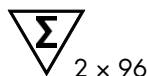


Octobre 2019

Notice du test

QuantiFERON[®]-CMV ELISA



Test d'interféron-gamma IFN- γ sur sang total mesurant les réponses contre des antigènes peptidiques du cytomégalovirus humain



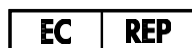
Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro



0350-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, États-Unis +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden, ALLEMAGNE

1075110 Rév. 06



www.QuantiFERON.com

Contenu

Utilisation prévue	5
Résumé et explication	5
Principe de la procédure	6
Temps requis pour effectuer le dosage	7
Matériel fourni.....	8
Contenu du kit	8
Matériel nécessaire, mais non fourni	9
Avertissements et précautions	9
Informations de sécurité.....	11
Stockage et manipulation des réactifs.....	12
Prélèvement et manipulation des échantillons	13
Procédure	16
Étape 1 : Incubation du sang et collecte du plasma	16
Étape 2 : QuantiFERON-CMV ELISA pour l'IFN- γ humain	17
Calculs et interprétation du test.....	22
Génération de la courbe d'étalonnage (si le QuantiFERON-CMV Analysis Software n'est pas utilisé).....	22
Contrôle qualité du test	23
Interprétation des résultats.....	24
Limitations.....	25
Valeurs attendues	25
Caractéristiques de performances.....	28

Performances cliniques	28
Seuil du dosage	29
Études cliniques	29
Spécificité.....	30
Sensibilité.....	30
Études validant l'utilité clinique.....	31
Lignes directrices internationales consensuelles sur la prise en charge du cytomégalo virus dans la transplantation d'organes solides	36
Caractéristiques de performances du dosage.....	37
Informations techniques	40
Résultats indéterminés	40
Échantillons de plasma coagulés	40
Guide de résolution de problèmes	41
Références	43
Symboles	45
Coordonnées	46
Résumé de la procédure du test ELISA	47
Étape 1 : Incubation du sang	47
Étape 2 : IFN- γ ELISA	47
Historique des versions du manuel	50

Utilisation prévue

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) est un dosage in vitro utilisant un mélange de peptides qui imitent certaines protéines du cytomégalovirus humain (CMV) pour stimuler les cellules de sang total héparinisé. La détection de l'interféron-gamma (IFN- γ) par dosage par méthode immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) est utilisée pour quantifier les réponses in vitro à ces antigènes peptidiques associés au contrôle immunitaire d'une infection à CMV. La perte de cette fonction immunitaire peut être associée au développement de la maladie à CMV. L'utilisation prévue du test QF-CMV est de surveiller le niveau d'immunité anti-CMV chez un patient.

Le test QF-CMV n'est pas conçu pour déterminer une infection à CMV et ne doit pas être utilisé pour exclure une infection à CMV.

Résumé et explication

Le CMV est un virus de type herpès affectant 50 à 85 % de la population adulte. Cette infection est une complication fréquente de l'immunosuppression, en particulier après une transplantation, et peut contribuer de manière sensible à la morbidité et à la mortalité des patients transplantés. Les thérapies immunosuppressives actuelles utilisées pour prévenir le rejet d'un organe transplanté ont des effets néfastes sur les lymphocytes T et les réponses immunitaires à médiation cellulaire (IMC), ce qui se traduit par une sensibilité accrue aux infections virales après transplantation. L'importance du rôle des lymphocytes T dans la suppression de la réplication du CMV est également mise en évidence par le fait que les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8⁺ spécifiques du CMV peuvent protéger contre la pathogenèse associée au virus. Le dénombrement des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ spécifiques du CMV chez les patients immunodéprimés et la production d'IFN- γ peuvent permettre de prédire le risque de développer une infection à CMV. La production d'IFN- γ peut être une indication fonctionnelle pour identifier des LTC spécifiques au CMV.

Le dosage QF-CMV est conçu pour détecter des réponses de l'IMC contre des antigènes peptidiques qui imitent des protéines du CMV. Les peptides du CMV sont sélectionnés de manière à cibler les lymphocytes T CD8⁺, notamment les haplotypes HLA de classe I suivants : A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 et Cw6 (A30, B13), qui couvrent > 98 % de la population humaine. Les personnes infectées par le CMV ont généralement dans leur sang des lymphocytes CD8⁺ qui reconnaissent ces antigènes. Ce processus de reconnaissance implique la génération et la sécrétion de cytokine IFN- γ . La détection et la quantification subséquente de l'IFN- γ sont à la base de ce test.

Principe de la procédure

Le test QF-CMV est effectué en deux étapes. Dans un premier temps, on prélève du sang total dans chacun des QF-CMV Blood Collection Tubes, à savoir un tube Nil Control, un tube Antigène CMV et un tube Mitogen.

Le tube Mitogen est utilisé dans le test QF-CMV à titre de contrôle positif. Son utilisation est particulièrement recommandée en cas de doute sur le statut immunitaire d'un individu. Il peut aussi servir de contrôle de la bonne manipulation et de la bonne incubation du sang.

Les tubes doivent être incubés à 37 °C aussitôt que possible et dans les 16 heures qui suivent le prélèvement. Après une période d'incubation de 16 à 24 heures, les tubes sont centrifugés, le plasma est collecté et la quantité d'IFN- γ (UI/ml) est mesurée par QF-CMV ELISA.

La quantité d'IFN- γ contenue dans les échantillons de plasma des tubes Antigène CMV et Mitogen peut souvent se situer au-dessus des limites supérieures de la plupart des lecteurs de test ELISA, même dans le cas d'individus présentant une immunosuppression modérée. Pour des résultats qualitatifs, utilisez les valeurs calculées pour le plasma non dilué. Pour des résultats quantitatifs, qui requièrent des valeurs réelles exprimées en UI/ml, les échantillons de plasma doivent être dilués à 1/10 dans le diluant vert (DV) et analysés avec le dosage ELISA conjointement avec le plasma non dilué.

Remarque : Pour les échantillons dont les valeurs se situent dans la plage de valeurs du kit QF-CMV ELISA (c'est-à-dire jusqu'à 10 UI/ml), utilisez le résultat obtenu avec l'échantillon de plasma non dilué. Pour de telles concentrations d'IFN- γ , les valeurs obtenues en utilisant la dilution 1/10 des échantillons de plasma peuvent s'avérer inexactes.

Un test est considéré comme positif à l'IFN- γ si la valeur obtenue en UI/ml pour le tube d'antigène du CMV est notablement supérieure à la valeur d'IFN- γ du tube Nil. L'échantillon de plasma stimulé par le Mitogen sert de contrôle positif d'IFN- γ pour chaque échantillon testé. Une réponse faible vis-à-vis du Mitogen constitue un résultat indéterminé si un échantillon de sang présente également une réponse négative pour les antigènes du CMV. Ce profil peut être obtenu en présence d'un nombre insuffisant de lymphocytes, d'une activité réduite des lymphocytes consécutive à une manipulation inadéquate des prélèvements, d'un remplissage/mélange insuffisant du tube Mitogen ou d'une incapacité des lymphocytes d'un patient à produire de l'IFN- γ , comme chez les patients récemment transplantés. L'échantillon Nil permet d'ajuster les échantillons de sang en fonction du fond ou de l'IFN- γ non spécifique. Le niveau d'IFN- γ du tube Nil est retranché des niveaux d'IFN- γ déterminés pour les tubes Antigène CMV et Mitogen (voir la section « Interprétation des résultats », en page 24 de cette notice pour l'interprétation des résultats du test QF-CMV).

Temps requis pour effectuer le dosage

Le temps requis à la réalisation du dosage QF-CMV est estimé ci-dessous ; le temps requis pour tester plusieurs échantillons regroupés en lots est également indiqué :

Incubation à 37 °C des tubes de sang :	16 à 24 heures
ELISA :	Environ 3 heures pour une microplaque d'ELISA
	Moins de 1 heure de travail
	Ajoutez 10 à 15 minutes pour chaque microplaque supplémentaire

Matériel fourni

Contenu du kit

Blood Collection Tubes (pack pour patient unique)	
N° de référence	0192-0301
Nombre de préparations	1
QuantiFERON Nil Control (bouchon gris)	1 tube
QuantiFERON CMV Antigen (bouchon bleu)	1 tube
QuantiFERON Mitogen Control (bouchon violet)	1 tube
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Notice des tubes de prélèvement sanguin de QF-CMV)	1

QuantiFERON-CMV ELISA	Kit 2 microplaques ELISA
N° de référence	0350-0201
Barrettes de microplaques (12 × 8 puits) enduites d'anticorps monoclonaux murins anti-IFN- γ humain	2 jeux de 12 barrettes de microplaques à 8 puits
IFN- γ humain Standard, lyophilisé (contient de l'IFN- γ humain recombinant, de la caséine bovine, du thiomersal à 0,01 % m/v)	1 × flacon (8 UI/ml après reconstitution)
Green Diluent (Diluant vert) (contient de la caséine bovine, du sérum normal de souris, du thiomersal à 0,01 % m/v)	1 × 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Concentré de conjugué 100x), lyophilisé (anticorps murins anti-IFN- γ -HRP humain, contient du thiomersal à 0,01 % m/v)	1 × 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (Concentré de tampon de lavage 20x) (pH 7,2 ; contient du ProClin® 300 à 0,05 % v/v)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Solution de substrat enzymatique) (contient du H ₂ O ₂ et du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Solution de blocage d'enzyme) (contient H ₂ SO ₄ 0,5 M)*	1 × 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (Notice du test QF-CMV ELISA)	1

* Contient de l'acide sulfurique. Voir page 9 pour les précautions d'emploi.

Matériel nécessaire, mais non fourni

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter un sarrau de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées, disponibles auprès du fournisseur des produits.

- Incubateur à 37 °C ; CO₂ non requis
- Pipettes à volume variable étalonnées pour dispenser des volumes de 10 à 1 000 µl avec embouts jetables
- Pipettes à canaux multiples étalonnées pouvant dispenser des volumes de 50 à 100 µl avec des embouts jetables
- Agitateur de microplaque
- Eau déionisée ou distillée, 2 litres
- Laveur de microplaques (laveur automatique recommandé)
- Lecteur de microplaque avec filtre à 450 nm et filtre de référence entre 620 nm et 650 nm
- Couverture de microplaque

Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter un sarrau de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, veiller à consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne en format PDF pratique et compact sur www.qiagen.com/safety, où vous pourrez trouver,

consulter et imprimer les fiches de données de sécurité correspondant à chaque trousse et composant de trousse QIAGEN®.

ATTENTION



Manipuler le sang humain comme s'il était potentiellement infectieux.
Observer les directives correspondantes de manipulation du sang.

Les avertissements et conseils de prudence suivants s'appliquent aux composants de QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Contient de l'acide sulfurique. Avertissement ! Peut être corrosif pour les métaux. Provoque une irritation cutanée. Provoque une grave irritation oculaire. Portez des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Avertissement ! Provoque une légère irritation cutanée. Portez des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

QuantiFERON Green Diluent



Contient du 5-hydroxy-1-(4-sulfophényl)-4-(4-sulfophénylazo)pyrazole-3-carboxylate de trisodium. Contient de la tartrazine. Avertissement ! Peut provoquer une allergie cutanée. Portez des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Contient : ProClin 300. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Éviter tout rejet dans l'environnement.

Informations de sécurité

Autres informations

- Le non-respect des consignes de la notice de QF-CMV peut engendrer des résultats incorrects. Lire attentivement les instructions avant toute utilisation.
- Ne pas utiliser le kit si un flacon de réactif présente des signes d'endommagement ou de fuite avant son utilisation.
- Important : Examiner les flacons avant de les utiliser. Ne pas utiliser les flacons de conjugué ou d'étalon d'IFN- γ s'ils semblent endommagés ou si l'étanchéité du joint en caoutchouc a été altérée. Ne pas manipuler de flacons cassés. Prendre les précautions nécessaires pour les mettre au rebut en toute sécurité.
Recommandation : Utiliser une pince à dessertir pour ouvrir les flacons de conjugué ou de standard IFN- γ afin de réduire les risques de blessures avec la capsule en métal.
- Ne pas mélanger ni utiliser les barrettes de microplaques, l'étalon d'IFN- γ humain, le diluant vert ou le concentré de conjugué 100x de différents lots de kit QF-CMV. Les autres réactifs (concentré de tampon de lavage 20x, solution de substrat enzymatique et solution de blocage d'enzyme) peuvent être échangés entre les kits si les réactifs ne sont pas périmés et si les détails du lot sont enregistrés.
- Éliminez les réactifs inutilisés et les échantillons biologiques conformément aux réglementations locales, régionales et nationales.
- Ne pas utiliser les QF-CMV Blood Collection Tubes ou des kits QF-CMV ELISA après la date de péremption.
- S'assurer que l'équipement de laboratoire tel que les laveurs et lecteurs de microplaques ont été calibrés/validés pour utilisation.

Stockage et manipulation des réactifs

Tubes de prélèvement sanguin

- Stockez les QF-CMV Blood Collection Tubes à une température comprise entre 4 et 25 °C.
- Les QF-CMV Blood Collection Tubes doivent être à une température comprise entre 17 et 25 °C au moment du prélèvement.
- La durée de vie des QF-CMV Blood Collection Tubes est de 15 mois au maximum à partir de la date de fabrication, à condition de les stocker à une température comprise entre 4 et 25 °C.

Réactifs de kit ELISA

- Stockez le kit entre 2 et 8 °C.
- Veiller à toujours protéger la solution de substrat enzymatique de la lumière directe du soleil.

Réactifs reconstitués et inutilisés

Pour des instructions sur la reconstitution des réactifs, voir « Étape 2 : QuantiFERON-CMV ELISA pour l'IFN- γ humain » (étapes 3 et 5 aux pages 17 et 19).

- L'étalon d'IFN- γ humain reconstitué peut être conservé jusqu'à 3 mois s'il est stocké à une température comprise entre 2 et 8 °C. Noter la date à laquelle l'étalon d'IFN- γ humain a été reconstitué.
- Une fois reconstitué, le concentré de conjugué 100x inutilisé doit être stocké à une température comprise entre 2 et 8 °C et utilisé dans les 3 mois.
Noter la date à laquelle le conjugué a été reconstitué.
- Le conjugué prêt à l'emploi doit être utilisé dans les 6 heures suivant sa préparation.
- Le tampon de lavage prêt à l'emploi peut être stocké à température ambiante (22 ± 5 °C) jusqu'à 2 semaines.

Prélèvement et manipulation des échantillons

Le test QF-CMV comprend les tubes de prélèvement sanguin suivants :

- Contrôle Nil (bouchon gris)
- Antigène du CMV (bouchon bleu)
- Contrôle Mitogen (bouchon violet)

Les antigènes sont adsorbés à l'état déshydraté sur la paroi interne des tubes de prélèvement sanguin ; il est donc essentiel que le contenu des tubes soit soigneusement mélangé avec le sang. Les tubes doivent être transférés dans un incubateur à 37 °C le plus rapidement possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement.

Pour des résultats optimaux, respectez les procédures suivantes :

1. Pour chaque sujet, prélevez 1 ml de sang par ponction veineuse directement dans chaque QF-CMV Blood Collection Tube. Cette procédure doit être effectuée par un préleveur expérimenté.

Les QF-CMV Blood Collection Tubes peuvent être utilisés jusqu'à une altitude de 810 mètres.

En cas d'utilisation des QF-CMV Blood Collection Tubes à une altitude supérieure à 810 mètres ou en cas de faible volume de sang, il est possible de prélever le sang à l'aide d'une seringue avant d'en transférer immédiatement 1 ml dans chacun des trois tubes. Pour des raisons de sécurité, la meilleure procédure consiste à retirer l'aiguille de la seringue, à suivre les procédures de sécurité appropriées, à retirer les bouchons des trois QF-CMV Blood Collection Tubes et à ajouter 1 ml de sang dans chacun d'entre eux (jusqu'à la marque noire située sur le côté de l'étiquette du tube). Replacer correctement les bouchons des tubes et mélanger comme décrit ci-dessous. Dans la mesure où l'écoulement sanguin se fait relativement lentement dans les tubes de 1 ml, maintenez le tube sur l'aiguille pendant 2 à 3 secondes après que le tube semble complètement rempli, afin de garantir le prélèvement d'un volume adéquat.

La marque noire située sur le côté des tubes indique le volume de remplissage à 1 ml. Les QF-CMV Blood Collection Tubes ont été validés pour des volumes compris entre 0,8 et 1,2 ml. Si le niveau de sang d'un tube n'est pas situé près de la marque, un nouvel échantillon sanguin doit être prélevé.

Si le prélèvement sanguin est effectué avec une aiguille à ailettes, un tube de « purge » doit être utilisé pour que la tubulure soit remplie de sang avant que les QF-CMV Blood Collection Tubes ne soient employés.

Le sang peut aussi être prélevé dans un seul tube de prélèvement sanguin générique contenant de l'héparine de lithium comme anticoagulant avant d'être transféré vers les QF-CMV Blood Collection Tubes. Utilisez uniquement l'héparine de lithium comme anticoagulant, car les autres anticoagulants peuvent interférer avec le dosage. Remplissez un tube de prélèvement sanguin (volume minimal 5 ml) et mélangez doucement en retournant le tube plusieurs fois pour dissoudre l'héparine. Cette procédure doit être effectuée par un préleveur expérimenté. Le sang doit rester à température ambiante (22 ± 5 °C) avant d'être transféré dans les QF-CMV Blood Collection Tubes pour l'incubation, qui doit impérativement être lancée dans les 16 heures suivant le prélèvement sanguin.

2. Immédiatement après avoir rempli les QF-CMV Blood Collection Tubes, agitez-les 10 fois suffisamment fort pour vous assurer que toute la paroi interne des tubes est enduite de sang afin de dissoudre les antigènes adsorbés.

Les tubes doivent être à une température de 17 à 25 °C au moment du remplissage.

Une agitation excessive peut provoquer la perturbation du gel et générer des résultats aberrants.

Si le sang a été prélevé dans un tube d'héparine de lithium, les échantillons doivent être mélangés de façon homogène avant d'être répartis dans les QF-CMV Blood Collection Tubes. Assurez-vous que le sang est bien mélangé en retournant doucement le tube juste avant de répartir les échantillons. Déposez des aliquotes de 1 ml (un par tube de prélèvement sanguin de QF-CMV) dans les tubes appropriés : tube Nil, tube Antigène CMV et tube Mitogen. Cela doit être effectué dans des conditions d'asepsie dans le respect des procédures de sécurité adéquates, en

retirant les bouchons des trois QF-CMV Blood Collection Tubes et en ajoutant 1 ml de sang dans chacun des tubes (jusqu'à la marque noire située sur le côté de l'étiquette du tube). Replacer correctement les bouchons des tubes et mélanger comme décrit ci-dessus.

3. Étiqueter les tubes de façon appropriée.

Veillez à ce que chaque tube (Nil, Antigène CMV, Mitogen) soit identifiable par son étiquette ou par d'autres moyens.

4. Après avoir été remplis, agités et étiquetés, les tubes doivent être transférés dans un incubateur à 37 ± 1 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement. Avant l'incubation, maintenez les tubes à température ambiante (22 ± 5 °C). Ne pas réfrigérer ni congeler les échantillons sanguins.

Procédure

Étape 1 : Incubation du sang et collecte du plasma

1. Incubez les tubes en position VERTICALE à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 16 à 24 heures. L'incubateur ne requiert ni CO_2 ni humidification.

Important : Si le sang n'est pas incubé immédiatement après le prélèvement, remélangez les tubes en les retournant 10 fois avant l'incubation.

Après l'incubation, les tubes de prélèvement sanguin peuvent être stockés entre 4 et 27 °C jusqu'à 3 jours avant d'être centrifugés.

2. Après l'incubation des tubes à 37 °C, la collecte du plasma est facilitée si les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes avec une FCR entre 2 000 et 3 000 (g). La couche de gel doit alors séparer les cellules du plasma. Si ce n'est pas le cas, les tubes doivent être recentrifugés.

Il est possible de collecter le plasma sans centrifugation, mais il faut faire particulièrement attention à le retirer sans perturber les cellules.

3. Après la centrifugation, éviter de mélanger le plasma par aspiration-refoulement avec la pipette ou par tout autre moyen avant de le collecter. Pendant l'ensemble de la procédure, prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel.

Important : Les échantillons de plasma doivent être collectés uniquement à l'aide d'une pipette.

Les échantillons de plasma peuvent être déposés directement sur la microplaque de QF-CMV ELISA à partir des tubes de prélèvement sanguin centrifugés, même en cas d'utilisation d'une station de travail ELISA automatisée.

Les échantillons de plasma peuvent être stockés dans des QF-CMV Blood Collection Tubes centrifugés pendant 28 jours entre 2 et 8 °C ou, si le plasma a été collecté, en dessous de -20 °C (de préférence en dessous de -70 °C) pour les périodes prolongées.

Pour des échantillons de test corrects, collectez au moins 150 µl de plasma.

Étape 2 : QuantiFERON-CMV ELISA pour l'IFN- γ humain

Reportez-vous à la section « Contenu du kit », page 8 et à la section « Matériel nécessaire, mais non fourni », page 9, pour connaître le matériel nécessaire à la réalisation du test ELISA.

1. L'ensemble des échantillons de plasma et des réactifs, sauf le conjugué concentré 100x, doit être amené à température ambiante (22 ± 5 °C) avant d'être utilisé. Attendre au moins 60 minutes pour la stabilisation.

2. Retirez du cadre les barrettes ELISA superflues, remettez-les dans la poche en aluminium fermée et replacez-les au réfrigérateur pour les stocker jusqu'à leur utilisation.

Prenez au moins une barrette pour les étalons de test QF-CMV ELISA et suffisamment de barrettes pour le nombre de patients testés. Après utilisation, conserver le cadre et le couvercle pour une utilisation ultérieure avec les barrettes restantes.

3. Reconstituez l'étalon IFN- γ avec le volume d'eau déionisée ou distillée indiqué sur l'étiquette du flacon. Mélangez délicatement afin d'éviter la formation de mousse et de garantir une resububilisation complète. La reconstitution de l'étalon d'IFN- γ au volume indiqué produit une solution à la concentration de 8,0 UI/ml.

Remarque : Le volume de reconstitution d'étalon IFN- γ humain (étalon du kit) diffère selon les lots.

À l'aide de l'étalon reconstitué, préparez une série de dilution de quatre concentrations d'IFN- γ dans le diluant vert (Figure 1, page suivante). S1 (étalon 1) contient 4,0 UI/ml, S2 (étalon 2) contient 1,0 UI/ml, S3 (étalon 3) contient 0,25 UI/ml et S4 (étalon 4) contient 0 UI/ml (DV seul). Les étalons doivent être testés au moins en double. Préparer des dilutions fraîches de l'étalon du kit pour chaque session ELISA.

Exemple de procédure pour les étalons dupliqués

Exemple de procédure pour les étalons dupliqués	
A	Étiquetez quatre tubes : S1, S2, S3, S4
B	Ajouter 150 µl de DV à S1, S2, S3, S4
C	Ajouter 150 µl de l'étalon du kit à S1 et mélanger soigneusement
D	Transférer 50 µl de S1 à S2 et mélanger soigneusement
E	Transférer 50 µl de S2 à S3 et mélanger soigneusement
F	Le DV seul sert d'étalon zéro (S4)

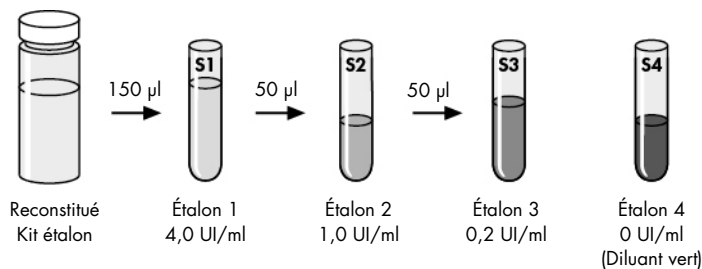


Figure 1. Préparation d'une courbe d'étalonnage par dilution en série.

4. Reconstituez le concentré de conjugué 100x lyophilisé avec 0,3 ml d'eau déionisée ou distillée. Mélanger délicatement afin de réduire la formation de mousse et de garantir une solubilisation complète du conjugué.

Le conjugué prêt à l'emploi est préparé en diluant la quantité requise de concentré de conjugué 100x reconstitué dans le diluant vert (voir Tableau 1 page suivante).

Mélangez soigneusement mais doucement pour éviter la formation de mousse.

Ramener tout concentré de conjugué 100x non utilisé à une température comprise entre 2 et 8 °C immédiatement après utilisation.

Utiliser uniquement le diluant vert.

Tableau 1. Préparation du conjugué prêt à l'emploi

Nombre de barrettes	Volume de conjugué concentré 100x	Volume de diluant vert
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. Pour les échantillons de plasma collectés dans les tubes de prélèvement sanguin puis congelés ou stockés pendant plus de 24 heures avant le dosage, mélangez soigneusement avant l'ajout au puits ELISA.

Important : Si les échantillons de plasma sont ajoutés directement depuis les QF-CMV Blood Collection Tubes centrifugés, tout mélange du plasma doit être évité. Pendant l'ensemble de la procédure, prenez garde à ne pas perturber les substances sur la surface du gel.

6. Si des résultats quantitatifs sont requis, diluez également les plasmas CMV et Mitogen à 1/10 avec le diluant vert (10 µl de plasma + 90 µl de GD). Le plasma Nil ne doit pas être dilué.

Il est recommandé de tester en parallèle les échantillons suivants :

Nil, Antigène CMV, Mitogen, Antigène CMV (1/10), Mitogen (1/10)

Toutefois, les options d'échantillon de patients suivants sont également traitées par le QuantiFERON-CMV Analysis Software :

Nil, Antigène CMV, Mitogen

Nil, Antigène CMV (1/10), Mitogen (1/10)

Nil, Antigène CMV, Mitogen, Antigène CMV (1/10)

Nil, Antigène CMV (1/10), Mitogen

7. Ajoutez 50 µl du conjugué prêt à l'emploi fraîchement préparé dans les puits ELISA requis à l'aide d'une pipette à canaux multiples.
8. Ajoutez 50 µl d'échantillons de plasma aux puits appropriés. Enfin, ajoutez 50 µl de chacun des étalons 1 à 4 aux puits appropriés. Les étalons doivent être testés au moins en double.
9. Couvrez la microplaque ELISA avec le couvercle et mélangez le conjugué et les échantillons/étalons de plasma soigneusement en utilisant un agitateur de microplaque pendant 1 minute entre 500 et 1 000 tr/min. Éviter les projections de liquide.
10. Recouvrez la microplaque ELISA avec le couvercle et incubez à température ambiante (22 ± 5 °C) pendant 120 ± 5 minutes.

Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation. Le non-respect de la plage de températures spécifiée peut fausser les résultats.

11. Pendant l'incubation, préparez le tampon de lavage prêt à l'emploi. Diluer une mesure du concentré du tampon de lavage 20x avec 19 mesures d'eau déionisée ou distillée et mélanger soigneusement.

Une quantité suffisante de concentré de tampon de lavage 20x est fournie pour préparer 2 litres de tampon de lavage prêt à l'emploi.

12. Quand l'incubation de la microplaque ELISA est terminée, effectuez au moins six cycles de lavage des puits avec 400 µl de tampon de lavage prêt à l'emploi. Il est recommandé d'utiliser un laveur de plaques automatique.

Important : Il est essentiel de procéder soigneusement au lavage avant d'exécuter le dosage. Veillez à ce que chaque puits soit rempli à ras bord de tampon de lavage pour chaque cycle de lavage. Un temps de trempage d'au moins 5 secondes est recommandé entre chaque cycle.

Un désinfectant de laboratoire standard doit être ajouté au réservoir d'effluent et les procédures établies pour la décontamination de matériel potentiellement infectieux doivent être suivies.

13. Placez les microplaques face vers le bas sur une serviette absorbante non pelucheuse pour éliminer tout résidu de tampon de lavage. Ajoutez 100 µl de solution de substrat enzymatique dans chaque puits, couvrez la microplaque et mélangez soigneusement à l'aide d'un agitateur de microplaque entre 500 et 1 000 tr/min pendant 1 minute.
14. Couvrir chaque microplaque et incubé à température ambiante ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) pendant 30 minutes. Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.
15. Après l'incubation de 30 minutes, ajoutez 50 µl de solution de blocage d'enzyme dans chaque puits dans l'ordre que vous avez suivi pour ajouter le substrat et agitez soigneusement entre 500 et 1 000 tr/min à l'aide d'un agitateur de microplaque.
16. Mesurer la densité optique (DO) de chaque puits au cours des 5 minutes suivant l'arrêt de la réaction en utilisant un lecteur de microplaque équipé d'un filtre à 450 nm et d'un filtre de référence entre 620 nm et 650 nm. Les valeurs de DO sont utilisées pour calculer les résultats.

Calculs et interprétation du test

Le QuantiFERON-CMV Analysis Software, permettant l'analyse des données brutes et le calcul des résultats, est disponible auprès de QIAGEN à l'adresse www.QuantiFERON.com. Assurez-vous d'utiliser la version la plus récente du QuantiFERON-CMV Analysis Software.

Le logiciel effectue une évaluation de contrôle qualité du dosage, génère une courbe d'étalonnage et fournit un résultat de test pour chaque sujet, comme détaillé dans la section « Interprétation des résultats » page 24. Le logiciel rapporte la dilution la plus faible générant un résultat compris dans la plage de QF-CMV ELISA, en prenant en compte le facteur de dilution.

Au lieu d'utiliser le QuantiFERON-CMV Analysis Software, vous pouvez calculer les résultats en appliquant la méthode suivante.

Génération de la courbe d'étalonnage (si le QuantiFERON-CMV Analysis Software n'est pas utilisé)

Déterminer les valeurs de DO moyennes des réplicats de l'étalon du kit pour chaque plaque.

Établir une courbe d'étalonnage $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ en traçant le $\log_{(e)}$ de la DO moyenne (axe des y) en fonction du $\log_{(e)}$ de la concentration en IFN- γ des étalons en UI/ml (axe des x), en omettant l'étalon zéro dans ces calculs. Calculez la droite d'ajustement optimal pour la courbe d'étalonnage à l'aide d'une analyse de régression.

Utiliser la courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration en IFN- γ (UI/ml) de chacun des échantillons de plasma du test à l'aide de la valeur de DO de chaque échantillon.

Ces calculs peuvent être effectués à l'aide des packs logiciels disponibles avec les lecteurs de microplaque ainsi qu'avec les tableurs ou logiciels statistiques classiques (comme Microsoft® Excel®). Il est recommandé d'utiliser ces packs logiciels pour calculer l'analyse de régression, le coefficient de variation (CV en %) pour les étalons et le coefficient de corrélation (r) de la courbe d'étalonnage.

Le résultat rapporté doit provenir de la dilution la plus faible générant un résultat compris dans la plage de QF-CMV ELISA, en prenant en compte le facteur de dilution le cas échéant.

Contrôle qualité du test

L'exactitude des résultats du test dépend de l'exactitude de la génération de la courbe d'étalonnage. Il faut donc examiner les résultats dérivés des étalons avant d'interpréter les résultats des échantillons de test.

Pour que le test ELISA soit valide :

- La valeur de DO moyenne de l'étalon 1 doit être $\geq 0,600$.
- Le %CV des valeurs de DO des répliquats de l'étalon 1 et de l'étalon 2 doit être $< 15 \%$.
- Les valeurs de DO des répliquats des étalons 3 et 4 ne doivent pas s'écarter de plus de 0,040 unités de densité optique de leur valeur moyenne.
- Le coefficient de corrélation (r) calculé à partir des valeurs d'absorbance moyennes des étalons doit être $\geq 0,98$.

Le QuantiFERON-CMV Analysis Software calcule et rapporte ces paramètres de contrôle qualité. Si les critères ci-dessus ne sont pas respectés, le cycle d'exécution n'est pas valide et doit être répété.

La valeur de DO moyenne de l'étalon zéro (diluant vert) doit être $\leq 0,150$. Si la valeur de DO moyenne est $> 0,150$, la procédure de lavage de microplaque doit être réévaluée.

Interprétation des résultats

Les résultats du test QuantiFERON-CMV sont interprétés en fonction des critères du Tableau 2.

Tableau 2. Interprétation des résultats de QuantiFERON-CMV

Nil (UI/ml)	CMV moins Nil (UI/ml)	Mitogen moins Nil (UI/ml)*	Résultat de QF-CMV	Rapport/interprétation
≤8,0	≥ 0,20 et ≥ 25 % de Nil	Tous	Réactif†	Immunité anti-CMV détectée
	< 0,20 OU ≥ 0,20 et < 25 % de Nil	≥ 0,5	Non réactif	Immunité anti-CMV NON détectée
		< 0,5	Indéterminé‡	Les résultats sont indéterminés en ce qui concerne la réactivité vis-à-vis du CMV
> 8,0§	Tous	Tous	Indéterminé‡	Les résultats sont indéterminés en ce qui concerne la réactivité vis-à-vis du CMV

* Les réponses au contrôle positif Mitogen (et occasionnellement aux antigènes du CMV) peuvent souvent être situées en dehors de la plage du lecteur de microplaque. Cela n’a pas d’impact sur les résultats du test.

† Si une infection au cytomégalo virus n’est pas suspectée, les résultats initialement positifs peuvent être confirmés par un nouveau test des échantillons de plasma originaux en double dans le test QF-CMV ELISA. Si le test répété d’un ou de plusieurs réplicats est positif, l’individu doit être considéré comme positif au test.

‡ Voir le « Guide de résolution de problèmes » (page 41) pour les causes possibles.

Les études cliniques (1) ont montré qu’un résultat indéterminé parmi les patients ayant reçu une greffe d’organe solide, dans le cas où un donneur est positif au CMV mais où le contrôle Mitogen est inférieur à 0,5 UI/ml, était cliniquement significatif. Ces patients présentent le risque le plus élevé de contracter une maladie à CMV.

§ Dans les études cliniques, moins de 0,25 % des sujets présentaient des taux d’IFN-γ > 8,0 UI/ml pour la valeur Nil.

Remarque : Le niveau d’IFN-γ mesuré doit être utilisé conjointement avec la présentation clinique, les antécédents médicaux et d’autres indicateurs cliniques, lors de l’établissement du statut immunitaire d’un patient vis-à-vis des antigènes du CMV. Le test QF-CMV n’est pas conçu pour déterminer une infection à CMV et ne doit pas être utilisé pour exclure une infection à CMV.

Limitations

Les résultats du test QuantiFERON-CMV doivent être utilisés conjointement avec les antécédents épidémiologiques de chaque patient, son statut médical actuel et d'autres évaluations diagnostiques.

Des résultats peu fiables ou indéterminés peuvent être obtenus en cas de :

- Non-respect de la procédure décrite dans la notice de QuantiFERON-CMV ELISA
- Niveaux excessifs d'IFN- γ dans le tube de contrôle
- Délai de plus de 16 heures entre le prélèvement de l'échantillon sanguin et l'incubation à 37 °C.

Valeurs attendues

Les valeurs attendues d'IFN- γ avec QuantiFERON-CMV ont été obtenues à partir de 591 échantillons de sujets sains. 343 échantillons étaient séropositifs et 248 étaient séronégatifs pour les IgG du CMV. Le statut sérologique anti-CMV était inconnu au moment du test QF-CMV. Parmi les 248 échantillons issus de sujets séronégatifs au CMV, 100 % (248/248) des échantillons testés étaient négatifs au test QF-CMV ELISA, avec des réponses d'IFN- γ < 0,2 UI/ml dans le tube antigène du CMV (moins la valeur Nil). La répartition des réponses d'IFN- γ dans le tube antigène du CMV (moins la valeur Nil) pour les 343 sujets séropositifs au CMV est indiquée (Figure 2).

Nombre d'échantillons

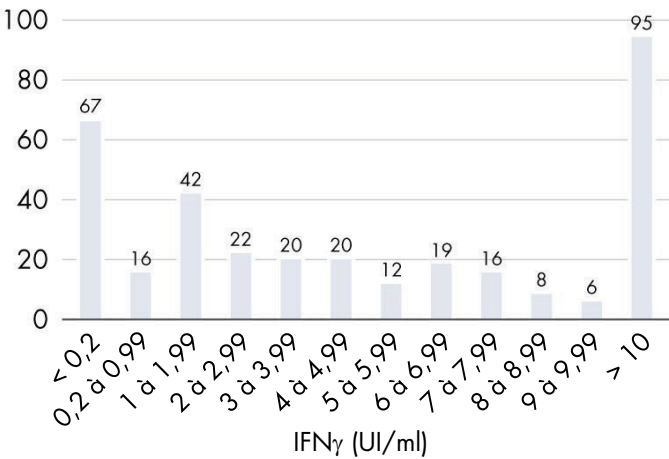


Figure 2. Répartition des réponses d'IFN- γ au QF-CMV (moins la valeur Nil) chez les sujets séropositifs sains (n = 343).

La répartition des réponses IFN- γ dans le tube Mitogen (moins la valeur Nil) a été déterminée sur la base de 733 échantillons prélevés sur des adultes sains à l'aide du test QF-CMV ELISA, indépendamment de la sérologie pour les IgG anti-CMV (Figure 3). Un résultat avec le tube Mitogen (moins la valeur Nil) inférieur à 0,5 UI/ml indique que le test a échoué ou que le sujet présente un état immunocompromis. Dans une population d'individus sains, seuls 2 résultats sur 733 appartenant à cette catégorie ont été enregistrés.

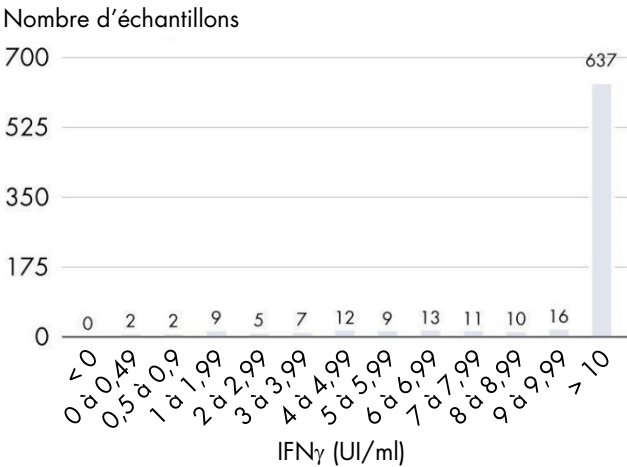


Figure 3. Répartition des réponses d'IFN- γ pour le Mitogen (moins la valeur Nil) chez les sujets sains (n = 733).

La répartition des réponses d'IFN- γ des tubes Nil a été déterminée avec 1 020 échantillons de plasma prélevés sur des sujets sains à l'aide du test QF-CMV ELISA, indépendamment de la sérologie pour les IgG anti-CMV (Figure 4).

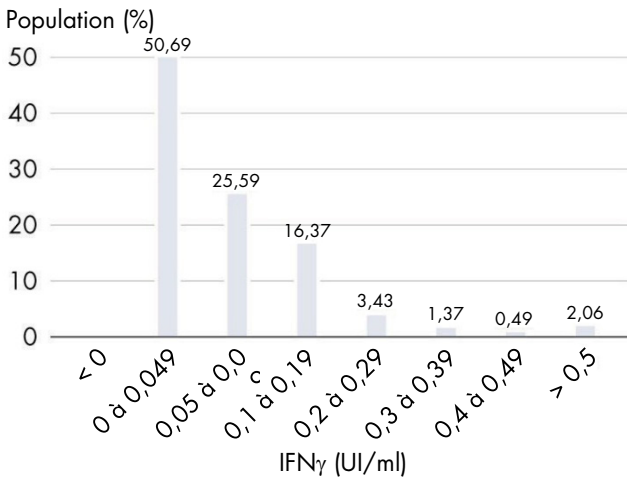


Figure 4. Distribution des réponses IFN- γ du tube Nil chez des individus sains (n = 1 020) exprimée en pourcentage de la population.

Caractéristiques de performances

Performances cliniques

Une valeur seuil de test, destinée à déceler une exposition antérieure au CMV en utilisant le test QF-CMV, a été établie après une analyse des résultats obtenus avec un groupe d'individus sains (n = 223), où les résultats du test QF-CMV ont été comparés aux résultats sérologiques pour les IgG anti-CMV. Une analyse ROC a déterminé qu'un seuil de test de 0,04 UI/ml (après soustraction de Nil) fournissait des valeurs prédictives positives et négatives optimales pour le QF-CMV (aire sous la courbe = 0,9679 [IC à 95 % : 0,9442–0,9915, p < 0,0001]) et représentait ainsi le seuil pour lequel le dosage assurait sa fonction prévue le plus efficacement dans une population d'individus sains.

Les performances du dosage QF-CMV ont été comparées à celles du test sérologique à base d'IgG anti-CMV SeraQuest™ (Quest International). Le dosage QF-CMV a montré 95 % (294 individus sur 310) de conformité avec le test sérologique à base d'IgG anti-CMV chez des individus sains, aucun des 149 donneurs séronégatifs n'étant positif au test QF-CMV. 145 donneurs séropositifs sur 161 ont eu une réponse positive au test QF-CMV. La concordance positive globale était de 90 % et la valeur de concordance négative de 100 %. Le niveau de concordance chez les individus sains entre les réponses au test QF-CMV et le statut sérologique à base d'IgG anti-CMV est indiqué dans le Tableau 3.

Tableau 3. Concordance entre le test QuantiFERON-CMV et le test sérologique à base d'IgG anti-CMV chez des individus sains

		Sérologie du CMV		Total
		Positive (Positif)	Negative (Négatif)	
QuantiFERON-CMV	Réactif	145	0	145 (46,8 %)
	Non réactif	16	149	165 (53,2 %)
	Total	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Seuil du dosage

Le seuil clinique recommandé pour ce dosage est de 0,2 UI/ml dans le tube antigène du CMV (moins la valeur Nil), bien que des seuils différents puissent être validés pour des contextes cliniques différents.

Études cliniques

En l'absence de normes définitives permettant de confirmer ou d'exclure le diagnostic d'une infection à cytomégalovirus, une estimation de la sensibilité et de la spécificité du test QF-CMV ne peut pas être réalisée dans la pratique. La spécificité et la sensibilité du test QF-CMV ont été estimées en évaluant le niveau de concordance entre les réponses au test QF-CMV et le statut sérologique pour les IgG anti-CMV chez des individus sains.

La spécificité du test QF-CMV a été estimée en évaluant les faux positifs (réponses positives avec le test QF-CMV) dans des échantillons de donneurs sains sans preuve d'une exposition antérieure au CMV (individus séronégatifs au test à base d'IgG anti-CMV). La sensibilité a été estimée en évaluant la réactivité au test QF-CMV d'échantillons prélevés sur des donneurs sains présentant une preuve d'exposition antérieure au CMV (individus séropositifs au test à base d'IgG anti-CMV). Le test QF-CMV utilise un grand nombre d'épitopes spécifiques au CMV issus de diverses protéines du CMV, offrant ainsi une large couverture de la population présentant différents haplotypes de HLA de classe I (environ 98 % de la population). Dans la mesure où les haplotypes de HLA des sujets testés pour la sérologie du CMV n'étaient pas connus, il était prévu qu'il n'y ait pas de réaction dans les QF-CMV Blood Collection Tubes pour un faible pourcentage d'individus de sérologie positive.

Spécificité

Dans une étude réalisée sur 591 échantillons prélevés sur des individus sains, aucun faux positif n'a été détecté parmi les résultats de test QF-CMV chez les individus séronégatifs au test à base d'IgG anti-CMV, avec 248 échantillons sur 248 négatifs au test QF-CMV ELISA et négatifs au test sérologique à base d'IgG anti-CMV. Par conséquent, les résultats obtenus à l'aide du test QF-CMV et du test sérologique CMV IgG ont montré une concordance de 100 %.

Dans toutes les autres évaluations de la spécificité réalisées sur des patients transplantés avec un organe solide (1 à 8), sur des patients transplantés avec des cellules-souches hématopoïétiques (9,10) et sur des patients infectés par le VIH (11), le niveau de concordance entre le test QF-CMV et le test sérologique à base d'IgG anti-CMV était également de 100 %.

Sensibilité

Dans une étude réalisée à partir de 343 échantillons prélevés sur des individus sains séropositifs au test à base d'IgG anti-CMV, le niveau de concordance entre les réponses au test QF-CMV et les résultats sérologiques à base d'IgG anti-CMV était de 80,5 % avec 276 échantillons sur 343 positifs au test QF-CMV et positifs au test sérologique à base d'IgG anti-CMV. La discordance observée peut être due à une sérologie CMV faussement positive ou à l'absence de types HLA réactifs chez les individus testés.

Les niveaux de concordance des évaluations de la sensibilité réalisées sur des patients transplantés avec un organe solide (1 à 8), des patients transplantés avec des cellules-souches hématopoïétiques (9,10) et des patients infectés par le VIH (11) se sont avérés plus faibles. Cela peut provenir de faux positifs au CMV parmi les résultats sérologiques, de l'absence de types de HLA réactifs chez les individus testés ou de l'absence de lymphocytes T réactifs chez ces patients en raison de leur immunosuppression.

Études validant l'utilité clinique

L'utilisation prévue du test sérologique à base d'IgG anti-CMV et du test QF-CMV est de permettre la détection de l'immunité contre le CMV. Dans un contexte de transplantation, la sérologie du CMV est largement utilisée avant la transplantation pour établir les risques de complications liées au CMV qui sont encourus par le receveur après la transplantation, mais ne présente qu'une valeur limitée après la transplantation. Le test QF-CMV peut également être utilisé chez des patients transplantés pour évaluer le niveau d'immunité spécifique au CMV chez ces patients présentant un risque de développer une infection symptomatique au CMV et/ou une maladie due à l'immunosuppression (12 à 15).

Un certain nombre d'études cliniques publiées menées sur diverses cohortes de patients transplantés ont démontré l'utilité du test QuantiFERON-CMV (1 à 11, 15, 16).

Dans le cadre d'une vaste étude réalisée sur 108 patients transplantés avec un organe solide (4), les patients présentant un résultat positif au test QF-CMV à la fin de la prophylaxie anti-CMV affichaient un taux notablement plus faible de contraction ultérieure d'une maladie à CMV (3,3 % ou 1/30 ; avec un seuil de test de 0,2 UI/ml) par rapport aux patients présentant un résultat négatif au test QF-CMV (21,8 % ou 17/78, $p = 0,044$) (Figure 5).

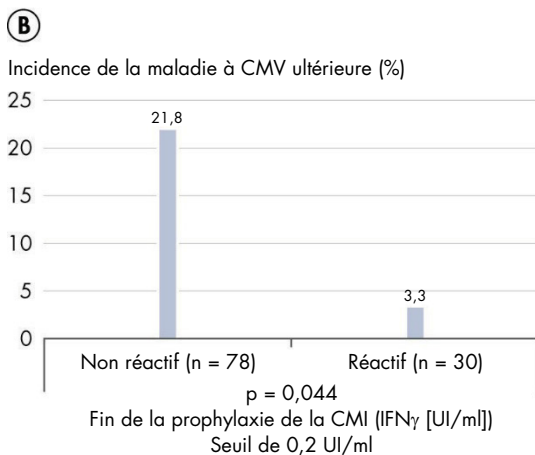
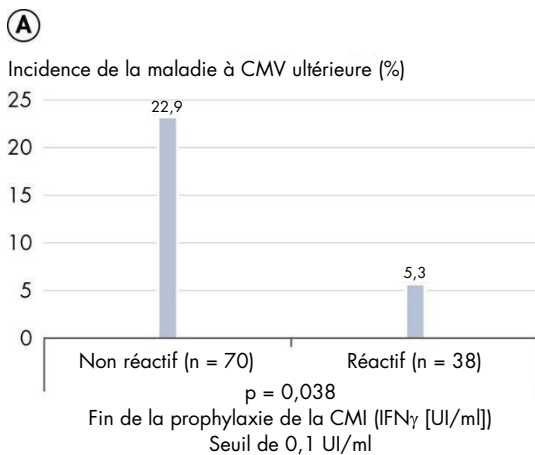


Figure 5. Taux de survenue tardive d'une maladie à CMV chez des patients présentant un résultat positif au test QuantiFERON-CMV comparé à ceux présentant un résultat négatif au test QuantiFERON-CMV à la fin de la prophylaxie. Données provenant de Kumar et coll. (4).

En outre, les patients séronégatifs pour le CMV transplantés avec un organe provenant d'un donneur séropositif pour le CMV (D+R-) présentant un résultat positif au test QF-CMV à la fin de la prophylaxie étaient moins fréquemment affectés d'une maladie à CMV et ce, sur des périodes plus longues, ce qui indique que le test QF-CMV peut être utilisé pour identifier les patients présentant un risque de survenue tardive d'une maladie à CMV.

Cette étude a également mis en évidence que, dans cette cohorte de patients transplantés présentant le risque le plus élevé de développer une infection à CMV (D+/R-), un résultat réactif à tout moment après la prophylaxie était associé à un risque plus faible de développer une infection à CMV.

Dans une étude portant sur 37 patients ayant subi une transplantation d'organe solide (6), l'évaluation des réponses des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du CMV par QF-CMV a permis de prédire la clairance virale spontanée par rapport à la progression de la maladie à CMV, à la suite d'une augmentation de la virémie à CMV. Dans cette étude, 24 patients sur 26 (92,3 %) présentant un résultat réactif au test QF-CMV (avec un seuil de test IFN- γ \geq 0,2 UI/ml) ont spontanément éliminé le virus CMV, tandis que seuls 5 patients sur 11 (45,5 %) présentant un résultat non réactif au test QF-CMV ont obtenu le même résultat.

Une étude portant sur 67 receveurs d'une greffe pulmonaire et évaluant les épisodes de virémie à CMV après la greffe (7) a observé que 18 sur 25 (72 %) des épisodes de virémie à CMV étaient précédés d'un résultat non réactif au test QF-CMV, contre 4 sur 16 (25 %) des épisodes précédés d'une réponse réactive au test QF-CMV (test exact de Fisher, $p = 0,0046$; Figure 6).

Épisodes d'ADNémie à HCMV avec une charge virale > 1 000 copies/ml (%)

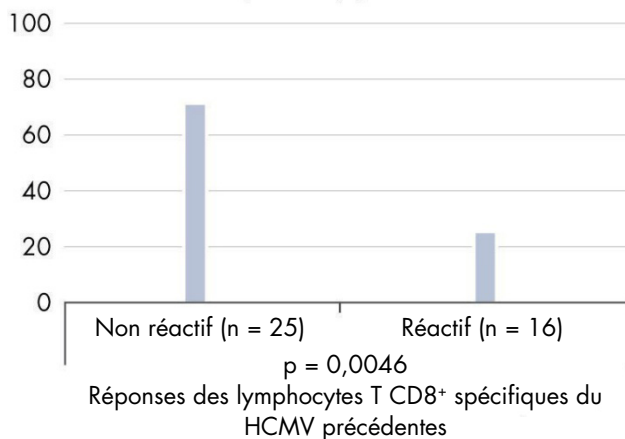


Figure 6. Analyse statistique des réponses de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au CMV, détectées par le test QuantiFERON-CMV et du développement d'une virémie à CMV (test exact de Fisher, p = 0,0046). Données provenant de Weseslindtner et coll. (7).

Dans le cadre d'une vaste étude prospective multicentrique sur 127 patients séronégatifs au CMV, receveurs d'un organe solide provenant de donneurs séropositifs au CMV (8), ayant tous reçu un traitement antiviral de prophylaxie, les patients présentant un résultat positif au test QF-CMV (avec un seuil de test de 0,1 UI/ml) après la fin de la prophylaxie anti-CMV affichaient un taux notablement plus faible de survenue tardive d'une maladie 12 mois après la transplantation (6,4 %), par rapport à ceux présentant un résultat négatif au test QF-CMV (22,2 %) et ceux ayant un résultat indéterminé (58,3 %, p < 0,001). Lorsque les résultats indéterminés ont également été classés comme « non réactifs », l'incidence de la maladie à CMV ultérieure était de 6,4 % contre 26,8 %, p = 0,024. Les valeurs prédictives positives et négatives du test QF-CMV pour une protection contre une maladie à CMV étaient de respectivement 0,90 (IC 95 % de 0,74 à 0,98) et 0,27 (IC 95 % de 0,18 à 0,37). Il ressort de cette étude que le test QF-CMV peut s'avérer utile pour prédire si un patient présente un risque faible, intermédiaire ou élevé de développement ultérieur d'une maladie liée au CMV après la prophylaxie.

Dans une étude prospective sur 55 patients transplantés avec un organe solide (8) analysant la relation entre les résultats du test QF-CMV avant transplantation et les épisodes de réplication du CMV après transplantation, une incidence plus élevée de réplication du CMV après transplantation a été observée chez les receveurs séropositifs au CMV présentant un résultat négatif (avec un seuil de test de 0,2 UI/ml) au test QF-CMV avant transplantation (7 sur 14 ou 50 %), par rapport aux receveurs séropositifs au CMV présentant un résultat positif au test QF-CMV avant transplantation (4 sur 30 ou 13,3 %, $p = 0,021$).

Cette étude a révélé que les receveurs présentant une réponse QF-CMV non réactive avant la transplantation et ayant reçu un organe d'un donneur séropositif pour le CMV avaient un risque dix fois plus élevé de réplication du CMV que les receveurs présentant une réponse QF-CMV réactive avant la transplantation (OR ajusté 10,49, IC à 95 % de 1,88 à 58,46). Par conséquent, un dosage QF-CMV pré-transplantation peut être utile pour prédire le risque de réplication du CMV après la transplantation et permettre ainsi une prise en charge individualisée de l'infection à CMV après une transplantation d'organe solide.

Un certain nombre d'autres études portant sur la détection de réponses de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au CMV à l'aide du test QF-CMV dans une cohorte de patients transplantés sont à présent terminées (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) ou sont en cours de réalisation partout dans le monde.

Lignes directrices internationales consensuelles sur la prise en charge du cytomégalo­virus dans la transplantation d'organes solides

L'importance de la surveillance d'une immunité spécifique au CMV a été reconnue et publiée dans le document « *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* » (Mise à jour des directives de consensus international en matière de prise en charge du cytomégalo­virus dans la transplantation d'un organe solide) (12). Ces lignes directrices internationales, élaborées par un groupe d'experts sur le CMV et la transplantation d'organes solides, réuni par la section des maladies infectieuses de la Transplantation Society, représentent des lignes directrices consensuelles fondées sur des preuves et des avis d'experts concernant la prise en charge du CMV, notamment : le diagnostic, l'immunologie, la prévention et le traitement.

Ces lignes directrices ont conclu que « la surveillance immunitaire des réponses des lymphocytes T spécifiques au CMV peut permettre de prédire les personnes à risque de développer une infection à CMV après une transplantation et peut être utile pour orienter la prophylaxie et les traitements préventifs » (12).

En outre, les lignes directrices fournissaient également des recommandations concernant les caractéristiques idéales d'un dosage de surveillance immunitaire, notamment :

- La capacité d'évaluer la quantité et la fonction des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de receveurs d'une transplantation
- La capacité de doser l'IFN- γ
- Une réalisation aisée, un coût réduit et la reproductibilité
- Des délais de mise en œuvre courts
- La livraison aisée des échantillons à des laboratoires référents spécialisés

Le dosage QF-CMV satisfait pratiquement tous les critères spécifiés dans ces directives et représente le seul dosage de surveillance immunitaire standardisé capable de détecter l'IFN- γ et spécifique au CMV.

Caractéristiques de performances du dosage

Le dosage QF-CMV ELISA utilise un étalon d'IFN- γ humain recombinant analysé sur la base d'une préparation d'IFN- γ de référence (réf. NIH : Gxg01-902-535). Les résultats des échantillons de test sont exprimés en unités internationales (UI) selon une courbe d'étalonnage préparée en testant la dilution de l'étalon secondaire fourni dans le kit.

Il est reconnu que la présence d'anticorps hétérophiles (par exemple, des anticorps humains anti-souris) dans le sérum ou le plasma de certains individus peut interférer avec les dosages immuno-enzymatiques. L'effet des anticorps hétérophiles sur le test QF-CMV ELISA est réduit au minimum par l'ajout de sérum normal de souris au diluant vert et par l'utilisation de fragments F(ab')₂ d'anticorps monoclonaux comme anticorps de capture anti-IFN- γ absorbés dans les puits de la microplaque.

La limite de détection du test QF-CMV ELISA est de 0,065 UI/ml et il n'existe aucune preuve d'un effet crochet à haute dose (prozone) avec les concentrations d'IFN- γ jusqu'à 10 000 UI/ml. Aucune réaction croisée n'a été observée entre les anticorps du test QF-CMV ELISA et les cytokines testées, y compris IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 et IL12.

Il a été démontré que le test QF-CMV ELISA est linéaire. Pour ce faire, cinq réplicats de 11 pools de plasma de concentrations d'IFN- γ connues ont été placés de manière aléatoire sur la microplaque ELISA. La droite de régression linéaire présente une pente de $1,002 \pm 0,011$ et un coefficient de corrélation de 0,99 (Figure 7).

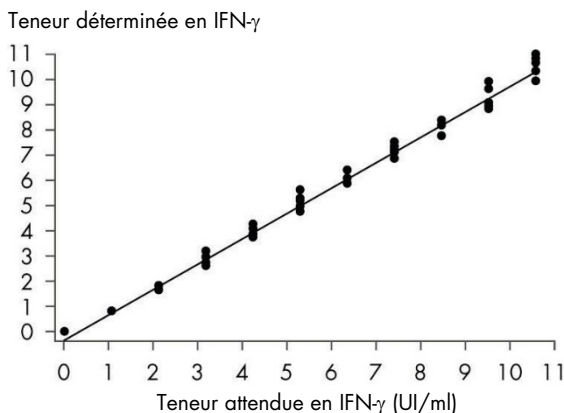


Figure 7. Profil de linéarité du test QF-CMV ELISA déterminé à partir de l'analyse de cinq réplicats de 11 échantillons de plasma de concentrations d'IFN- γ connues.

La reproductibilité du test QF-CMV ELISA a été estimée. Pour ce faire, trois opérateurs ont testé 20 échantillons de plasma présentant différentes concentrations d'IFN- γ dans des réplicats de trois, dans trois laboratoires et pendant trois jours non consécutifs. Ainsi, chaque échantillon a été testé 27 fois, au cours de neuf séries de cycles d'exécution de dosage indépendants. L'un des échantillons était un contrôle Nil et contenait une concentration d'IFN- γ calculée de 0,08 (IC 95 % de 0,07 à 0,09) UI/ml. Sur les 19 échantillons de plasma restants, la plage de concentrations était de 0,33 (IC 95 % de 0,31 à 0,34) à 7,7 UI/ml (IC 95 % de 7,48 à 7,92).

L'imprécision au sein d'un cycle d'exécution ou intradosage a été estimée en calculant la moyenne du %CV de chaque échantillon de plasma testé contenant de l'IFN- γ de chaque microplaque analysée ($n = 9$) et était comprise dans une plage de 4,1 à 9,1 %CV. Le %CV intradosage moyen (IC \pm 95 %) était de 6,6 % \pm 0,6 %. La valeur zéro d'IFN- γ du plasma était en moyenne de 14,1 %CV.

L'imprécision totale ou interdosage a été déterminée en comparant les 27 concentrations d'IFN- γ calculées pour chaque échantillon de plasma et était comprise dans une plage de valeurs de 6,6 à 12,3 %CV. Le %CV moyen global (IC \pm 95 %) était de 8,7 % \pm 0,7 %. La valeur zéro d'IFN- γ du plasma présentait un CV de 26,1 %. Ce niveau de variation est prévisible, car la concentration calculée en IFN- γ est faible et la variation pour une estimation de concentration basse est supérieure à celle des concentrations plus élevées.

Informations techniques

Résultats indéterminés

Des résultats indéterminés peuvent être liés au statut immunitaire de l'individu testé, mais peuvent également dépendre d'un certain nombre de facteurs techniques :

- Délai supérieur à 16 heures entre le prélèvement sanguin et l'incubation à 37 °C
- Stockage du sang hors de la plage de températures recommandée (22 ± 5 °C)
- Mélange insuffisant des tubes de prélèvement sanguin
- Lavage incomplet de la microplaque ELISA

Si des problèmes techniques sont suspectés lors du prélèvement ou de la manipulation des échantillons sanguins, il est recommandé de recommencer intégralement le test QF-CMV en utilisant de nouveaux échantillons sanguins. Il est préférable de recommencer le test ELISA des échantillons de plasma stimulés si le moindre écart de protocole est suspecté au cours du test ELISA. Des résultats indéterminés (dus à des valeurs Mitogen faibles) ne sont pas censés changer au cours des nouvelles analyses à moins d'une erreur lors de la réalisation du test ELISA.

Échantillons de plasma coagulés

Si des caillots de fibrine apparaissent avec la conservation à long terme des échantillons de plasma, centrifuger les échantillons pour sédimenter la matière coagulée et faciliter le pipetage du plasma.

Guide de résolution de problèmes

Ce guide de résolution de problèmes peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, voir également les informations techniques fournies sur : www.QuantiFERON.com. Pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture.

Commentaires et suggestions

Faible densité optique mesurée pour les étalons

- | | |
|--|--|
| a) Erreur de dilution de l'étalon | Assurez-vous de préparer les dilutions de l'étalon du kit conformément à la notice de QF-CMV ELISA. |
| b) Erreur de pipetage | Assurez-vous d'étalonner et d'utiliser les pipettes conformément aux instructions du fabricant. |
| c) Température d'incubation trop basse | L'incubation d'ELISA doit être effectuée à température ambiante (22 ± 5 °C). |
| d) Période d'incubation trop courte | L'incubation de la microplaque avec le conjugué, les étalons et les échantillons doit durer 120 ± 5 minutes. La solution de substrat enzymatique est incubée dans la microplaque pendant 30 minutes. |
| e) Utilisation du mauvais filtre de lecteur de plaques | La microplaque doit être lue à 450 nm en utilisant un filtre de référence dans une plage de 620 à 650 nm. |
| f) Les réactifs sont trop froids | Tous les réactifs, à l'exception du conjugué concentré 100x, doivent être ramenés à température ambiante avant de commencer le dosage. Ce qui prend environ 1 heure. |
| g) Kit/composants périmés | Veiller à utiliser le kit avant la date d'expiration. Faire en sorte que l'étalon reconstitué et le conjugué concentré 100x soient utilisés dans les 3 mois suivant la date de reconstitution. |

Développement de couleur non spécifique

- | | |
|--|---|
| a) Lavage insuffisant de la plaque | Lavez la microplaque au moins six fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de six cycles de lavage peuvent s'avérer nécessaires en fonction du laveur utilisé. Un temps de trempage d'au moins 5 secondes doit être utilisé entre chaque cycle. |
| b) Contamination croisée des puits ELISA | Faire attention lors du pipetage et du mélange des échantillons pour réduire le risque de contamination. |

Commentaires et suggestions

- | | |
|---|--|
| c) Kit/composants périmés | Veiller à utiliser le kit avant la date d'expiration. Faire en sorte que l'étalon reconstitué et le conjugué concentré 100x soient utilisés dans les 3 mois suivant la date de reconstitution. |
| d) La solution de substrat enzymatique est contaminée | Jeter le substrat en cas de coloration bleue. Vérifier la propreté des réservoirs de réactifs. |
| e) Mélange du plasma dans les tubes de centrifugation avant la collecte | Assurez-vous de collecter délicatement les échantillons de plasma au-dessus du gel sans pipetter de manière répétée, en veillant à ne pas troubler les substances situées à la surface du gel. |

Bruit de fond élevé

- | | |
|---|---|
| a) Lavage insuffisant de la plaque | Lavez la microplaque au moins six fois avec 400 pl/puits de tampon de lavage. Plus de six cycles de lavage peuvent s'avérer nécessaires en fonction du laveur utilisé. Un temps de trempage d'au moins 5 secondes doit être utilisé entre chaque cycle. |
| b) Température d'incubation trop élevée | L'incubation d'ELISA doit être effectuée à température ambiante (22 ± 5 °C). |
| c) Kit/composants périmés | Veiller à utiliser le kit avant la date d'expiration. Faire en sorte que l'étalon reconstitué et le conjugué concentré 100x soient utilisés dans les 3 mois suivant la date de reconstitution. |
| d) La solution de substrat enzymatique est contaminée | Jeter le substrat en cas de coloration bleue. Vérifier la propreté des réservoirs de réactifs. |

Courbe d'étalonnage non linéaire et variabilité des duplicats

- | | |
|--|---|
| a) Lavage insuffisant de la plaque | Lavez la microplaque au moins six fois avec 400 pl/puits de tampon de lavage. Plus de six cycles de lavage peuvent s'avérer nécessaires en fonction du laveur utilisé. Un temps de trempage d'au moins 5 secondes doit être utilisé entre chaque cycle. |
| b) Erreur de dilution de l'étalon | Vérifier que les dilutions de l'étalon du kit sont préparées correctement et conformément à cette notice. |
| c) Mélange insuffisant | Mélanger soigneusement les réactifs par inversion ou en les vortexant doucement avant de les ajouter à la plaque. |
| d) Technique de pipettage irrégulière ou interruption pendant la mise en place du dosage | L'ajout des échantillons et des étalons doit être effectué de manière continue. Tous les réactifs doivent être préparés avant le début du dosage. |

Les informations sur les produits et les guides techniques sont disponibles gratuitement auprès de QIAGEN, par l'intermédiaire de votre distributeur ou sur le site www.QuantiFERON.com.














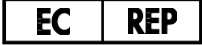
Références

1. Manuel, O., et al. (2013) Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 56, 817.
2. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* 9, 165.
3. Westall, G.P., et al. (2008) Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8⁺ T cell immunity. *Am. J. Transplant.* 8, 1749.
4. Kumar, D., et al. (2009) Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transpl.* 9, 1214.
5. Lachmanova, A.I., et al. (2010) QuantiFERON-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* 42, 3574.
6. Lisboa, L.F., et al. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplant.* 93, 195.
7. Weseslindtner, L., et al. (2012) Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8⁺ T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 12, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8⁺ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 738.
9. Fleming, T., et al. (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish Hospital. *J. Med. Virol.* 82, 433.
10. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific interferon-producing CD8⁺ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 791.

-
11. Singh, K.P., et al. (2007) Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4⁺ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* 124, 200.
 12. Kotton, C.N., et al. (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant.* 96, 333.
 13. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 711.
 14. Torre-Cisneros, J., et al. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 735.
 15. Giulieri, S., Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 11, 17.
 16. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76.

Symboles

Les symboles suivants peuvent apparaître sur l’emballage et les étiquettes :

Symbole	Définition du symbole
	Contient des réactifs suffisants pour <N> réactions
	Date limite d'utilisation
	Marquage CE
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Numéro de référence
	Lot number (Numéro de lot)
	Référence produit
	Code article international (Global Trade Item Number, GTIN)
	Limites de température
	Ne pas réutiliser
	Conserver à l'abri de la lumière directe du soleil
	Consulter le mode d'emploi
	Fabricant
	Représentant autorisé dans l'Union européenne

Coordonnées

Pour bénéficier d'une assistance technique et obtenir plus d'informations, consulter notre Centre d'assistance technique à l'adresse www.qiagen.com/Support, appeler le 00800-22-44-6000 ou contacter l'un des services techniques QIAGEN ou l'un de ses distributeurs locaux (voir la quatrième de couverture ou le site www.qiagen.com).

Résumé de la procédure du test ELISA

Étape 1 : Incubation du sang

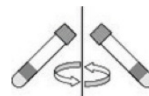
1. Prélevez le sang du patient dans les tubes de prélèvement sanguin et mélangez-les en les agitant dix (10) fois suffisamment fort pour vous assurer que toute la paroi interne des tubes est enduite de sang afin de dissoudre les antigènes adsorbés.



2. Incuber les tubes en position verticale à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 16 à 24 heures.



3. Après l'incubation, centrifugez les tubes pendant 15 minutes avec une FCR de 2 000 à 3 000 (g) pour séparer le plasma des globules rouges.



4. Après la centrifugation, éviter de mélanger le plasma par aspiration-refoulement avec la pipette ou par tout autre moyen avant de le collecter. Pendant l'ensemble de la procédure, prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel.



Étape 2 : IFN- γ ELISA

1. Amener les composants du kit ELISA, excepté le conjugué concentré 100x, à température ambiante pendant au moins 60 minutes.

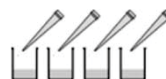


2. Reconstituer l'étalon du kit à raison de 8,0 UI/ml avec de l'eau distillée ou déionisée. Préparer quatre (4) dilutions de l'étalon.



3. Reconstituez le concentré de conjugué 100x lyophilisé avec de l'eau distillée ou déionisée.

4. Préparer la concentration de travail du conjugué dans le diluant vert et ajouter 50 µl de cette solution dans tous les puits.



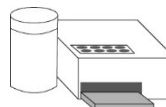
5. Ajoutez 50 µl des échantillons de plasma de test et 50 µl des étalons dans les puits appropriés. Mélanger avec l'agitateur.



6. Incuber pendant 120 minutes à température ambiante.



7. Laver les puits au moins 6 fois avec 400 µl de tampon de lavage par puits.



8. Ajouter 100 µl de solution de substrat enzymatique aux puits. Mélanger avec l'agitateur.



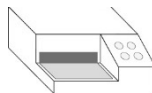
9. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.



10. Ajoutez 50 μ l de solution de blocage d'enzyme dans tous les puits. Mélanger avec l'agitateur.



11. Lire les résultats à 450 nm avec un filtre de référence de 620 à 650 nm.



12. Analyser les résultats.



Historique des versions du manuel

Document	Changements	Date
L1075110-R06	Matériel nécessaire mais non fourni, couvercles supplémentaires pour assiettes, page 9	Octobre 2019

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Cette page est intentionnellement laissée vierge

Marques commerciales : QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (groupe QIAGEN) ; Excel®, Microsoft® (Microsoft) ; ProClin® (Rohm and Haas Co.) ; SeraQuest™ (Quest International, Inc.).

Accord de licence limité pour QuantiFERON-CMV ELISA

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit doit être utilisé uniquement avec les composants du kit, conformément aux protocoles fournis et à ce manuel. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce panel avec tout autre composant non fourni dans ce panel, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit, dans ce manuel et dans d'autres protocoles disponibles sur le site www.qiagen.com. Certains de ces protocoles supplémentaires ont été fournis par les utilisateurs de QIAGEN pour les utilisateurs de QIAGEN. Ces protocoles n'ont pas été rigoureusement testés ou optimisés par QIAGEN. QIAGEN ne saurait être tenu pour responsable de leur utilisation et n'offre aucune garantie que ces protocoles ne portent pas atteinte aux droits de tierces parties.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce panel et/ou sa ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce panel et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du panel consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de ce Contrat de licence limité par tout tribunal et pourra recouvrer tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de Contrat de licence limité ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au panel et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, consulter www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, tous droits réservés.

