

Ottobre 2019

Foglietto illustrativo di QuantiFERON®-CMV ELISA



Test dell'interferone gamma (IFN- γ) nel sangue intero per la misurazione delle risposte agli antigeni peptidici del citomegalovirus (CMV) umano



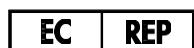
Per uso diagnostico in vitro



0350-0201



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724
Hilden, GERMANIA

1075110 Rev. 06



www.QuantiFERON.com

Sample to Insight



Contenuto

Uso previsto	5
Sommario e spiegazioni	5
Principio della procedura	6
Tempo necessario per l'esecuzione dell'esame	7
Materiali forniti	8
Contenuti del kit	8
Materiale necessario ma non in dotazione	9
Avvertenze e precauzioni	9
Informazioni sulla sicurezza	11
Conservazione e manipolazione dei reagenti	12
Prelievo e manipolazione dei campioni	13
Procedura	16
Fase 1: Incubazione del sangue e raccolta del plasma	16
Fase 2: QuantiFERON-CMV ELISA per IFN- γ umano	17
Calcoli e interpretazione del test	22
Generazione della curva standard (senza utilizzare il software di analisi QF-CMV)	22
Controllo della qualità del test	23
Interpretazione dei risultati	25
Limitazioni	26
Risultati attesi	26
Caratteristiche delle prestazioni	29

Prestazioni cliniche	29
Soglia dell'esame	30
Studi clinici	30
Specificità	31
Sensibilità.....	31
Studi che evidenziano l'utilità clinica	32
Linee guida internazionali di consenso sulla gestione del citomegalovirus nei trapianti di organi solidi	37
Caratteristiche delle prestazioni dell'esame.....	38
Informazioni tecniche	41
Risultati indeterminati	41
Coaguli nei campioni di plasma	41
Guida alla risoluzione dei problemi.....	42
Riferimenti bibliografici	44
Simboli.....	46
Informazioni di contatto.....	47
Procedura sintetica del test ELISA.....	48
Fase 1: Incubazione del sangue.....	48
Fase 2: IFN- γ ELISA.....	48
Cronologia delle revisioni del manuale	51

Uso previsto

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) ELISA è un esame in vitro che utilizza un cocktail peptidico per simulare le proteine del citomegalovirus umano e stimolare le cellule del sangue intero eparinizzato. Il rilevamento dell'IFN- γ mediante ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, esame immuno-assorbente legato agli enzimi) viene impiegato per quantificare le risposte in vitro agli antigeni peptidici associati al controllo immunitario dell'infezione da CMV. La compromissione di tale funzione immunitaria può essere associata allo sviluppo della malattia da CMV. L'uso previsto di QF-CMV è quello di monitorare il livello dell'immunità anti-CMV nei pazienti.

Il test QF-CMV non serve a determinare l'infezione da CMV e non deve essere utilizzato per escludere l'infezione da CMV.

Sommario e spiegazioni

Il CMV è un virus erpetico che infetta circa il 50-85% della popolazione adulta. Si tratta di una complicanza frequente dell'immunosoppressione, in particolare dopo i trapianti, che può contribuire in modo significativo a morbilità e mortalità nei pazienti sottoposti a trapianto. Le attuali terapie immunospressive utilizzate per prevenire il rigetto di un organo trapiantato hanno effetti negativi sui linfociti T e sulle risposte immunitarie cellulo-mediate (cell-mediated immune, CMI), comportando una maggiore predisposizione alle infezioni virali post-trapianto. L'importanza della funzione delle cellule T nell'inibizione della replicazione del CMV è sottolineata anche dal fatto che i linfociti T CD8 $^{+}$ citotossici (CTL) specifici per il CMV sono in grado di offrire protezione dalla patogenesi associata al virus. L'enumerazione dei linfociti T CD8 $^{+}$ citotossici specifici per il CMV nei pazienti immunosoppressi e la produzione di IFN- γ possono essere predittivi del rischio di sviluppare la malattia da CMV. La produzione di IFN- γ può essere un surrogato funzionale dell'identificazione dei CTL specifici per il CMV.

QF-CMV è un esame che misura le risposte CMI agli antigeni peptidici che simulano le proteine CMV. I peptidi CMV sono studiati per agire sulle cellule CD8⁺ T, inclusi i seguenti aplotipi HLA di classe I: A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 e Cw6 (A30, B13) coprendo oltre il 98% della popolazione umana. In genere, i soggetti con infezione da CMV presentano nel sangue linfociti CD8⁺ che riconoscono questi antigeni. Il processo di riconoscimento comporta la generazione e la secrezione della citochina IFN- γ . Il rilevamento e la successiva quantificazione dell'IFN- γ costituiscono il principio di questo test.

Principio della procedura

Il test QF-CMV prevede due fasi. Innanzitutto il sangue intero viene raccolto in ciascuna delle provette di raccolta per prelievo ematico di QF-CMV che comprendono una provetta per controllo Nil, una provetta con antigene CMV e una provetta con mitogeno.

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

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

Capita spesso che la quantità di IFN- γ nei campioni di plasma provenienti dalle provette con antigene CMV e con mitogeno sia superiore ai limiti massimi dei lettori ELISA, anche se i soggetti sono moderatamente immunosoppressi. Per ottenere risultati qualitativi, utilizzare i valori calcolati per il plasma non diluito. Per ottenere risultati quantitativi, per i quali sono necessari valori UI/ml effettivi, è necessario diluire i campioni di plasma in rapporto 1:10 con diluente verde e analizzati con ELISA insieme al plasma non diluito.

Nota: Per i campioni che rientrano nell'intervallo del test QF-CMV ELISA (ovvero fino a 10 UI/ml), va utilizzato il risultato ottenuto con il campione di plasma non diluito. Per tali concentrazioni di IFN- γ , è possibile che i valori ottenuti utilizzando la diluizione dei campioni di plasma in rapporto 1:10 non siano esatti.

Un test viene considerato reattivo a una risposta di IFN- γ se la provetta con antigene CMV presenta un valore significativamente superiore al valore di IFN- γ espresso in UI/ml presente nella provetta per controllo Nil. Il campione di plasma stimolato dal mitogeno funge da controllo positivo dell'IFN- γ per ciascun campione analizzato. Una bassa risposta al mitogeno indica un risultato indeterminato se il campione di sangue presenta anche una risposta non reattiva agli antigeni CMV. Una tale eventualità si può verificare in presenza di linfociti insufficienti, attività dei linfociti ridotta a causa di un'errata manipolazione del campione, riempimento/miscelazione non corretti della provetta con mitogeno o incapacità dei linfociti del paziente di generare l'IFN- γ , come nel caso di pazienti sottoposti recentemente a trapianto. Il campione Nil compensa il livello di fondo o di IFN- γ non specifico nei campioni di sangue. Il livello di IFN- γ nella provetta di controllo Nil viene sottratto al livello di IFN- γ della provetta con antigene CMV e della provetta con mitogeno (per la descrizione del modo in cui vengono interpretati i risultati del QF-CMV, consultare le sezione "Interpretazione dei risultati" a pagina 25 del presente foglietto illustrativo).

Tempo necessario per l'esecuzione dell'esame

Il tempo necessario per effettuare l'esame QF-CMV è indicato di seguito, così come il tempo necessario per eseguire l'analisi di più campioni in un lotto.

Incubazione a 37 °C delle provette

di sangue:

Da 16 a 24 ore

ELISA:

Circa 3 ore per una piastra ELISA

Meno di 1 ora di lavoro

Aggiungere 10-15 minuti per ogni piastra in più

Materiali forniti

Contenuti del kit

Provette di raccolta per prelievo ematico (confezione singola paziente)	
Numero di catalogo	0192-0301
Numero delle preparazioni	1
QuantiFERON Nil Control (controllo Nil QuantiFERON; tappo grigio)	1 provetta
QuantiFERON CMV Antigen (antigene CMV QuantiFERON; tappo blu)	1 provetta
QuantiFERON Mitogen Control (controllo con mitogeno QuantiFERON; tappo viola)	1 provetta
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (foglietto illustrativo per provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV)	1

QuantiFERON-CMV ELISA	Kit ELISA per 2 piastre
Numero di catalogo	0350-0201
Microplate strips (12 x 8 wells) coated with murine anti-human IFN- γ monoclonal antibody (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 pozzetti
Human IFN- γ Standard, lyophilized (IFN- γ umano standard, liofilizzato; contiene IFN- γ umano ricombinante, caseina bovina, Thimerosal 0,01% p/v)	1 fiala (8 UI/ml dopo la ricostituzione)
Green Diluent (Diluente verde) (contiene caseina bovina, siero murino normale, Thimerosal 0,01% p/v)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Coniugato concentrato 100x, liofilizzato) (contiene anticorpi anti-IFN- γ umano coniugati con perossidasi di rafano (HRP) e Thimerosal 0,01% p/v)	1 x 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (Tampone di lavaggio concentrato 20x) (con pH 7,2 contiene ProClin® 300 0,05% v/v)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Soluzione substrato enzimatico) (contiene H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5' Tetrametilbenzindina)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Soluzione di arresto enzimatico) (contiene 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (Foglietto illustrativo QF-CMV ELISA)	1

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

Materiale necessario ma non in dotazione

Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio adeguato, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

- Incubatore a 37 °C; CO₂ non richiesta
- Pipette calibrate a volume variabile per l'erogazione di 10-1.000 µl con puntali monouso
- Pipetta multicanale calibrata per l'erogazione di 50-100 µl con puntali monouso
- Agitatore per micropiastre
- Acqua deionizzata o distillata, 2 litri
- Sistema di lavaggio per micropiastre (si consigliano dispositivi di lavaggio automatici)
- Lettore per micropiastre dotato di filtro da 450 nm e di filtro di riferimento da 620-650 nm
- Coperchio per piastra

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

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

CAUTELA



Manipolare il sangue umano come se fosse potenzialmente infettivo.
Attenersi alle relative linee guida sulla manipolazione del sangue.

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

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: trisodio 5-idrossi-1-(4-sulfonatofenil)-4-(4-sulfonatofenilazo)pirazol-3-carbossilato. 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

Contiene: ProClin 300. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Evitare l'immissione nell'ambiente.

Informazioni sulla sicurezza

Ulteriori informazioni

- La mancata osservanza delle istruzioni presenti nel foglietto illustrativo del test QF-CMV può generare risultati erronei. 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.
Raccomandazione: Per ridurre al minimo il rischio di lesioni causate dal tappo di metallo, per aprire le fiale di coniugato o standard IFN- γ usare una decapsulatrice per fiale.
- Non miscelare o utilizzare strisce per micropiastre, standard IFN- γ umano, diluenti verdi o coniugati concentrati 100x appartenenti ad altri lotti di kit QF-CMV. 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 le provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV né i kit QF-CMV ELISA oltre la data di scadenza.
- 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

Provette di raccolta per prelievo ematico

- Conservare le provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV a 4-25 °.
- La temperatura delle provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV deve essere compresa tra 17 e 25 °C al momento del prelievo.
- Le provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV hanno una durata massima di 15 mesi dalla data di produzione, se conservate a una temperatura compresa tra 4 e 25 °C.

Reagenti del kit ELISA

- Conservare il kit 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, consultare la sezione "Fase 2: QuantiFERON-CMV ELISA per IFN- γ umano" (passaggi 3 e 5 a pagg. 17 e 19).

- Lo standard IFN- γ umano ricostituito può essere conservato fino a 3 mesi a 2-8 °C. Annotare la data in cui lo standard IFN- γ umano è stato ricostituito.
- Dopo la ricostituzione, il coniugato concentrato 100x inutilizzato deve essere conservato in frigorifero a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C e deve essere utilizzato entro 3 mesi.

Prendere nota della data in cui è stato ricostituito il coniugato.

- Il coniugato pronto per l'uso deve essere utilizzato entro 6 ore dalla preparazione.
- Il tampone di lavaggio pronto per l'uso può essere conservato a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) fino a 2 settimane.

Prelievo e manipolazione dei campioni

Il test QF-CMV utilizza le provette di raccolta riportate di seguito per il prelievo ematico:

- Controllo Nil (tappo grigio)
- Antigene CMV (tappo blu)
- Controllo con mitogeno (tappo viola)

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

Per ottenere risultati ottimali è opportuno attenersi alle seguenti procedure.

1. Per ciascun paziente prelevare 1 ml di sangue per venopuntura direttamente in ognuna delle provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV. Questa procedura deve essere eseguita da personale qualificato e addetto al prelievo ematico per analisi.

Le provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV possono essere utilizzate fino a un'altitudine di 810 metri.

Se si utilizzano le provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV a un'altitudine superiore a 810 metri, o se il sangue fluisce con lentezza, è possibile effettuare il prelievo con una siringa e trasferire immediatamente 1 ml di sangue in ciascuna delle tre provette. Per motivi di sicurezza, la procedura migliore consiste nel togliere l'ago della siringa, seguire le adeguate procedure di sicurezza, togliere i tappi dalle tre provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV e aggiungere 1 ml di sangue in ciascuna provetta (fino al livello della tacca nera sul lato dell'etichetta della provetta). Tappare attentamente le provette e miscelare seguendo le istruzioni riportate di seguito. Dato che nelle provette da 1 ml il sangue fluisce abbastanza lentamente, per accertarsi di prelevare il volume corretto mantenere la provetta sull'ago per 2-3 secondi quando sembra completamente piena.

La tacca nera sul lato delle provette indica il volume di riempimento di 1 ml. Le provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV sono state approvate per volumi che vanno da 0,8 a 1,2 ml. Se il livello del sangue in una provetta non raggiunge il segno nero, è necessario prelevare un nuovo campione di sangue.

Se per il prelievo del sangue viene impiegato un ago a farfalla, prima di usare le provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV, è opportuno utilizzare una provetta "vuota" per verificare che il tubicino si sia riempito di sangue.

In alternativa, è possibile prelevare il sangue in un'unica provetta di raccolta generica contenente eparina di litio come anticoagulante e quindi trasferire il campione in provette per prelievo ematico QF-CMV. Utilizzare esclusivamente eparina di litio come anticoagulante, poiché altri tipi di anticoagulanti interferiscono con l'esame. Riempire una provetta di raccolta per prelievo ematico (volume minimo 5 ml) e miscelare delicatamente il contenuto capovolgendo la provetta svariate volte in modo che l'eparina si scioglia. Questa procedura deve essere eseguita da personale qualificato e addetto al prelievo ematico per analisi. Il sangue deve essere conservato a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) prima di essere trasferito nelle provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV per la fase di incubazione, che deve iniziare entro 16 ore dal prelievo.

2. Subito dopo aver riempito le provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV, scuoterele in modo deciso per 10 volte per assicurare che l'intera superficie interna della provetta sia ricoperta di sangue e che gli antigeni sulle pareti si sciogliano.

Durante il prelievo, la temperatura delle provette deve essere compresa tra 17 e 25°C .

Non agitare in modo troppo vigoroso per evitare la disgregazione del gel e il conseguente rischio di generare risultati anomali.

Se il sangue è stato raccolto in una provetta di raccolta contenente eparina di litio, è necessario miscelare in modo omogeneo i campioni prima di trasferirli nella provetta QF-CMV. Assicurarsi che il sangue sia miscelato in modo omogeneo capovolgendo la provetta delicatamente appena prima di iniziare l'aliquotazione. Aggiungere 1 ml di campione (un'aliquota per ogni provetta per il prelievo ematico QF-CMV) nelle corrispondenti provette di raccolta contrassegnate con le etichette Nil, CMV Antigen e Mitogen. La procedura deve essere eseguita in condizioni asettiche, osservando le

procedure di sicurezza opportune, rimuovendo i tappi dalle tre provette di raccolta per il prelievo ematico QF-CMV e aggiungendo 1 ml di sangue in ognuna (fino alla tacca nera sul lato dell'etichetta della provetta). Tappare saldamente le provette e miscelare seguendo le istruzioni riportate in precedenza.

3. Etichettare correttamente le provette.

Assicurarsi che ogni provetta (Nil, CMV Antigen, Mitogen) sia identificabile attraverso l'etichetta o altri indizi.

4. Dopo aver riempito, agitato ed etichettato le provette, trasferirle in un incubatore a 37 ± 1 °C il prima possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo del sangue. Prima dell'incubazione, le provette devono essere lasciate a temperatura ambiente (22 ± 5 °C).

Non refrigerare né congelare i campioni di sangue.

Procedura

Fase 1: Incubazione del sangue e raccolta del plasma

1. Incubare le provette IN POSIZIONE VERTICALE a 37 ± 1 °C per 16-24 ore. L'incubatore non richiede né CO₂ né umidificazione.

Importante: se il sangue non viene messo in incubazione subito dopo il prelievo, ripetere la miscelazione delle provette capovolgendole per 10 volte prima dell'incubazione.

In seguito all'incubazione e prima della centrifugazione, è possibile conservare le provette di raccolta per prelievo ematico a una temperatura compresa tra 4 e 27 °C per un massimo di 3 giorni.

2. Dopo l'incubazione a 37 °C, la raccolta del plasma è più semplice centrifugando le provette per 15 minuti a 2.000-3.000 RCF (g). Il tampone in gel consente di separare le cellule dal plasma. Se ciò non dovesse accadere, le provette dovranno essere centrifugate nuovamente.

È possibile raccogliere il plasma senza centrifugazione, ma occorre prestare maggior attenzione durante la rimozione del plasma senza alterare le cellule.

3. 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.

Importante: i campioni di plasma dovrebbero essere raccolti soltanto con una pipetta.

I campioni di plasma possono essere caricati direttamente dalle provette di raccolta per prelievo ematico centrifugate sulla piastra QF-CMV ELISA, anche quando si utilizzano stazioni di lavoro ELISA automatizzate.

È possibile conservare i campioni di plasma in provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV centrifugate per un massimo di 28 giorni a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C oppure, in seguito alla raccolta, a una temperatura inferiore a -20 °C (preferibilmente inferiore a -70 °C) per periodi più lunghi.

Per ottenere campioni di analisi sufficienti, raccogliere almeno 150 µl di plasma.

Fase 2: QuantiFERON-CMV ELISA per IFN- γ umano

Fare riferimento a "Contenuti del kit", pagina 8 e "Materiale necessario ma non in dotazione", pagina 9, per i materiali necessari per eseguire ELISA.

1. Tutti i campioni di plasma e i reagenti, tranne il coniugato concentrato 100x, devono essere portati a temperatura ambiente (22 ± 5 °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.

Calcolare almeno una striscia per gli standard QF-CMV ELISA e un numero sufficiente di strisce per i pazienti da sottoporre al test. Dopo l'uso, conservare il supporto e il coperchio in modo da utilizzarli con le strisce rimanenti.

3. Ricostituire lo standard IFN- γ umano con il volume di acqua deionizzata o distillata indicato sull'etichetta della fiala. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e assicurare la completa risolubilizzazione. Ricostituendo lo standard IFN- γ al volume corretto si otterrà una soluzione con una concentrazione pari a 8,0 UI/ml.

Nota: Il volume indicato per la ricostituzione dello standard IFN- γ umano (standard del kit) varia in base al lotto.

Utilizzando lo standard ricostituito, preparare una serie di diluizioni di quattro concentrazioni di IFN- γ in diluente verde (Green Diluent, GD) (Figura 1, pagina successiva). Lo Standard 1 (S1) contiene 4,0 UI/ml, lo Standard 2 (S2) contiene 1,0 UI/ml, lo Standard 3 (S3) contiene 0,25 UI/ml e lo Standard 4 (S4) contiene 0 UI/ml (solo GD). Gli standard dovrebbero essere esaminati almeno in duplicato. Preparare nuove diluizioni dello standard del kit per ogni sessione ELISA.

Esempio di procedura per gli standard in duplicato

Esempio di procedura per gli standard in duplicato

- A Etichettare quattro provette: S1, S2, S3, S4
- B Aggiungere 150 µl di GD a S1, S2, S3, S4.
- C Aggiungere 150 µl di standard del kit a S1 e miscelare con cura.
- D Trasferire 50 µl da S1 a S2 e miscelare con cura.
- E Trasferire 50 µl da S2 a S3 e miscelare con cura
- F Solo GD funge da standard zero (S4).

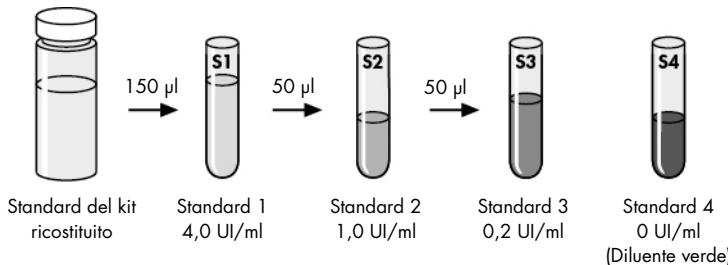


Figura 1. Preparazione della curva standard mediante diluizione seriale.

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

Il coniugato pronto per l'uso viene preparato diluendo la quantità necessaria di coniugato concentrato 100x ricostituito nel diluente verde (vedere la Tabella 1 alla pagina successiva).

Per evitare la formazione di schiuma, mescolare con cura e delicatezza.

Riportare il coniugato concentrato 100x non utilizzato a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C subito dopo l'uso.

Utilizzare esclusivamente Diluente verde.

Tabella 1. Preparazione del coniugato pronto per l'uso

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

5. Nel caso di campioni di plasma raccolti dalle provette di raccolta per prelievo ematico e successivamente congelati o conservati per più di 24 ore prima dell'esame, è necessaria una miscelazione accurata prima dell'aggiunta al pozzetto ELISA.

Importante: Se i campioni di plasma devono essere aggiunti direttamente dalle provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV centrifugate, la miscelazione del plasma deve essere evitata. Fare sempre attenzione a non alterare il materiale presente sulla superficie del gel.

6. Se sono richiesti risultati quantitativi, diluire i plasmi CMV e mitogeno 1:10 con il diluente verde (10 μ l di plasma + 90 μ l di diluente verde). Il plasma Nil non va diluito.

Si consiglia di analizzare in parallelo i seguenti campioni:

Nil, antigene CMV, mitogeno, antigene CMV (1:10), mitogeno (1:10)

Tuttavia, il software di analisi QuantiFERON-CMV supporta anche le seguenti opzioni per i campioni dei pazienti:

Nil, antigene CMV, mitogeno

Nil, antigene CMV (1:10), mitogeno (1:10)

Nil, antigene CMV, mitogeno, antigene CMV (1:10)

Nil, antigene CMV (1:10), mitogeno

7. Aggiungere 50 μ l di coniugato pronto per l'uso appena preparato nei pozzetti ELISA necessari mediante una pipetta multicanale.
8. Aggiungere 50 μ l di campioni di plasma da analizzare nei pozzetti opportuni. Aggiungere infine 50 μ l di ognuno degli standard da 1 a 4 nei pozzetti opportuni. Gli standard dovrebbero essere analizzati almeno in duplice.
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 500-1.000 giri/min. Evitare spruzzi.
10. Coprire la piastra ELISA e incubare a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) per 120 ± 5 minuti.

Non esporre le piastre alla luce solare diretta durante l'incubazione. La mancata osservanza dell'intervallo di temperatura specificato può comportare risultati errati.

11. Durante l'incubazione, 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. Quando l'incubazione della piastra ELISA è completa, lavare i pozzetti con 400 μ l di tampone di lavaggio pronto per l'uso per almeno sei cicli. Si consiglia di utilizzare un sistema di lavaggio automatico.

Importante: 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 a 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 alle piastre capovolte su un panno privo di pelucchi. Aggiungere 100 μ l di soluzione di substrato enzimatico in ogni pozzetto, coprire la piastra e miscelare con cura con un agitatore per micropiastre per 1 minuto a 500-1.000 giri/min.
 14. Coprire ogni piastra e incubare a temperatura ambiente (22 ± 5 °C) per 30 minuti. Non esporre le piastre alla luce solare diretta durante l'incubazione.
 15. Dopo l'incubazione di 30 minuti, aggiungere 50 μ l di soluzione di arresto enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine in cui è stato aggiunto il substrato e miscelare con cura con un agitatore per micropiastre a 500-1.000 giri/min.
 16. Misurare la densità ottica (Optical Density, OD) di ogni pozzetto entro 5 minuti dall'arresto della reazione utilizzando un lettore per micropiastre dotato di filtro da 450 nm e di filtro di riferimento da 620 nm a 650 nm. I valori di densità ottica (Optical Density, OD) vengono utilizzati per calcolare i risultati.

Calcoli e interpretazione del test

Il software di analisi QuantiFERON-CMV per l'analisi dei dati grezzi e il calcolo dei risultati è disponibile sul sito QIAGEN all'indirizzo www.QuantiFERON.com. Assicurarsi di utilizzare la versione più aggiornata del software di analisi QF-CMV.

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 25. Il software indica qual è la diluizione più bassa ad aver generato un risultato compreso nell'intervallo del saggio QF-CMV ELISA, tenendo conto del fattore di diluizione.

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

Generazione della curva standard (senza utilizzare il software di analisi QF-CMV)

Determinare i valori medi della densità ottica dei replicati dello standard del kit su ciascuna piastra.

Costruire una curva standard \log_{10} - \log_{10} tracciando il \log_{10} della densità ottica media (asse y) rispetto al \log_{10} della concentrazione dell'IFN- γ degli standard espressa in UI/ml (asse x), omettendo da questi calcoli lo standard zero. Calcola la retta di miglior adattamento per la curva standard mediante analisi di regressione.

Utilizzare la curva standard per determinare la concentrazione dell'IFN- γ (UI/ml) per ognuno dei campioni di plasma da analizzare, utilizzando il valore della densità ottica di ogni campione.

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

Il risultato da indicare nel report deve essere ottenuto dalla diluizione più bassa ad aver generato un risultato compreso nell'intervallo del saggio QF-CMV ELISA, tenendo conto del fattore di diluizione ove possibile.

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 di densità ottica dei replicati per Standard 1 e Standard 2 deve essere $< 15\%$.
- I valori dell'OD dei replicati degli standard 3 e 4 non devono discostarsi di più di 0,040 unità di densità ottica dalla media.
- Il coefficiente di correlazione (r) calcolato a partire dai valori medi di assorbanza degli standard deve essere $\geq 0,98$.

Il software di analisi QF-CMV calcola e documenta questi parametri di controllo della qualità. Se i criteri summenzionati non vengono soddisfatti, il test non è valido e va ripetuto.

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

Interpretazione dei risultati

Per interpretare i risultati del test QuantiFERON-CMV, utilizzare i criteri indicati nella Tabella 2.

Tabella 2. Interpretazione dei risultati del test QuantiFERON-CMV

Nil (UI/ml)	CMV meno Nil (UI/ml)	Mitogen meno Nil (UI/ml)*	Risultato del test QF-CMV	Report/Interpretazione
≤ 8	$\geq 0,20$ e $\geq 25\%$ di Nil	Qualsiasi	Reattivo [†]	Immunità anti-CMV rilevata
	$< 0,20$ OPPURE $\geq 0,20$ e $< 25\%$ di Nil	$\geq 0,5$	Non reattivo	Immunità anti-CMV NON rilevata
		$< 0,5$	Indeterminato [‡]	Risultati indeterminati per la risposta al CMV
$> 8,0^{\$}$	Qualsiasi	Qualsiasi	Indeterminato [‡]	Risultati indeterminati per la risposta al CMV

* Le risposte al controllo positivo con mitogeno (e occasionalmente agli antigeni CMV) possono essere comunemente al di fuori dell'intervallo del lettore per micropiastre. Ciò non influenza i risultati del test.

[†] Ove non vi sia il sospetto di infezione da citomegalovirus, è possibile confermare risultati inizialmente positivi ripetendo il test sui campioni di plasma originali in duplice con il metodo QF-CMV ELISA. Se i test ripetuti su uno o entrambi i replicati generano un risultato positivo, il paziente deve essere considerato reattivo al test.

[‡] Per le possibili cause, consultare la sezione "Guida alla risoluzione dei problemi" (pagina 42).

Negli studi clinici (1), un risultato indeterminato tra i pazienti sottoposti a trapianto di organi solidi, in cui un donatore è reattivo per CMV ma il controllo con mitogeno è inferiore a 0,5 UI/ml, si è dimostrato clinicamente rilevante. Tali pazienti sono a maggior rischio di sviluppare CMV.

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

Nota: Nel definire la risposta immunitaria agli antigeni CMV, è necessario considerare il livello di IFN- γ misurato insieme al quadro clinico, alla storia medica e ad altre valutazioni diagnostiche. Il test QF-CMV non serve a determinare l'infezione da CMV e non deve essere utilizzato per escludere l'infezione da CMV.

Limitazioni

I risultati del test QuantiFERON-CMV devono essere utilizzati tenendo conto della storia epidemiologica del paziente, del suo stato di salute attuale e di altre valutazioni diagnostiche pertinenti.

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

- Mancata osservanza della procedura descritta nel foglietto illustrativo del QuantiFERON-CMV ELISA
- Livelli eccessivi di IFN- γ nella provetta di controllo
- Attesa di più di 16 ore tra il prelievo del sangue e l'incubazione a 37 °C.

Risultati attesi

I risultati attesi per l'IFN- γ utilizzando QuantiFERON-CMV sono stati ottenuti testando 591 campioni di soggetti sani: 343 campioni testati sieropositivi e 248 campioni testati sieronegativi a IgG CMV. Lo stato sierologico CMV non era noto al momento dell'esecuzione del test QF-CMV. Il 100% dei campioni (248 su 248) ottenuti da individui sieronegativi per CMV ha generato risultati non reattivi con il saggio QF-CMV ELISA, con risposte IFN- γ < 0,2 UI/ml alla provetta con antigene CMV (meno Nil). In Figura 2 è rappresentata la distribuzione delle risposte IFN- γ alla provetta con antigene CMV (meno Nil) per i 343 campioni sieropositivi per CMV.

Numero di campioni

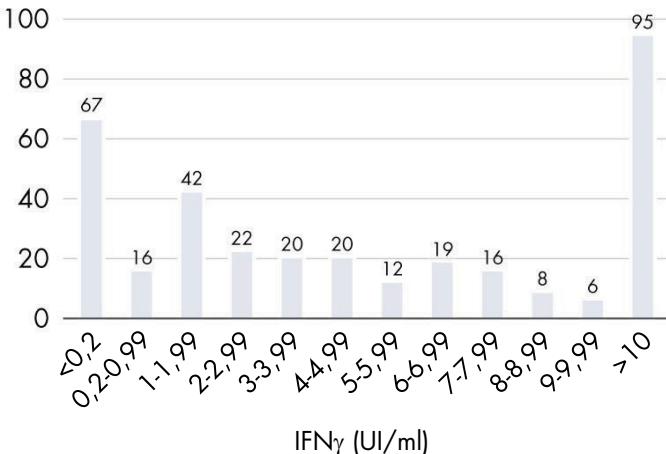


Figura 2. Distribuzione delle risposte IFN- γ QF-CMV (meno Nil) in individui sani sieropositivi (n = 343).

La distribuzione delle risposte IFN- γ al mitogeno (meno Nil) è stata calcolata eseguendo il saggio QF-CMV ELISA su 733 campioni di individui adulti sani, indipendentemente dalla sierologia delle IgG di CMV (Figura 3). Un risultato per il mitogeno (meno Nil) inferiore a 0,5 UI/ml è indicativo del fallimento del test o di una condizione di immunocompromissione del paziente. In una popolazione sana, solo 2 risultati su 733 sono rientrati in questa categoria.

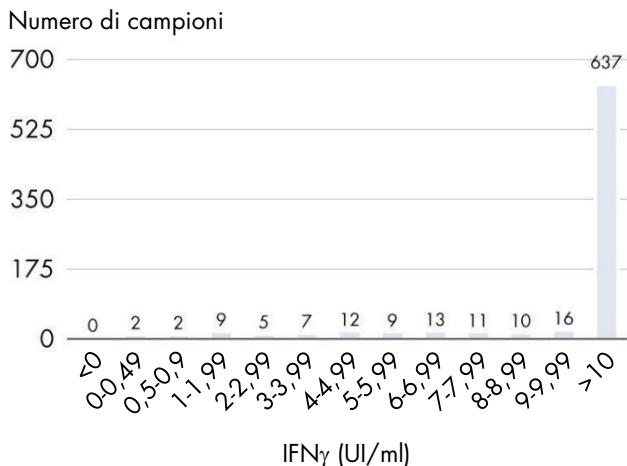


Figura 3. Distribuzione delle risposte IFN- γ - mitogeno (meno Nil) in individui sani (n = 733).

La distribuzione delle risposte IFN- γ alle provette nulle è stata determinata eseguendo il saggio QF-CMV ELISA su 1020 campioni di plasma ottenuti da individui sani, indipendentemente dalla sierologia delle IgG di CMV (Figura 4).

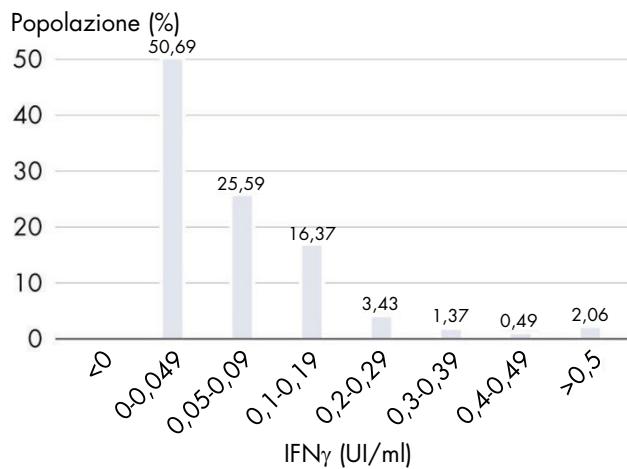


Figura 4. Distribuzione delle risposte IFN- γ - Nil in individui sani (n = 1020) espresse come percentuale della popolazione.

Caratteristiche delle prestazioni

Prestazioni cliniche

Per rilevare l'esposizione a CMV utilizzando il test QF-CMV, è stato definito un valore di soglia per il test dopo aver analizzato i risultati relativi a un gruppo di individui sani ($n = 223$) e dopo avere confrontato i risultati ottenuti con il test QF-CMV con i risultati ottenuti con i test sierologici per le IgG di CMV. Dall'analisi delle curve ROC è emerso che il valore di soglia del test pari a 0,04 IU/ml (in seguito alla sottrazione di Nil) forniva valori predittivi positivi e negativi ottimali per il test QF-CMV (area sotto la curva = 0,9679 [IC 95%: 0,9442–0,9915, $p < 0,0001$]), e ha quindi indicato la soglia alla quale questo esame rappresentava l'uso previsto più efficace in una popolazione sana.

Sono state confrontate le prestazioni dell'esame QF-CMV con le prestazioni del test sierologico per le IgG di CMV SeraQuest™ (Quest International). La concordanza dell'esame QF-CMV è stata del 95% (294 campioni su 310) rispetto al test sierologico delle IgG di CMV negli individui sani, in quanto nessuno dei 149 donatori sieronegativi ha prodotto risultati reattivi al test QF-CMV. 145 donatori sieropositivi su 161 hanno prodotto una risposta reattiva al test QF-CMV. La concordanza positiva generale è stata del 90% con un valore di concordanza negativa del 100%. Nella Tabella 3 è rappresentato il livello di concordanza tra le risposte al test QFCMV e lo stato sierologico delle IgG di CMV negli individui sani.

Tabella 3. Concordanza tra il test QuantiFERON-CMV e il test sierologico per le IgG di CMV in individui sani.

		Controllo sierologico per CMV		Totale
		Positivo	Negativo	
QuantiFERON-CMV	Reattivi	145	0	145 (46,8%)
	Non reattivi	16	149	165 (53,2%)
	Totale	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

Soglia dell'esame

La soglia del test clinico raccomandata per questo esame è di 0,2 UI/ml nella provetta con antigene CMV (meno Nil), sebbene possano essere approvate altre soglie per condizioni cliniche differenti.

Studi clinici

Dal momento che non esiste uno standard definitivo che consente di confermare o escludere la diagnosi di infezione da citomegalovirus, non è sostanzialmente possibile fare una stima della sensibilità e della specificità del QF-CMV. La specificità e la sensibilità del test QF-CMV sono state definite in modo approssimato valutando il livello di concordanza tra le risposte al test QF-CMV e lo stato sierologico delle IgG di CMV negli individui sani.

La specificità del test QF-CMV è stata definita in modo approssimato valutando le percentuali di falsi positivi (reattività al test QF-CMV) in campioni di donatori sani senza evidenza di precedente esposizione a CMV (individui sieronegativi alle IgG di CMV). La sensibilità è stata definita in modo approssimato valutando la risposta al test QF-CMV nei campioni di donatori sani con evidenza di precedente esposizione a CMV (individui sieropositivi alle IgG di CMV). Il test QF-CMV utilizza un numero elevato di epitopi specifici per CMV da diverse proteine di CMV, pertanto fornisce un'ampia copertura della popolazione con aplotipi HLA di classe I diversificati (circa il 98% della popolazione). Poiché gli aplotipi HLA dei soggetti sottoposti a test sierologico per CMV non erano noti, era probabile che una piccola percentuale di soggetti positivi al test sierologico non rispondesse alle provette di raccolta per prelievo ematico QF-CMV.

Specificità

Nel corso di uno studio eseguito su 591 campioni di individui sani, non sono stati rilevati risultati falsi-positivi al test QF-CMV negli individui sieronegativi per le IgG di CMV: 248 campioni su 248 hanno infatti prodotto risultati non reattivi al test QF-CMV ELISA e negativi al test sierologico delle IgG di CMV. Di conseguenza i risultati ottenuti con il test QF-CMV e con il test sierologico delle IgG di CMV sono concordanti al 100%.

In tutte le altre valutazioni sulla specificità eseguite su trapiantati di organi solidi (1-8), trapiantati di cellule staminali ematopoietiche (9,10) e individui con infezione da HIV (11), la concordanza tra il test QF-CMV e il test sierologico delle IgG di CMV è stata del 100%.

Sensibilità

Nel corso di uno studio eseguito su 343 campioni di individui sieropositivi per le IgG di CMV, è stato rilevato un livello di concordanza pari all'80,5% tra le risposte al test QF-CMV e i risultati dei test sierologici delle IgG di CMV: 276 campioni su 343 hanno infatti prodotto risultati reattivi al test QF-CMV e positivi al test sierologico delle IgG di CMV. È possibile che la discordanza osservata sia dovuta sierologia CMV falsa positiva o all'assenza di tipi HLA sensibili nei soggetti testati.

I livelli di concordanza nelle valutazioni della sensibilità che hanno riguardato i trapiantati di organi solidi (1-8), i trapiantati di cellule staminali ematopoietiche (9, 10) e i pazienti con infezione da HIV (11) sono risultati inferiori, forse a causa di una sierologia CMV falso-positiva, o dell'assenza di tipi HLA reattivi negli individui sottoposti al test o dell'assenza di cellule T reattive in questi pazienti dovuta alla loro immunosoppressione.

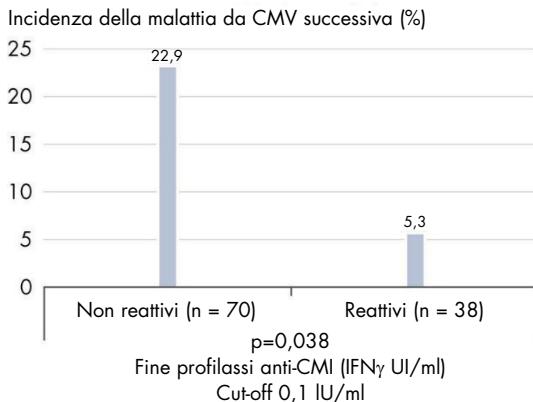
Studi che evidenziano l'utilità clinica

Sia per il test sierologico delle IgG di CMV, sia per il test QF-CMV, l'uso previsto è il rilevamento dell'immunità al virus CMV. Nell'ambito dei trapianti, il controllo sierologico per CMV viene ampiamente utilizzato prima del trapianto per determinare il rischio di insorgenza di complicanze da CMV nel paziente in seguito al trapianto, ma dopo il trapianto il suo valore è limitato. In alternativa, è possibile utilizzare il test QF-CMV nei pazienti sottoposti a trapianto per valutare il livello di immunità al CMV in quei pazienti a rischio di sviluppare infezione e/o malattia sintomatica da CMV a causa dell'immunosoppressione (12-15).

Diversi studi clinici pubblicati relativamente a varie coorti di trapianti hanno dimostrato l'utilità del test QuantiFERON-CMV (1-11, 15, 16).

Nell'ambito di un ampio studio condotto su 108 trapiantati di organi solidi (4), i pazienti con un risultato reattivo al test QF-CMV al termine della profilassi anti-CMV hanno fatto registrare una percentuale notevolmente più bassa di insorgenza successiva della malattia da CMV (3,3% o 1 su 30, con una soglia di 0,2 UI/ml) rispetto ai pazienti con un risultato non reattivo al test QF-CMV (21,8% ovvero 17 su 78, con $p = 0,044$) (Figura 5).

(A)



(B)

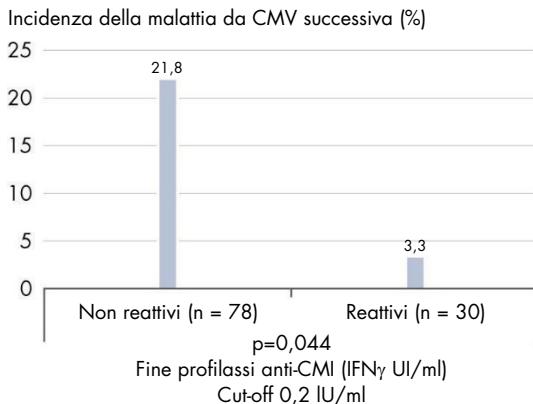


Figura 5. Livelli di insorgenza tardiva della malattia da CMV nei pazienti con risultato reattivo al test QuantiFERON-CMV rispetto al risultato non reattivo del test QuantiFERON-CMV al termine della profilassi. Dati sottostanti tratti da Kumar et al. (4).

Inoltre i pazienti sieronegativi per CMV sottoposti a trapianto di organo proveniente da un donatore sieropositivo per CMV (pazienti D+R-), con un risultato reattivo al test QF-CMV al termine della profilassi, non contraevano la malattia da CMV più spesso e per un periodo più lungo. Ciò conferma che il test QF-CMV può essere utilizzato per identificare i soggetti a rischio di sviluppare la malattia da CMV a insorgenza tardiva.

Lo studio ha inoltre evidenziato che, in questa coorte di pazienti trapiantati ad alto rischio di sviluppare la malattia da CMV (pazienti D+/R-), un risultato reattivo in qualsiasi momento della post-profilassi è associato ad una maggiore probabilità di non contrarre la malattia da CMV.

In uno studio di 37 pazienti sottoposti a trapianto di organi solidi (6), la valutazione delle risposte delle cellule T CD8⁺ specifiche per il CMV mediante QF-CMV ha agevolato la predizione della guarigione spontanea del virus rispetto alla progressione della malattia da CMV, in seguito ad aumenti della viremia CMV. In questo studio, 24 pazienti su 26 (92,3%) con risultato reattivo del test QF-CMV (utilizzando una soglia di test IFN- γ \geq 0,2 IU/ml) sono guariti spontaneamente dal virus CMV, mentre soltanto 5 pazienti su 11 (45,5%) con risultato non reattivo del test QF-CMV hanno riportato lo stesso esito.

Da uno studio condotto su 67 pazienti sottoposti a trapianto di polmone e riguardante la valutazione degli episodi di viremia CMV post-trapianto (7), è emerso che 18 episodi di viremia CMV su 25 (72%) erano stati preceduti da un risultato non reattivo al test QFCMV, mentre 4 episodi su 16 (25%) erano stati preceduti da un risultato reattivo al test QFCMV (test esatto di Fisher, $p = 0,0046$, Figura 6).

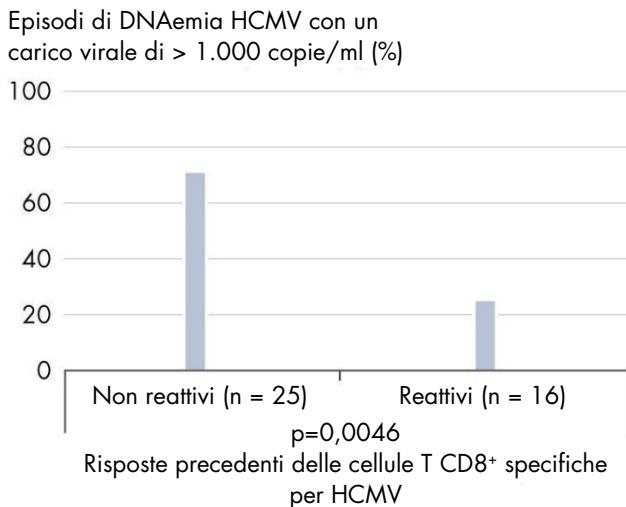


Figura 6. Analisi statistica delle risposte delle cellule T CD8⁺ specifiche per CMV rilevate dal test QuantiFERON-CMV e sviluppo della viremia CMV (test esatto di Fisher, p = 0,0046). Dati sottostanti tratti da Weseslindtner et al (7).

Da un ampio studio prospettico multicentrico condotto su 127 pazienti sieronegativi per CMV sottoposti a trapianto di organo solido da donatori sieropositivi per CMV (pazienti D+/R-) (8), tutti sottoposti a profilassi antivirale, è emerso che i pazienti che avevano avuto un risultato reattivo al test QF-CMV (soglia del test: 0,1 UI/ml) in un qualsiasi momento successivo al termine della profilassi anti-CMV erano interessati dall'insorgenza tardiva della malattia nei 12 mesi successivi al trapianto in percentuale notevolmente inferiore (6,4%) rispetto ai pazienti che avevano avuto un risultato non reattivo al test QFCMV (22,2%) e un risultato indeterminato (58,3%, p < 0,001). Al momento di classificare i risultati indeterminati e "non reattivi", l'insorgenza successiva della malattia da CMV era del 6,4% contro il 26,8%, p = 0,024. Per quanto riguarda quindi i valori predittivi positivi e negativi del test QF-CMV relativamente alla protezione dalla malattia da CMV, sono rispettivamente 0,90 (IC 95% 0,74-0,98) e 0,27 (IC 95% 0,18-0,37). Da questo studio è emerso che il test QF-CMV può rivelarsi utile nel determinare se i pazienti sono ad alto, medio o basso rischio di sviluppare la malattia da CMV in seguito alla profilassi.

In uno studio prospettico condotto su 55 pazienti sottoposti a trapianto di organo solido (8) e riguardante la relazione tra i risultati del test QF-CMV antecedenti il trapianto e gli episodi di replicazione CMV successivi al trapianto, è stata rilevata una più alta incidenza della replicazione CMV post-trapianto nei pazienti sieropositivi per CMV che avevano ottenuto un risultato di non reattività al test QF-CMV pre-trapianto con soglia del test pari a 0,2 UI/ml (7 su 14, ovvero il 50%), rispetto ai pazienti sieropositivi per CMV che avevano ottenuto un risultato di reattività al test QF-CMV pre-trapianto (4 su 30, ovvero il 13,3%, $p = 0,021$).

Da questo studio si evince che i pazienti sottoposti a trapianto di organo solido con una risposta di non reattività al test QF-CMV pre-trapianto corrono un rischio dieci volte maggiore di replicazione CMV rispetto ai pazienti con una risposta di reattività al test QF-CMV pre-trapianto (Odds Ratio corretto 10,49, IC 95% 1,88-58,46). Ne consegue che l'esame QF-CMV pre-trapianto potrebbe essere utile per predire il rischio di replicazione CMV post-trapianto e consentire quindi l'individualizzazione o personalizzazione della gestione dell'infezione da CMV dopo un trapianto di organo solido.

Sono stati condotti (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) o sono attualmente in corso in tutto il mondo numerosi altri studi per il rilevamento delle risposte delle cellule T CD8⁺ specifiche per il CMV mediante il test QF-CMV in una coorte di pazienti sottoposti a trapianto.

Linee guida internazionali di consenso sulla gestione del citomegalovirus nei trapianti di organi solidi

L'importanza del monitoraggio immunitario specifico per CMV è stata sostenuta e pubblicata nelle linee guida *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Linee guida internazionali di consenso aggiornate sulla gestione del citomegalovirus nei trapianti di organi solidi) (12). Queste linee guida internazionali, sviluppate da un gruppo di esperti in CMV e trapianto di organi solidi convocato dalla Infectious Diseases Section della Transplantation Society, sono linee guida di consenso basate su dimostrazioni e opinioni esperte in merito alla gestione del CMV, tra cui: diagnostica, immunologia, prevenzione e cura.

Queste linee guida concludono che il monitoraggio immunitario delle risposte delle cellule T specifiche per CMV possono indicare quali sono i soggetti a rischio di sviluppare la malattia da CMV in seguito al trapianto e possono rivelarsi utili per indirizzare la profilassi e le terapie preventive (12).

Inoltre, le linee guida forniscono anche consigli sulle caratteristiche dell'esame ideale per il monitoraggio immunitario che deve:

- Capacità di valutare la quantità e la funzione delle cellule T CD4⁺ e CD8⁺ del ricevente del trapianto
 - Misurare l'IFN- γ
 - Essere semplice da eseguire, economicamente conveniente e riproducibile
 - Avere un tempo di esecuzione breve
 - Permettere una spedizione comoda dei campioni ai laboratori specializzati di riferimento
- Il test QF-CMV soddisfa praticamente tutti i criteri specificati dalle linee guida ed è l'unico esame di monitoraggio immunitario standardizzato in grado di rilevare l'IFN γ specifico per CMV.

Caratteristiche delle prestazioni dell'esame

Il saggio QF-CMV ELISA utilizza uno standard IFN- γ umano ricombinante che è stato analizzato rispetto a una preparazione IFN- γ di riferimento (Rif. NIH: Gxg01-902-535). I risultati dei campioni analizzati sono espressi in Unità Internazionali (International Units, UI) relative a una curva standard preparata analizzando la diluizione dello standard secondario incluso nel kit.

È noto che gli anticorpi eterofili (ad es., gli anticorpi umani anti-murini, HAMA) presenti nel siero o nel plasma di alcuni individui possono interferire con gli immunodosaggi. L'effetto degli anticorpi eterofili sul test QF-CMV ELISA è ridotto al minimo grazie all'aggiunta di siero murino normale nel diluente GD 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 limite di sensibilità del QF-CMV ELISA è di 0,065 UI/ml e non vi sono prove di un effetto gancio (prozona) a dosi elevate con concentrazioni di IFN- γ fino a 10.000 UI/ml. Gli anticorpi del test QF-CMV ELISA non hanno avuto reazioni crociate con nessuna delle citochine analizzate, tra cui IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 e IL12.

La linearità del test QF-CMV ELISA è stata dimostrata distribuendo in modo casuale, sulla piastra ELISA, cinque 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 di correlazione di 0,99 (Figura 7).

Livello determinato di IFN- γ

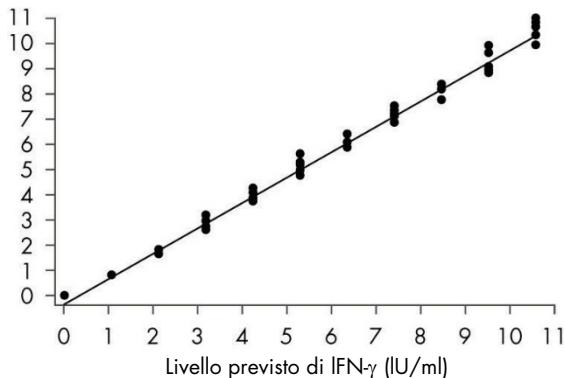


Figura 7. Profilo di linearità del test QF-CMV ELISA determinato analizzando cinque repliche di 11 campioni di plasma di concentrazioni di IFN- γ note.

La riproducibilità del test QF-CMV ELISA è stata stimata analizzando 20 campioni di plasma con concentrazioni variabili di IFN- γ in repliche di tre, presso tre laboratori, in tre giorni non consecutivi e con tre operatori. Pertanto ogni campione è stato analizzato 27 volte, in nove sedute di esame indipendenti. Un campione era un controllo Nil e aveva una concentrazione calcolata di IFN- γ pari a 0,08 (IC 95%: 0,07-0,09) UI/ml. Dei restanti 19 campioni di plasma, l'intervallo di concentrazioni era compreso tra 0,33 (IC 95% 0,31-0,34) e 7,7 UI/ml (IC 95% 7,48-7,92).

L'imprecisione nell'ambito dello stesso esame o tra esami diversi è stata stimata calcolando una media dei valori %CV per ogni campione di plasma contenente IFN- γ da ogni seduta da piastra ($n = 9$) ed è compresa tra 4,1 e 9,1% CV. La media interna alla seduta %CV (IC $\pm 95\%$) è stata di $6,6\% \pm 0,6\%$. La media del plasma con IFN- γ zero era pari a 14,1% CV.

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

Informazioni tecniche

Risultati indeterminati

I risultati indeterminati possono essere connessi allo stato immunitario del soggetto sottoposto al test, ma anche a numerosi fattori tecnici:

- Più di 16 ore trascorse tra il prelievo del sangue e l'incubazione a 37 °C.
- Conservazione del sangue a una temperatura non compresa nell'intervallo consigliato (22 ± 5 °C).
- Miscelazione insufficiente delle provette di raccolta per prelievo ematico
- Lavaggio incompleto della piastra ELISA

Se si sospettano problemi tecnici relativi a raccolta e manipolazione dei campioni di sangue, ripetere l'intero test QF-CMV con nuovi campioni ematici. Se si sospetta la mancata osservanza delle istruzioni relative al test ELISA, è possibile ripetere il test dei plasmi stimolati. I risultati indeterminati (a partire da valori di mitogeno bassi) non dovrebbero cambiare quando si ripete il test, a meno che non si verifichi un errore del test ELISA.

Coaguli nei campioni di plasma

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

Guida alla risoluzione dei problemi

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

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 vengano preparate correttamente, secondo le istruzioni contenute nel foglietto illustrativo del test QF-CMV ELISA.
- b) Errore di pipettamento Assicurarsi che le pipette siano calibrate e utilizzate in conformità alle istruzioni del produttore.
- c) Temperatura di incubazione troppo bassa L'incubazione del test ELISA dovrebbe avvenire a temperatura ambiente (22 ± 5 °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 viene incubata sulla piastra per 30 minuti.
- e) Filtro utilizzato per il lettore della piastra non valido La lettura della piastra deve avvenire a 450 nm con un filtro di riferimento da 620 a 650 nm.
- f) Reagenti troppo freddi Tutti i reagenti, tranne il coniugato concentrato 100x, devono essere portati a temperatura ambiente prima di avviare 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.

Sviluppo di colorazione aspecifica

- a) Lavaggio incompleto della piastra Lavare la piastra almeno sei volte con 400 pl di tampone di lavaggio per pozzetto. È possibile che siano necessari più di sei 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.

Commenti e suggerimenti

- | | |
|---|--|
| c) Kit/componenti scaduti | Assicurarsi di utilizzare il kit prima della data di scadenza. Assicurarsi che lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100x vengano utilizzati entro 3 mesi dalla data di ricostituzione. |
| d) Soluzione di substrato enzimatico contaminata | Se si osserva una colorazione blu, gettare via il substrato. Assicurarsi di utilizzare serbatoi puliti per i reagenti. |
| e) Miscelazione del plasma nelle provette per centrifuga prima della raccolta | Verificare che i campioni di plasma siano accuratamente raccolti da sopra il gel senza pipettare in alto e in basso, facendo attenzione a non alterare il materiale presente sulla superficie del gel. |
| Elevato rumore di fondo | |
| a) Lavaggio incompleto della piastra | Lavare la piastra almeno sei volte con 400 pl di tampone di lavaggio per pozzetto. È possibile che siano necessari più di sei 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) Temperatura di incubazione troppo elevata | L'incubazione del test ELISA dovrebbe avvenire a temperatura ambiente ($22 \pm 5^{\circ}\text{C}$). |
| c) Kit/componenti scaduti | Assicurarsi di utilizzare il kit prima della data di scadenza. Assicurarsi che lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100x vengano utilizzati entro 3 mesi dalla data di ricostituzione. |
| d) Soluzione di substrato enzimatico 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 sei volte con 400 pl di tampone di lavaggio per pozzetto. È possibile che siano necessari più di sei 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) Errore di diluizione dello standard | Assicurarsi che le diluizioni dello standard del kit siano preparate correttamente, secondo le istruzioni fornite in questo foglietto informativo. |
| 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. |

QIAGEN mette a disposizione gratuitamente informazioni sui prodotti e guide tecniche. È possibile richiederle direttamente al distributore o visitare il sito www.QuantiFERON.com.

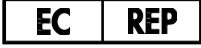
Riferimenti bibliografici

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. Infect. 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.

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
 <N>	Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni
	Data di scadenza
	Marchio CE
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale
	Codice GTIN (Global Trade Item Number)
	Limite di temperatura
	Non riutilizzare
	Tenere al riparo dalla luce
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Produttore
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea

Informazioni di contatto

Per assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultare servizi tecnici 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).

Procedura sintetica del test ELISA

Fase 1: Incubazione del sangue

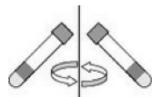
1. Raccogliere il sangue dei pazienti nelle provette di raccolta per prelievo ematico e miscelare scuotendole energicamente per dieci (10) volte in modo da assicurare che l'intera superficie interna della provetta sia ricoperta di sangue e che gli antigeni si sciolgano sulle pareti.



2. Incubare le provette in posizione verticale a 37 ± 1 °C per 16-24 ore.



3. Dopo l'incubazione, centrifugare le provette per 15 minuti a 2.000-3.000 RCF (g) per separare il plasma dai globuli rossi.



4. Dopo la centrifugazione, evitare di pipettare su e giù o di miscelare il plasma in qualsiasi modo prima di effettuare la raccolta. Fare sempre attenzione a non alterare il materiale presente sulla superficie del gel.



Fase 2: IFN- γ ELISA

1. Equilibrare 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.



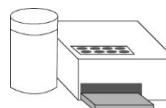
4. Preparare il coniugato pronto per l'uso con il diluente verde e aggiungerne 50 µl in tutti i pozzetti.



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.

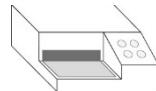


9. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.

10. Aggiungere 50 μ l di soluzione di arresto enzimatico in tutti i pozzetti. Miscelare con l'agitatore.



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



12. Analizzare i risultati.



Cronologia delle revisioni del manuale

Documento	Modifiche	Data
L1075110-R06	Materiale necessario ma non in dotazione, aggiunta coperchi per le piastre, pagina 9	Ottobre 2019

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

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

Contratto di licenza limitata per il kit QuantiFERON-CMV ELISA

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

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e 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 fuori delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non garantisce che questo pannello e/o il suo utilizzo non violino i diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualsunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri fra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello accettano di non prendere o permettere a chiunque altro di prendere misure che potrebbero portare o facilitare qualsiasi atto vietato sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo pannello e/o ai relativi componenti.

Per le condizioni di licenza aggiornate, consultare il sito www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, tutti i diritti riservati

