione lineare ha una pendenza di $1,002 \pm 0,011$ e un coefficiente delle correlazioni di 0,99 (Figura 3).

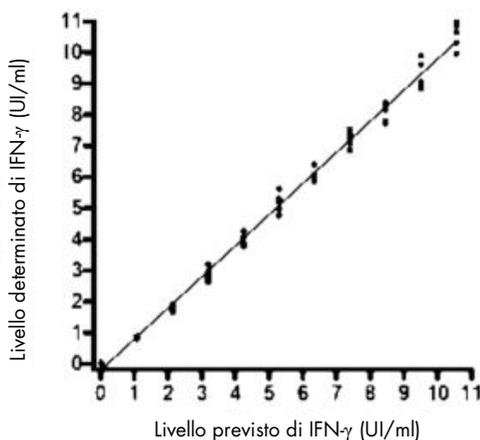


Figura 3. **Illustrazione dell'analisi di regressione dello studio di linearità.**

Riproducibilità

È stato condotto uno studio di riproducibilità multilaboratorio per valutare le prestazioni dell'esame QFN SARS in più laboratori e con più operatori. Questo studio è stato condotto in tre laboratori QIAGEN. Sono stati arruolati in totale tre (3) soggetti di studio SARS-CoV-2 reattivi e tre (3) SARS-CoV-2 non reattivi (determinati mediante test RT-PCR o test sierologico).

Da ciascun soggetto dello studio è stato ottenuto sangue raccolto in quattro (4) provette di raccolta del sangue con lito eparina. Le provette di raccolta del sangue con lito eparina sono state quindi trasferite in uno dei laboratori di test in cui il sangue è stato aliquotato in tre (3) serie di QFN SARS Blood Collection Tube (QFN SARS Ag1, Ag2, Mitogen e Nil). Un set di

QFN SARS Blood Collection Tube (BCT) è stato trasferito in ciascuno dei laboratori di test e quindi testato in conformità con la procedura di esame QFN SARS. Ciascun soggetto è stato testato con dieci (10) replicati (cinque (5) replicati per Ag1 e cinque (5) replicati per Ag2) in ciascun laboratorio. In ogni laboratorio un (1) operatore ha eseguito il test QFN SARS in modo indipendente. Ciascun operatore era in cieco rispetto ai risultati ottenuti dagli altri operatori e in cieco rispetto ai risultati del test RT-PCR o sierologico del soggetto dello studio.

Sono stati generati 30 risultati in ciascuno dei tre (3) laboratori di analisi, per un totale di 90 punti dati. Un riepilogo dei risultati dello studio di riproducibilità è fornito nella Tabella 6.

Tabella 6. Riassunto dei risultati dello studio di riproducibilità –N = 30 campioni di pazienti

Laboratorio 1 – 1 operatore	Laboratorio 2 – 1 operatore	Laboratorio 3 – 1 operatore
25/30 = 83%	30/30 = 100%	30/30 = 100%
Concordanza dei risultati qualitativi	Concordanza dei risultati qualitativi	Concordanza dei risultati qualitativi

La concordanza percentuale totale tra tutti i campioni reattivi e non reattivi sui risultati qualitativi attesi (soggetto reattivo che restituisce un risultato reattivo e soggetto non reattivo che restituisce un risultato non reattivo in base al risultato del metodo di riferimento del soggetto) era del 94,4% (85/90) in tutti e tre (3) i laboratori.

Ripetibilità tra lotti

È stato condotto uno studio per determinare la variabilità tra lotti delle QFN SARS Blood Collection Tube. Sono stati testati in totale due (2) soggetti reattivi a SARS-CoV-2 e tre (3) non reattivi a SARS-CoV-2 (determinati dal test RT-PCR o dal test sierologico). In questo studio sono stati inclusi tre (3) lotti separati di ciascuna provetta di raccolta del sangue QFN SARS Ag1 e Ag2. Sono stati testati cinque (5) replicati per donatore per lotto di provette di raccolta del sangue. Un riepilogo dei risultati di precisione tra lotti è fornito in Tabella 7.

Tabella 7. Riepilogo dei risultati dello studio di precisione tra lotti - Concordanza percentuale totale per le provette di raccolta del sangue QFN SARS Ag1 e Ag2; N = 25

BCT QFN SARS	Numero di lotto BCT	Numero di chiamate qualitative in concordanza/totali	Proporzione	Limite inferiore di confidenza	Limite superiore di confidenza
Ag1	1	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	2	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	3	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
Ag2	1	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	2	25/25	100,00%	86,28%	100,00%
	3	25/25	100,00%	86,28%	100,00%

La concordanza percentuale totale tra tutti i campioni reattivi e non reattivi sui risultati attesi (soggetto reattivo che restituisce un risultato reattivo e soggetto non reattivo che restituisce un risultato non reattivo in base al risultato del metodo di riferimento del soggetto) era del 100% in tutti e tre (3) i lotti di BCT QFN SARS Ag1 e Ag2.

Limite del bianco (Limit of Blank, LoB)

Il limite del bianco (Limit of Blank, LoB) è stato valutato per l'esame QFN SARS. Due (2) replicati ciascuno di quattordici (14) campioni individuali di plasma umano normale (come i bianchi) sono stati testati con due (2) lotti di QFN SARS ELISA da tre (3) operatori in tre (3) giorni di test, un (1) operatore per giorno di test per un totale di 84 replicati da ciascun lotto di kit ELISA.

I valori LoB (UI/ml) per i due (2) lotti di kit ELISA sono stati calcolati separatamente, come mostrato nella Tabella 8.

Tabella 8. Valori LoB (UI/ml) per i due (2) lotti del kit QFN SARS ELISA

Kit QFN SARS ELISA	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 kit QFN SARS ELISA, 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 QFN SARS. Un pool di plasma umano è stato generato combinando quattordici (14) campioni di plasma individuali. Ciascuno dei tre (3) operatori ha preparato uno stock standard di riferimento di IFN- γ a 1,0 UI/ml diluito in tampone. Sono state effettuate una serie di diluizioni di otto (8) concentrazioni nel plasma. Lo studio è stato condotto nell'arco di tre (3) giorni, da tre (3) operatori alternati utilizzando due (2) lotti di kit QFN SARS ELISA. Per ogni giorno di test, sono stati testati cinque (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- γ per ciascun lotto del kit QFN SARS ELISA.

Il valore LoD per ciascuno dei lotti del kit QFN SARS ELISA testato è stato calcolato separatamente, come mostrato nella Tabella 9. Il LoD è stato stimato utilizzando un modello di regressione Probit. Il LoD si basava sulla concentrazione stimata (UI/ml) che dava una probabilità stimata del 95% di ottenere un tasso di successo superiore a 0,04 UI/ml (determinato dal LoB).

Tabella 9. Valori LoD stimati (UI/ml) per i due (2) lotti del kit QFN SARS ELISA

Kit QFN SARS ELISA	Probabilità	Concentrazione stimata (UI/μl)	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
Kit2	0,95	0,065	0,060	0,073

Il valore LoD più grande calcolato su entrambi i lotti del kit QFN SARS ELISA, 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 QFN SARS ELISA di IFN- γ . Gli interferenti inclusi in questo test erano: trigliceridi (totali), emoglobina, proteina (siero totale), bilirubina (coniugata), bilirubina (non coniugata), abacavir solfato, ciclosporina e prednisolone. Cinque (5) pool di plasma con concentrazioni note di IFN- γ sono stati preparati utilizzando diverse concentrazioni interferenti. Il livello di IFN- γ del pool di base è stato precedentemente preparato con una quantità predeterminata di IFN- γ presente (circa 0,21, 0,45 e 1,4 UI/ml). Questo pool è stato quindi utilizzato per preparare i pool interferenti. Cinque diversi livelli di concentrazioni di interferenti sono state testate ed 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 (6) replicati per ogni livello di concentrazione del campione interferente.

Per ciascuna concentrazione del campione, è stato eseguito un test T, confrontando la differenza nel log₁₀ medio (UI/ml) dell'elevato livello di interferente (10) rispetto al controllo (cioè livello privo di interferenti). Sono riportate nella tabella anche la differenza stimata nella risposta media, insieme ai limiti di confidenza al 95% bilaterali e al valore p corrispondenti.

Tabella 10. 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- γ

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

La tabella continua alla pagina seguente

Continuazione della tabella dalla pagina precedente

Tabella 10. 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- γ

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

I risultati non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra il livello di interferente massimo e il controllo (livello privo di interferenti) a eccezione del livello di concentrazione di trigliceridi 0,45 UI/ml. La differenza media per questo valore è stata determinata entro ± 2 deviazioni standard dalla misurazione del livello medio del controllo, dimostrando che la differenza osservata rientra nella variabilità prevista dell'esame e che non si prevede che livelli clinicamente rilevanti di trigliceridi interferiscano con il QFN SARS ELISA.

Prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche dell'esame QFN SARS sono state valutate in uno studio prospettico osservazionale condotto da giugno a ottobre 2021 che ha utilizzato soggetti senza storia di infezione da SARS-CoV-2 che avevano ricevuto la vaccinazione per COVID-19 con vaccini mirati alla proteina virale S di SARS-CoV-2, così come soggetti senza storia di infezione da SARS-CoV-2 che non avevano ricevuto la vaccinazione per COVID-19.

I soggetti, dopo aver fornito il proprio consenso, sono stati valutati rispetto ai criteri di inclusione ed esclusione dello studio, e solo i soggetti che hanno soddisfatto tutti i criteri di inclusione ma nessuno dei criteri di esclusione sono stati arruolati e sottoposti a prelievo di sangue per QFN SARS.

Di seguito viene fornita un riepilogo della popolazione arruolata:

- Gruppo 1: i soggetti inclusi senza storia di infezione naturale da SARS-CoV-2 non avevano ricevuto la vaccinazione per COVID-19 al momento del prelievo di sangue per QFN SARS, non erano mai risultati positivi all'infezione da SARS-CoV-2, avevano riportato un risultato di test sierologico non reattivo e non presentavano segni o sintomi di COVID-19 entro un periodo di 4 settimane dall'arruolamento.
- Gruppo 2: i soggetti inclusi senza storia di infezione da SARS-CoV-2, avevano ricevuto la vaccinazione per COVID-19 con proteina S di SARS-CoV-2 come bersaglio al momento del prelievo di sangue per QFN SARS, e non erano mai risultati positivi all'infezione da SARS-CoV-2.
- Nessuno dei soggetti era stato sottoposto a trapianto (organo solido o cellule staminali) e/o era in terapia oncologica al momento della partecipazione allo studio.

In totale sono stati arruolati 218 soggetti nel Gruppo 1 e 171 soggetti nel Gruppo 2. Dopo il prelievo di sangue per QFN SARS, quattro soggetti del Gruppo 1 sono risultati non idonei, a causa di un risultato del test sierologico reattivo ottenuto utilizzando un campione raccolto durante la stessa visita in cui è stato effettuato il prelievo di sangue per QFN SARS, e sono stati successivamente esclusi dall'analisi.

Sono stati raccolti i campioni, sono state processate le QFN SARS Blood Collection Tube e il plasma è stato conservato a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ fino al momento del test con il QFN SARS ELISA. Tutte le sessioni della piastra QFN SARS ELISA erano valide e non sono stati ottenuti risultati indeterminati, con, rispettivamente, 214 e 171 campioni valutabili nei Gruppi 1 e 2.

Dati anagrafici

Nella Tabella 11 vengono presentati il numero di campioni raccolti in ciascun paese e la percentuale del totale per ciascun gruppo di studio.

Tabella 11. Riepilogo del paese di raccolta del campione

Paese di raccolta del campione	Gruppo 1		Gruppo 2	
	N	%	N	%
Paesi Bassi	214	100,00%	153	89,47%
America	0	0,00%	18	10,53%

Nella Tabella 12 viene mostrato un riepilogo dell'età dei soggetti, compresa l'età media, mediana, minima e massima e la deviazione standard (DS) dell'età.

Tabella 12. Riepilogo dell'età dei soggetti (anni)

N	Media	Mediana	DS	Minimo	Massimo
385	40,47	37,00	14,168	18,00	80,00

Nella Tabella 13 è fornita una sintesi del sesso dei soggetti.

Tabella 13. Sintesi del sesso dei soggetti

Sesso	N	%
Femminile	234	60,78%
Maschile	151	39,22%

Specificità

Nella Tabella 14 è mostrata la concordanza clinica che confronta i risultati del QFN SARS con i risultati del metodo di riferimento.

Tabella 14. Concordanza clinica: Risultato del QFN SARS vs. metodo di riferimento

		Risultato del metodo di riferimento		Totale
		Gruppo 1 (- vaccino, -infezione)	Gruppo 2 (+ vaccino, -infezione)	
Risultato del QFN SARS	Non reattivi	199	34	233
	Reattivi	15	137	152
Totale		214	171	385

Per i soggetti non vaccinati (Gruppo 1), 199 su 214 sono risultati non reattivi utilizzando QFN SARS, mentre i restanti 15 sono risultati reattivi. Per i soggetti vaccinati (Gruppo 2), 137 su 171 sono risultati reattivi utilizzando QFN SARS, mentre i restanti 34 sono risultati non reattivi. Nessuno dei 15 e 34 campioni discordanti rispettivamente dei Gruppi 1 e 2 ha ricevuto ulteriori test con un metodo discordante.

La concordanza percentuale di negatività (Negative Percentage Agreement, NPA) (specificità) è stata calcolata per i soggetti non vaccinati (Gruppo 1), insieme all'intervallo di confidenza (IC) esatto al 95% bilaterale e viene presentata in Tabella 15.

Tabella 15. Concordanza percentuale di negatività (specificità)

N. gruppo	NPA (specificità)	IC 95%
Gruppo 1 (-vaccino, -infezione)	92,99% (199/214)	88,70–96,02%

Sensibilità

La concordanza percentuale di positività (Positive Percentage Agreement, PPA) (sensibilità) è stata calcolata per i soggetti vaccinati (Gruppo 2), insieme all'IC esatto al 95% bilaterale, ed è presentata in Tabella 16.

Tabella 16. Concordanza percentuale di positività (sensibilità)

N. gruppo	PPA (sensibilità)	IC 95%
Gruppo 2 (+vaccino, -infezione)	80,12% (137/171)	73,34–85,82%

Concordanza percentuale di positività per età

Per i soggetti vaccinati (Gruppo 2), la concordanza percentuale di positività è stata stratificata per età <60 e ≥60 anni ed è presentata in Tabella 17.

Tabella 17. Concordanza percentuale di positività in base a età <60 e ≥60 anni

Fascia di età (anni)	PPA (sensibilità)	IC 95%
<60	85,33% (128/150)	78,78–90,64%
≥60	42,86% (9/21)	21,82–65,98%

Concordanza percentuale di positività in base a vaccino per COVID-19

Per i soggetti vaccinati (Gruppo 2), la concordanza percentuale di positività è stata stratificata in base al vaccino per COVID-19 ricevuto e viene presentata in Tabella 18.

Tabella 18. Concordanza percentuale di positività in base a vaccino per COVID-19

Vaccino	PPA (sensibilità)	IC 95%
Astra Zeneca	62,50% (5/8)	24,49–91,48%
Janssen (Johnson & Johnson)	86,67% (13/15)	59,54–98,34%
Moderna	77,27% (17/22)	54,63–92,18%
Pfizer - BioNTech	80,95% (102/126)	73,00–87,40%

Fattori associati a risultati non reattivi in soggetti vaccinati

Per determinare se l'aumento dell'età, il tempo intercorso dal completamento della vaccinazione per COVID-19, il vaccino ricevuto e il sesso sono associati a risultati non reattivi nei soggetti vaccinati (Gruppo 2), è stata eseguita un'analisi di regressione logistica univariata. L'associazione tra ciascun fattore e i risultati non reattivi è stata calcolata in termini di odds ratio (OR), e i risultati sono presentati nella Tabella 19.

Tabella 19. Associazione tra fattori e risultati non reattivi in soggetti vaccinati

Fattore		OR (95% IC)	Valore p
Età (anni)		1,08 (1,05–1,12)	<0,001
Tempo intercorso dalla vaccinazione al prelievo ematico QFN SARS (giorni)		1,02 (1,01–1,03)	<0,001
Vaccino	Pfizer – BioNTech	1	–
	Astra Zeneca	2,55 (0,57–11,42)	0,221
	Janssen (Johnson & Johnson)	0,65 (0,14–3,09)	0,592
	Moderna	1,25 (0,42–3,72)	0,689
Sesso	Femminile	1	–
	Maschile	1,25 (0,59–2,65)	0,565

Gli unici fattori che si associavano significativamente a risultati non reattivi nei soggetti vaccinati erano l'età e il tempo trascorso dalla vaccinazione.

Poiché lo studio è stato condotto in paesi in cui i vaccini per COVID-19 sono stati resi disponibili prima agli individui più anziani, l'età potrebbe aver influito sull'associazione tra il tempo trascorso dalla vaccinazione e i risultati non reattivi. La Tabella 20 mostra l'analisi di regressione con l'età come covariata.

Tabella 20. Associazione tra fattori e risultati non reattivi controllati per età

Fattore	OR (95% IC)	Valore p
Età (anni)	1,07 (1,03–1,11)	<0,001
Tempo intercorso dalla vaccinazione al prelievo ematico QFN SARS (giorni)	1,01 (1,00–1,02)	0,214

Quando si controlla l'età, l'associazione tra tempo trascorso dalla vaccinazione e risultati non reattivi non è più significativa, tuttavia l'età è rimasta significativamente associata.

Bibliografia

1. Goletti D., Petrone L, Manissero D, Bertoletti A, Rao S, Ndunda N, et al. The potential clinical utility of measuring SARS-CoV-2-specific T-cell responses. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2021 Jul [cited 2021 Jul 13];0(0). Available from: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X21003785/fulltext>
2. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Najafi Fard S, Alonzi T, et al. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect*. 2021
3. Petrone L., Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Gualano G, Vittozzi P, et al. Coinfection of tuberculosis and COVID-19 limits the ability to in vitro respond to SARS-CoV-2. *Int J Infect Dis*. 2021
4. Shrotri M., van Schalkwyk MCI, Post N, Eddy D, Huntley C, Leeman D, et al. T cell response to SARS-Cov-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE*. 2021
5. Alessandra D’Abramo, Serena Vita, Gaetano Maffongelli, Andrea Mariano , Chiara Agrati , Concetta Castilletti ,Delia Goletti, Giuseppe Ippolito, Emanuele Nicastrì SC-19 CIT. Prolonged and severe SARS-CoV-2 infection inpatients under B-cell-depleting drug successfully treated: A tailored approach. *Int J Infect Dis*. 2021;(107):247–50
6. Soresina A, Moratto D, Chiarini M, Paolillo C, Baresi G, Focà E, et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020
7. Quinti I, Lougaris V, Milito C, Cinetto F, Pecoraro A, Mezzaroma I, et al. A possible role for B cells in COVID-19? Lesson from patients with agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*. 2020

8. Geers D, Shamier MC, Bogers S, den Hartog G, Gommers L, Nieuwkoop NN, et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *SciImmunol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2021 Jun 30];6(59). Available from: <http://immunology.sciencemag.org/>
9. Alter G, Yu J, Liu J, Chandrashekar A, Borducchi EN, Tostanoski LH, McMahan K, Jacob-Dolan C, Martinez DR, Chang A, Anioke T, Lifton M, Nkolola J, Stephenson KE, Atyeo C, Shin S, Fields P, Kaplan I, Robins H, Amanat F, Krammer F, Baric RS, Le Gars M, Sado BD. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans. *Nature*. 2021
10. Dan JM, Mateus J, Kato Y, Hastie KM, Yu ED, Faliti CE, et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* (80-) [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2021 Jun 30];371(6529). Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abf4063>
11. Chavarot N, Ouedrani A, Marion O, Leruez-Ville M, Villain E, Baaziz M, et al. Poor Anti-SARS-CoV-2 Humoral and T-cell Responses After 2 Injections of mRNA Vaccine in Kidney Transplant Recipients Treated with Belatacept. *Transplantation* [Internet]. 2021 Apr 8 [cited 2021 Jul 1];2. Available from: https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/9000/Poor_Anti_SARS_CoV_2_Humoral_and_T_cell_Responses.95281.aspx
12. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020
13. Alberto M. Borobia, Antonio J Carcas, Mayte Pérez-Olmeda, Luis Castaño, María Jesús Bertran, Javier García-Pérez, Magdalena Campins, Antonio Portolés, María González-Pérez, María Teresa García Morales, Eunat Arana-Arri, Marta Aldea, Francisco Díez-Fuerte CSG. Immunogenicity and reactogenicity of BNT162b2 booster in ChAdOx1-S

-
- primed participants (CombiVacS): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2021
14. Mónica Martínez-Gallo, Juliana Esperalba-Esquerra, Ricardo Pujol-Borrell, Víctor Sandá, Iria Arrese-Muñoz, Candela Fernández Naval, Andrés Antón Pagarolas, Victoria Cardona, Moisés Labrador-Horrillo, Tomás Pumarola-Suñé MH-G. T-cell responses as a correlate of COVID-19 vaccination. A pilot study in Health Care Workers
15. Van Praet JT, Vandecasteele S, De Roo A, De Vriese AS, Reynders M. Humoral and cellular immunogenicity of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in nursing home residents. *Clin Infect Dis*. 2021
16. Pedersen RM, Tornby DS, Bistrup C, Johansen IS, Andersen TE JU. Negative SARS-CoV-2 antibodies, T cell response and virus neutralization following full vaccination in a renal transplant recipient: a call for vigilance. *Clin Microbiol Infect*. 2021
17. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020
18. Rydzynski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*. 2020
19. Tan AT, Linster M, Tan CW, Le Bert N, Chia WN, Kunasegaran K, et al. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep*. 2021
20. Aiello A, Najafi Fard S, Petruccioli E, Petrone L, Vanini V, Farroni C, et al. Spike is the most recognized antigen in the whole-blood platform in both acute and convalescent COVID-19 patients. *Int J Infect Dis*. 2021

-
21. Soumya Jaganathan, Francis Stieber, Sonia N. Rao, Vladyslav Nikolayevskyy, Nadia Allen, Jeff Boyle JH. Preliminary Evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIArearch Anti-SARS-CoV-2 Total Test in Recently Vaccinated Individuals. 2021
 22. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology*. 2020
 23. Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, Maliga Z, Bondoc S, Starke C, et al. Vascular Disease and Thrombosis in SARS-CoV-2-Infected Rhesus Macaques. *Cell*. 2020
 24. Kuri-Cervantes L, Pampena MB, Meng W, Rosenfeld AM, Ittner CAG, Weisman AR, et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci Immunol*. 2020
 25. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020
 26. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020
 27. Peng Y, Mentzer AJ, Liu G, Yao X, Yin Z, Dong D, et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat Immunol*. 2020
 28. Sattler A, Angermair S, Stockmann H, Heim KM, Khadzhynov D, Treskatsch S, et al. SARS-CoV-2-specific T cell responses and correlations with COVID-19 patient predisposition. *J Clin Invest*. 2020
 29. Mathew D, Giles JR, Baxter AE, Greenplate AR, Wu JE, Alanio C, et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals patient heterogeneity and distinct immunotypes with implications for therapeutic interventions. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2020

-
30. Chen Z, Wherry EJ. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020
31. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belli-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020
32. Sahin U, Muik A, Derhovanessian E, Vogler I, Kranz LM, Vormehr M, et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 2020
33. Ryu MR, Park MS, Cho EH, Jung CW, Kim K, Kim SJ, et al. Comparative evaluation of QuantiFERON-TB gold in-tube and QuantiFERON-TB gold plus in diagnosis of latent tuberculosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 Jul 1];56(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30135226/>
34. Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri F, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON- Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis*. 2017

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (Frequently Asked Questions, FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti dei Servizi tecnici QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e/o protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni ed esami (per i dati di contatto visitare il sito 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 che lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100X vengano utilizzati 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 QFN SARS Blood Collection Tube 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 ± 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 μl 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) Temperatura di incubazione troppo elevata | L'incubazione del test ELISA dovrebbe avvenire a temperatura ambiente ($22 \pm 5^\circ\text{C}$). |

Commenti e suggerimenti

- c) Kit/componenti scaduti Assicurarsi di utilizzare il kit entro la data di scadenza. Assicurarsi che lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100X vengano utilizzati 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 µl 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 potrebbero comparire nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
 Σ <N>	Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni
	Data di scadenza
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale (vale a dire, l'etichetta del componente)
	Componenti
	Contenuto
	Numero
	Codice GTIN
	Rappresentante autorizzato
R_n	"R" indica la revisione delle Istruzioni per l'uso (manuale) e "n" indica il numero della revisione
	Limite di temperatura
	Produttore

Simbolo	Definizione del simbolo
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Tenere al riparo dalla luce
	Avvertenza/Cautela

Informazioni di contatto

Per assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultare servizi tecnici QIAGEN all'indirizzo www.qiagen.com/Support, chiamare il numero 00800-22-44-6000, o contattare uno dei reparti di assistenza tecnica QIAGEN o i distributori locali (vedere il retro della copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Appendice A: Informazioni tecniche

Risultati indeterminati

I risultati indeterminati non sono frequenti e possono essere correlati allo stato immunitario del soggetto sottoposto al test, 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 QFN SARS 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.



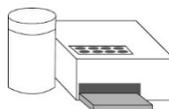
5. Aggiungere 50 µl di campioni di plasma in esame e 50 µl di standard nei pozzetti opportuni. Miscelare con l'agitatore.



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.



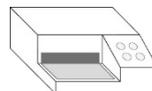
9. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.



10. Aggiungere 50 μ 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 620-650 nm.



12. Analizzare i risultati.



Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
QuantiFERON SARS-CoV-2 (QFN SARS) ELISA Kit	Kit ELISA per 2 piastre	626420
Prodotti correlati		
QuantiFERON SARS-CoV-2 Blood Collection Tubes	200 provette (50 per ciascun Nil, Ag1, Ag2 e Mitogen)	626725

Per informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Cronologia delle revisioni del documento

Data	Descrizione
R1, ottobre 2021	Versione iniziale
R2, novembre 2021	Aggiornamento delle sezioni Caratteristiche delle prestazioni e Prestazioni cliniche
R3, aprile 2022	Aggiornata la sezione Caratteristiche delle prestazioni analitiche per le sostanze interferenti

Pagina lasciata vuota intenzionalmente.

Pagina lasciata vuota intenzionalmente.

Pagina lasciata vuota intenzionalmente.

Contratto di licenza limitato per QuantiFERON® SARS-CoV-2(QFN SARS) ELISA Kit

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

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale 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, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito 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 là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo pannello e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscono violazione dei 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 acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo pannello e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

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

04-22 1124420 © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

