

---

# QuantiFERON<sup>®</sup>-CMV

## Foglietto illustrativo 2 x 96

Test dell'interferone gamma nel sangue intero per la misurazione delle risposte agli antigeni peptidici del citomegalovirus umano

**IVD**

**CE**

**REF** 0350-0201



Cellestis, società del gruppo QIAGEN

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia

Tel.: (Australia) +613-9840-9800, (Europa) +49-2103-29-12000

**EC REP**

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, GERMANIA

1075110IT Rev. 01



# Indice generale

<b>Uso previsto</b>	<b>4</b>
<b>Introduzione</b>	<b>4</b>
Principi del test	5
Tempo necessario per l'esecuzione del test	5
<b>Reagenti e conservazione</b>	<b>6</b>
Materiale necessario ma non fornito	7
Conservazione e manipolazione	7
<b>Avvertenze e precauzioni</b>	<b>8</b>
<b>Prelievo e manipolazione dei campioni</b>	<b>9</b>
<b>Istruzioni per l'uso</b>	<b>10</b>
Fase 1 – Incubazione del sangue e raccolta del plasma	10
Fase 2 – QuantiFERON-CMV ELISA per IFN- $\gamma$ umano	11
<b>Calcoli e interpretazione del test</b>	<b>13</b>
Interpretazione dei risultati	14
<b>Limitazioni</b>	<b>15</b>
<b>Risultati attesi</b>	<b>15</b>
<b>Caratteristiche prestazionali</b>	<b>17</b>
Test comparativo	17
Soglia del test	17
<b>Studi clinici</b>	<b>18</b>
Specificità	18
Sensibilità	18
Studi che evidenziano l'utilità clinica	19
Linee guida di consenso internazionale sulla gestione del citomegalovirus nei trapianti di organi solidi	22
<b>Caratteristiche prestazionali del test</b>	<b>22</b>
<b>Informazioni tecniche</b>	<b>24</b>
Risultati indeterminati	24
Guida alla risoluzione dei problemi	25

<b>Bibliografia</b>	<b>26</b>
<b>Assistenza tecnica</b>	<b>27</b>
<b>Procedura abbreviata del test</b>	<b>30</b>
Fase 1 - Incubazione del sangue	30
Fase 2 - ELISA per IFN- $\gamma$	30

## Uso previsto

QuantIFERON-CMV (QF-CMV) è un test in vitro che utilizza un cocktail peptidico per simulare le proteine del citomegalovirus umano (CMV) e stimolare le cellule del sangue intero eparinizzato. La rilevazione dell'interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) mediante ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, test immuno-assorbente legato agli enzimi) viene impiegata 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 dovrebbe essere utilizzato per escludere l'infezione da CMV.

## Introduzione

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 immunosoppressive utilizzate per prevenire il rigetto di un organo trapiantato hanno effetti negativi sui linfociti T e sulle risposte immunitarie cellulo-mediate (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<sup>+</sup> citotossici (CTL) specifici per il CMV sono in grado di offrire protezione dalla patogenesi associata al virus. L'enumerazione dei linfociti T CD8<sup>+</sup> citotossici specifici per il CMV nei pazienti immunosoppressi e la produzione di IFN- $\gamma$  possono essere predittivi del rischio di sviluppare la malattia da CMV. La produzione di IFN- $\gamma$  può essere un surrogato funzionale dell'identificazione dei linfociti T citotossici specifici per il CMV.

QF-CMV è un test che misura le risposte immuni cellulo-mediate agli antigeni peptidici che simulano le proteine CMV. I peptidi CMV sono studiati per agire sulle cellule T CD8<sup>+</sup>, 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<sup>+</sup> che riconoscono questi antigeni. Il processo di riconoscimento comporta la produzione e la secrezione della citochina, IFN- $\gamma$ . La rilevazione e la successiva quantificazione dell'IFN- $\gamma$  rappresentano la base di questo test.

## Principi del test

Il test QF-CMV viene eseguito in 2 fasi. Innanzitutto il sangue intero viene raccolto in ciascuna delle provette per prelievo ematico di QF-CMV che comprendono una provetta per controllo nullo, 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 viene assicurato soprattutto nei casi in cui sussistano dubbi circa lo stato immunitario del soggetto.

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- $\gamma$  (UI/ml) con il test QF-CMV ELISA.

Capita spesso che la quantità di IFN- $\gamma$  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 IU/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- $\gamma$ , 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- $\gamma$  se la provetta con antigene CMV presenta un valore significativamente superiore al valore di IFN- $\gamma$  espresso in UI/ml presente nella provetta per controllo nullo. Il campione di plasma stimolato dal mitogeno funge da controllo positivo dell'IFN- $\gamma$  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- $\gamma$ , come nel caso di pazienti sottoposti recentemente a trapianto. Il campione nullo compensa il livello di fondo o di IFN- $\gamma$  non specifico nei campioni di sangue. Il livello di IFN- $\gamma$  nella provetta di controllo nullo viene sottratto al livello di IFN- $\gamma$  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 la sezione "Interpretazione dei risultati" a pagina 14 del presente foglietto illustrativo).

## Tempo necessario per l'esecuzione del test

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

Incubazione a 37 °C delle provette di sangue:	da 16 a 24 ore
ELISA:	circa 3 ore per 1 piastra ELISA
	Meno di 1 ora di lavoro
	Aggiungere 10-15 minuti per ogni piastra in più

## Reagenti e conservazione

<b>CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (provette per prelievo ematico con antigene CMV e di controllo), confezione singola paziente</b>	
<b>N° di catalogo</b>	<b>0192-0301</b>
<b>Numero di preparazioni</b>	<b>1</b>
QuantiFERON Nil Control (controllo nullo QuantiFERON), tappo grigio	1 provetta
CMV Antigen (antigene CMV), tappo blu	1 provetta
QuantiFERON Mitogen Control (controllo con mitogeno QuantiFERON), tappo viola	1 provetta
Foglietto illustrativo	1
<b>QuantiFERON-CMV ELISA Components (componenti del test QuantiFERON-CMV ELISA)</b>	
<b>N° di catalogo</b>	<b>0350-0201</b>
Strisce per micropiastre	24 x 8 strisce per pozzetto
Human IFN- $\gamma$ Standard (standard IFN- $\gamma$ umano), liofilizzato	1 fiala
Green Diluent (diluente verde)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (coniugato concentrato 100X QuantiFERON), liofilizzato	1 x 0,3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (tampono di lavaggio concentrato 20X QuantiFERON)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (soluzione di substrato enzimatico QuantiFERON)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (soluzione di arresto enzimatico QuantiFERON)	1 x 15 ml

## Materiale necessario ma non fornito

- Incubatore a 37 °C; CO<sub>2</sub> non richiesta
- Pipette calibrate a volume variabile per l'erogazione di 10-1000 µl con puntali monouso
- Pipetta calibrata multicanale 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 a 650 nm

## Conservazione e manipolazione

### Provette per prelievo ematico

- Conservare le provette per prelievo ematico a una temperatura compresa tra 4 °C e 25 °C.
- Le provette per il prelievo ematico QuantiFERON-CMV hanno una durata massima di 15 mesi dalla data di produzione, se conservate a una temperatura compresa tra 4 °C e 25 °C.

### Reagenti del kit ELISA

- Conservare il kit ad una temperatura compresa tra 2 °C e 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 "Istruzioni per l'uso – Fase 2" (passaggi 3 e 5 a pagina 11).

- Se conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C, lo standard ricostituito del kit si mantiene fino a 3 mesi.

Prendere nota della data in cui è stato ricostituito lo standard del kit.

- In seguito alla ricostituzione, il coniugato concentrato 100X QuantiFERON non utilizzato va conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C e utilizzato nell'arco di 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 (17-27 °C) per un massimo di 2 settimane.

# Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro.

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di sicurezza sul prodotto (SDS). Queste schede sono disponibili online nel pratico formato PDF sul sito [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e componente del kit QIAGEN.



**ATTENZIONE: manipolare il sangue umano come se fosse potenzialmente infettivo.** Attenersi alle relative linee guida sulla manipolazione del sangue.

Le seguenti frasi sui rischi e sulla sicurezza si applicano ai componenti del kit QF-CMV ELISA.

## QuantifERON Enzyme Stopping Solution (soluzione di arresto enzimatico QuantifERON)



Contiene acido solforico: irritante. Frasi di rischio e di sicurezza:\* R36/38, S26-36/37/39

- **Il diluente verde** contiene siero normale di topo e caseina che possono provocare reazioni allergiche; evitare il contatto con la pelle.

### Per emergenza chimica

#### Fuoriuscita, perdita, esposizione o incidente

Chiamare CHEMTREC giorno e notte

Negli USA e in Canada: 1-800-424-9300

Al di fuori di USA e Canada: +1-703-527-3887 (chiamate a carico accettate)

### Ulteriori informazioni

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

\* R36/38: irritante per gli occhi e la pelle; S26: in caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico; S36/37/39: usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.



# Prelievo e manipolazione dei campioni

Punti importanti prima di iniziare:

La mancata osservanza delle istruzioni presenti nel foglietto illustrativo del test QF-CMV può generare risultati erranei. Prima dell'uso, leggere attentamente le istruzioni.

- Se un flacone di reagente è danneggiato o perde prima dell'uso, non utilizzare il kit.
- Non miscelare o utilizzare i reagenti ELISA appartenenti ad altri lotti del kit QF-CMV ELISA.
- Smaltire i reagenti non utilizzati e i campioni biologici nel rispetto delle normative locali, statali e federali.
- Non utilizzare le provette per il prelievo ematico QF-CMV né i kit QF-CMV ELISA oltre la data di scadenza.

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

1. Controllo nullo (tappo grigio)
2. Antigene CMV (tappo blu)
3. Controllo con mitogeno (tappo viola)

Gli antigeni aderiscono alle pareti interne delle provette per il 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 per il prelievo ematico QF-CMV.**

- Dato che nelle provette da 1 ml il sangue fluisce abbastanza lentamente, mantenere la provetta sull'ago per 2-3 secondi quando sembra completamente piena, per accertarsi di prelevare il volume corretto.

La tacca nera sul lato delle provette indica il volume di riempimento di 1 ml. Le provette per il prelievo ematico QF-CMV sono state approvate per volumi che vanno da 0,8 a 1,2 ml. Se il livello di sangue in una delle provette non raggiunge il livello dell'indicatore, si consiglia di prelevare un altro campione di sangue.

- Le provette per il prelievo ematico QF-CMV sono state approvate per prelevare volumi compresi tra 0,8 e 1,2 ml ad altitudini di 810 m sul livello del mare. Al di sopra di tale altitudine gli utenti sono tenuti a verificare che il sangue prelevato in ciascuna provetta rientri in tali limiti. Se viene prelevato un volume di sangue insufficiente, è possibile utilizzare una siringa per prelevarne dell'altro e trasferirne 1 ml in ciascuna delle 3 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 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.
- Se per il prelievo del sangue viene impiegato un ago a farfalla, prima di usare le provette per il prelievo ematico QF-CMV, è opportuno utilizzare una provetta "vuota" per verificare che il tubicino si sia riempito di sangue.

2. **Subito dopo aver riempito le provette, scuoterle 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 dissolvano sulle pareti.**
  - Al momento del riempimento, le provette vanno mantenute a una temperatura compresa tra 17 °C e 25 °C.
  - Non agitare in modo troppo energico per evitare la disgregazione del gel e il conseguente rischio di generare risultati aberranti.
3. **Etichettare correttamente le provette.**
4. **Le provette devono essere trasferite in un incubatore a 37 °C ± 1 °C il prima possibile e comunque entro 16 ore dal prelievo. Non refrigerare né congelare i campioni di sangue.**

## Istruzioni per l'uso

### Fase 1 – Incubazione del sangue e raccolta del plasma

1. **Se il sangue non viene incubato subito dopo il prelievo, è necessario ripetere la miscelazione delle provette immediatamente prima dell'incubazione, come descritto nella fase 2 della sezione precedente.**
2. **Incubare le provette IN POSIZIONE VERTICALE a 37 °C per 16-24 ore. L'incubatore non richiede CO<sub>2</sub> né umidificazione.**
3. **In seguito all'incubazione, è possibile conservare le provette per il prelievo ematico a una temperatura compresa tra 2 °C e 27 °C per un massimo di 3 giorni prima della fase successiva. Dopo l'incubazione a 37 °C, centrifugare le provette per 15 minuti a 2000-3000 RCF (g). Il tampone in gel consente di separare le cellule dal plasma. Se non dovesse accadere, è necessario centrifugare di nuovo le provette ad una velocità più elevata.**
  - È possibile raccogliere il plasma senza centrifugazione, ma occorre prestare maggior attenzione durante la rimozione del plasma senza alterare le cellule.
4. **In seguito alla centrifugazione, evitare di pipettare in alto o in basso 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.**
  - È opportuno raccogliere i campioni di plasma utilizzando esclusivamente una pipetta.
  - I campioni di plasma possono essere caricati direttamente dalle provette per il prelievo ematico centrifugate nella piastra QF-CMV ELISA, anche quando si utilizzano stazioni di lavoro ELISA automatizzate.
  - I campioni di plasma possono essere conservati per un massimo di 28 giorni a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C se raccolti, oppure a una temperatura inferiore a -20 °C (preferibilmente inferiore a -70 °C) per periodi più lunghi in provette o contenitori per la conservazione del plasma.

## Fase 2 – QuantiFERON-CMV ELISA per IFN- $\gamma$ umano

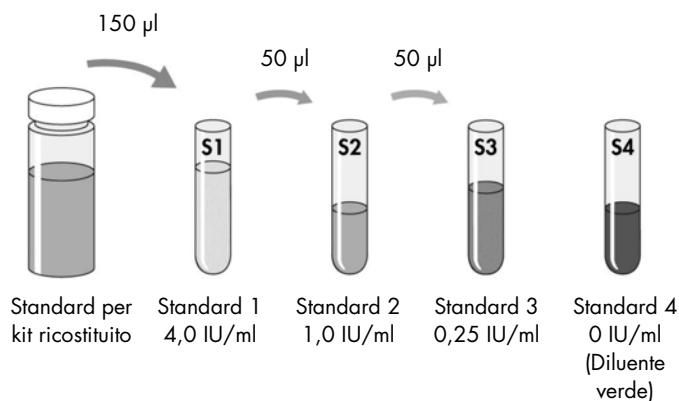
1. Tutti i campioni di plasma e i reagenti, tranne il coniugato concentrato 100X, devono essere portati a temperatura ambiente (17 °C-27 °C) prima dell'uso. Calcolare almeno 60 minuti per l'equilibramento.
2. Togliere le strisce non necessarie dal supporto, risigillare il sacchetto di alluminio e conservare 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 liofilizzato del kit con il volume di acqua deionizzata o distillata indicato sull'etichetta del flacone dello standard. Miscelare delicatamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma e assicurare la completa risolubilizzazione. La ricostituzione dello standard al volume indicato genera una soluzione con una concentrazione pari a 8,0 UI/ml.
4. La curva standard viene preparata utilizzando 3 diluizioni dello standard del kit e il diluente verde da solo come standard 4 (0 UI/ml).

Utilizzare lo standard ricostituito del kit per produrre una serie di diluizioni di 3 concentrazioni di IFN- $\gamma$ . Diluire nel diluente verde (GD) del kit (vedi Figura 1). Gli standard vanno analizzati almeno in duplicato; la procedura seguente consente di generare il volume opportuno.

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



**Figura 1. Preparazione della curva standard.** Preparare nuove diluizioni dello standard del kit per ciascuna sessione ELISA.

5. Ricostituire il coniugato concentrato 100X liofilizzato QuantiFERON 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.

6. **Il coniugato pronto per l'uso viene preparato diluendo la quantità necessaria di coniugato concentrato 100X ricostituito nel diluente verde, come indicato nella Tabella 1 – Preparazione del coniugato.**
- Per evitare la formazione di schiuma, mescolare con cura e delicatezza.
  - Riportare il coniugato concentrato 100X non utilizzato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C subito dopo l'uso.
  - Utilizzare esclusivamente diluente verde.

**Tabella 1. Preparazione del coniugato**

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

7. **Prima di effettuare il test, è necessario miscelare i campioni di plasma per assicurare una distribuzione uniforme dell'IFN-γ in ciascun campione. Inoltre, se sono necessari risultati quantitativi, diluire il plasma CMV e il plasma mitogeno in rapporto 1:10 con diluente verde (10 µl di plasma miscelato con 90 µl di diluente verde). Il plasma nullo non va diluito.**

Si consiglia di analizzare i seguenti campioni:

- nullo, antigene CMV, mitogeno, antigene CMV (1:10), mitogeno (1:10)

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

- nullo, antigene CMV, mitogeno
- nullo, antigene CMV (1:10), mitogeno (1:10)
- nullo, antigene CMV, mitogeno, antigene CMV (1:10)
- nullo, antigene CMV (1:10), mitogeno

8. **Aggiungere 50 µl di coniugato pronto per l'uso appena preparato nei pozzetti ELISA necessari mediante una pipetta multicanale.**
9. **Aggiungere 50 µl di campioni di plasma in esame nei pozzetti opportuni mediante una pipetta multicanale. Infine, aggiungere 50 µl di ciascuno degli standard da 1 a 4.**

10. **Miscelare con cura il coniugato e i campioni di plasma/standard mediante un agitatore per micropiastre per 1 minuto.**
11. **Coprire ogni piastra con un coperchio e incubare a temperatura ambiente (17-27 °C) per 120 ± 5 minuti.**
  - È opportuno non esporre le piastre alla luce diretta durante l'incubazione.
12. **Durante l'incubazione, 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 concentrato 20X è sufficiente per preparare 2 litri di tampone di lavaggio pronto per l'uso.**

Lavare i pozzetti con **400 µl** di tampone di lavaggio pronto per l'uso per almeno 6 cicli. Si consiglia di utilizzare un sistema di lavaggio automatico.

  - Per ottenere prestazioni ottimali del test, è molto importante risciacquare abbondantemente. Verificare che tutti i pozzetti siano **riempiti completamente** di tampone di lavaggio fino al bordo ad ogni ciclo di lavaggio. Si consiglia di effettuare un ciclo 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 di tampone di lavaggio, dare dei colpetti alle piastre capovolte su un panno assorbente. Aggiungere 100 µl di soluzione di substrato enzimatico in ogni pozzetto e miscelare con cura utilizzando un agitatore per micropiastre.**
14. **Coprire ogni piastra con un coperchio e incubare a temperatura ambiente (17-27 °C) per 30 minuti.**
  - È opportuno non esporre le piastre alla luce diretta durante l'incubazione.
15. **Trascorsi i 30 minuti di incubazione, aggiungere 50 µl di soluzione di substrato enzimatico in ogni pozzetto e miscelare.**
  - È necessario aggiungere la soluzione di arresto enzimatico nei pozzetti seguendo lo stesso ordine e circa alla stessa velocità del substrato nel passaggio 13.
16. **Misurare la densità ottica (OD) di ogni pozzetto entro 5 minuti dall'arresto della reazione mediante un lettore per micropiastre dotato di filtro da 450 nm e di filtro di riferimento da 620 nm a 650 nm. I valori 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](http://www.QuantiFERON.com).

Il software effettua il controllo della qualità del test, genera una curva standard e fornisce un risultato per ogni paziente, come illustrato nella sezione Interpretazione dei risultati.

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

### Generazione della curva standard

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

Costruire una curva standard  $\log_{(e)}-\log_{(e)}$  tracciando il  $\log_{(e)}$  dell'OD media (asse y) rispetto al  $\log_{(e)}$  della concentrazione dell'IFN- $\gamma$  degli standard espressa in UI/ml (asse x), omettendo da questi calcoli lo standard zero. Calcolare la bontà di adattamento della curva standard mediante l'analisi della regressione.

Utilizzare la curva standard per determinare la concentrazione dell'IFN- $\gamma$  (UI/ml) di ciascuno dei campioni di plasma in esame, utilizzando il valore dell'OD di ciascun campione.

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

## 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 dell'OD dello standard 1 deve essere  $\geq 0,600$ .
- Il %CV dei valori dell'OD dei replicati degli standard 1 e 2 deve essere  $\leq 15\%$ .
- 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  $\geq 0,98$ .

Se i criteri summenzionati non vengono soddisfatti, il test non è valido e va ripetuto.

Il valore medio dell'OD dello standard zero (diluente verde) deve essere  $\leq 0,150$ . Se il valore medio dell'OD 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 seguenti:

CMV meno nullo (IU/ml)*	Mitogeno meno nullo (IU/ml)	Risultato del test QF-CMV	Relazione/Interpretazione
$< 0,2$	$\geq 0,5$	Non reattivo	Immunità anti-CMV NON rilevata
$\geq 0,2$	Nessuno	Reattivo	Immunità anti-CMV rilevata
$< 0,2$	$< 0,5$	Indeterminato <sup>†</sup>	Risultato indeterminato per la risposta al CMV

\* È possibile che le risposte dell'IFN- $\gamma$  all'antigene CMV e al controllo positivo del mitogeno siano spesso al di fuori dell'intervallo del lettore per micropiastre. Tale fenomeno non ha alcun impatto sui risultati qualitativi.

<sup>†</sup> Per le possibili cause consultare la sezione Risoluzione dei problemi.

## Limitazioni

I risultati del test QuantiFERON-CMV devono essere utilizzati tenendo conto di storia epidemiologica, stato clinico attuale e altre valutazioni diagnostiche relative al soggetto in esame.

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

- mancata osservanza della procedura descritta nel foglietto illustrativo
- livelli eccessivi di IFN- $\gamma$  nella provetta nulla
- più di 16 ore trascorse tra il prelievo del campione e l'incubazione a 37 °C

## Risultati attesi

I valori attesi dell'IFN- $\gamma$  mediante il test QuantiFERON-CMV sono stati ottenuti analizzando 591 campioni prelevati da soggetti adulti sani, 341 dei quali risultavano sieropositivi per CMV e 250 sieronegativi. Nei 250 soggetti adulti sani che non presentavano infezione da CMV, come stabilito dal controllo sierologico per CMV (sieronegativo per CMV), il 100% dei soggetti ha riportato risposte dell'IFN- $\gamma$  pari a < 0,2 IU/ml nella provetta con antigene CMV (meno nullo). La distribuzione dei risultati della provetta con antigene CMV (meno nullo) nei 341 soggetti sani con infezione da CMV, come stabilito dal controllo sierologico per CMV (sieropositivo per CMV), è riportata nella Figura 2.

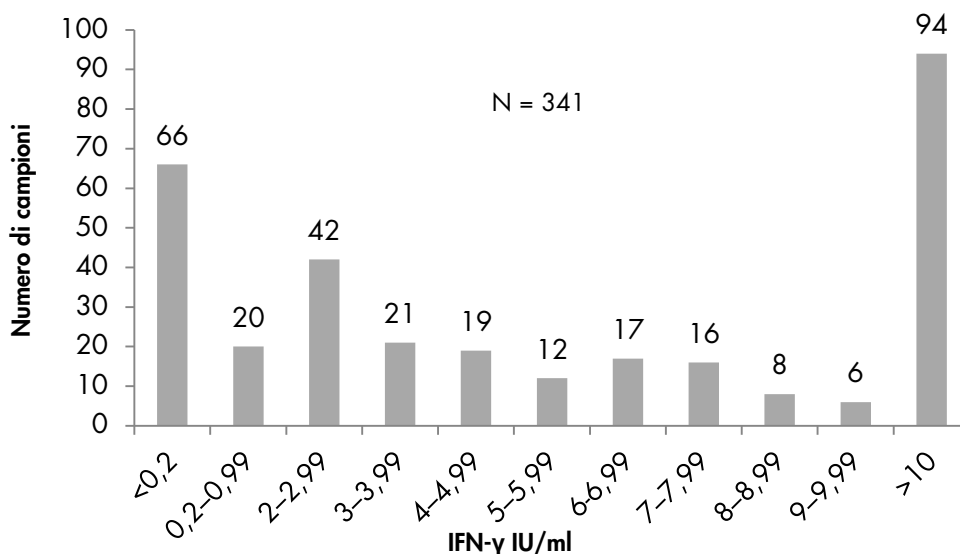
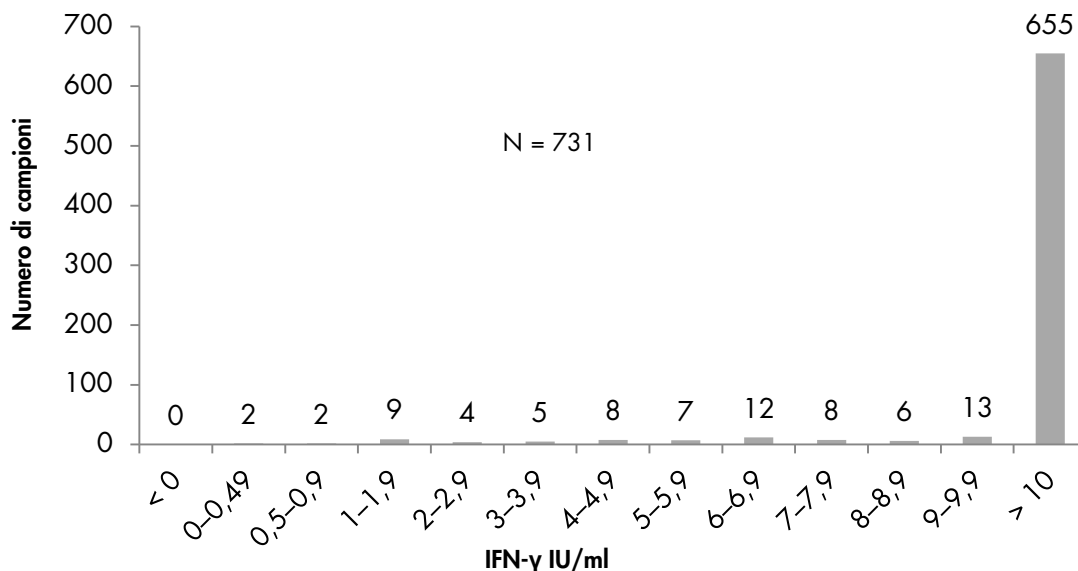


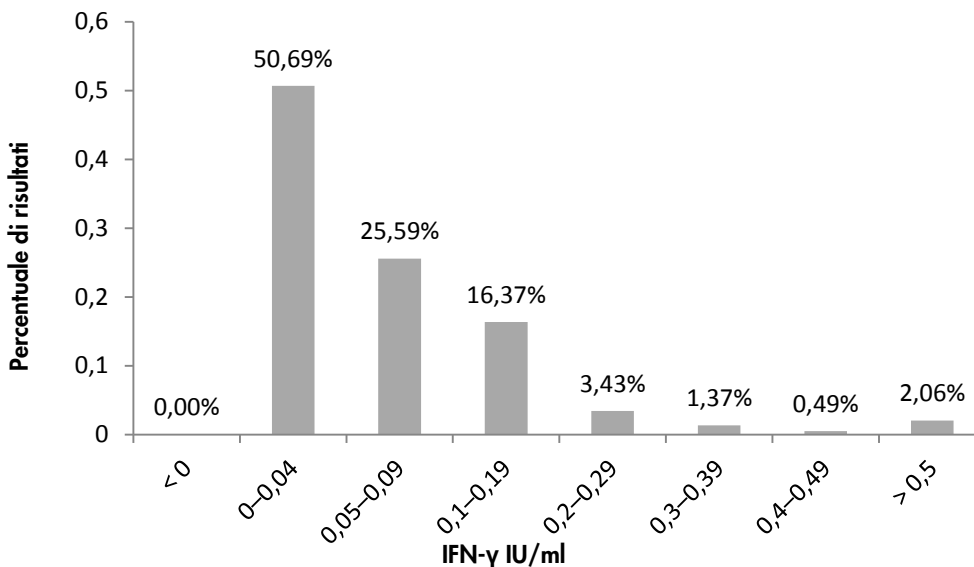
Figura 2. Distribuzione delle risposte dell'IFN- $\gamma$  con criterio CMV-nullo nei soggetti sani sieropositivi (n=341).

Nella Figura 3 viene riportata la distribuzione dei risultati della provetta con mitogeno (meno sfondo nullo) in 731 campioni di sangue normale prelevati da soggetti adulti sani, indipendentemente dall'infezione nota da CMV. Il risultato di mitogeno (meno nullo) inferiore a 0,5 IU/ml indica che il test non è riuscito o che il soggetto è immunocompromesso. In una popolazione sana, solo 2 risultati su 731 sono rientrati in questa categoria.



**Figura 3. Distribuzione delle risposte dell'IFN- $\gamma$  con criterio mitogeno-nullo in soggetti adulti sani (n = 731).**

I valori attesi per le provette nulle sono riportati nella Figura 4. I dati provengono da 1020 campioni di plasma prelevati da soggetti adulti sani e analizzati con il test QuantiFERON-CMV ELISA.



**Figura 4. Distribuzione (espressa come % di popolazione) delle risposte dell'IFN- $\gamma$  in soggetti adulti sani (n = 1020).**



# Caratteristiche prestazionali

## Test comparativo

Il valore di soglia del test per la rilevazione dell'esposizione a CMV mediante test QF-CMV è stato determinato in seguito all'analisi dei risultati provenienti da un gruppo di soggetti sani (n = 223) di cui sono stati confrontati i risultati del test QF-CMV e i risultati sierologici per 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 nullo) forniva valori di predizione positivi e negativi ottimali per il test QF-CMV (area sotto la curva = 0,9679 [95%CI = 0,9442-0,9915,  $p < 0,0001$ ]) e, di conseguenza, costituiva il valore di soglia in cui questo test esprimeva in modo più efficace il suo uso previsto in una popolazione sana.

Nel test comparativo, le prestazioni di QF-CMV sono state confrontate con quelle del test sierologico per l'IgG del CMV SeraQuest (Quest International). Il test QF-CMV ha dimostrato una concordanza del 95% (294 soggetti su 310) con il test comparativo sierologico anti-HCMV in soggetti sani; nessuno dei 149 donatori sieronegativi ha dimostrato reattività con QF-CMV e 145 donatori sieropositivi su 161 hanno manifestato una risposta reattiva dell'IFN- $\gamma$ . La concordanza positiva generale è stata del 90% con un valore di concordanza negativa del 100%. Nella Tabella 2 viene riportato il livello di concordanza tra le risposte dell'IFN- $\gamma$  ai peptidi CMV, misurate dal test QF-CMV, e lo stato sierologico anti-CMV, determinato con il test sierologico per l'IgG del CMV SeraQuest, in soggetti sani.

**Tabella 2. Concordanza tra il test QuantiFERON-CMV e il test sierologico per l'IgG del CMV in soggetti sani.**

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

## Soglia del test

La soglia consigliata dai test clinici per questo test è di 0,2 IU/ml nella provetta con antigene CMV (meno nullo), sebbene possano essere approvate soglie diverse per impostazioni cliniche differenti. La motivazione sta nelle principali differenze immunologiche tra una popolazione normale sottoposta a test e popolazioni in cui il test viene considerato utile dal punto di vista clinico, in particolare i soggetti immunosoppressi che sono a rischio di sviluppare infezione e/o malattia sintomatica da CMV a causa dell'immunosoppressione. In questi soggetti ad alto rischio, l'utilità clinica del QF-CMV sta nella rilevazione precisa del livello di immunità anti-CMV in tali soggetti, in quanto la mancanza di immunità può essere associata allo sviluppo della malattia da CMV (1-5, 7, 8, 11-16).

## Studi clinici

Dal momento 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 QF-CMV è stata approssimata mediante la valutazione del livello di concordanza tra le risposte dell'IFN- $\gamma$  ai peptidi CMV, misurate dal test QF-CMV, e lo stato sierologico anti-CMV, determinato con il test sierologico per l'IgG del CMV, in soggetti sani.

La specificità del QF-CMV è stata approssimata valutando i tassi dei falsi positivi (risposta reattiva al QF-CMV) in soggetti sani con nessuna evidenza di esposizione a CMV precedente (soggetti sieronegativi per CMV). La sensibilità è stata approssimata valutando i soggetti sani con evidenza di esposizione a CMV precedente (soggetti sieropositivi per CMV). Sebbene QF-CMV utilizzi un elevato numero di epitopi specifici per CMV provenienti da diverse proteine del CMV, fornendo così un'ampia applicazione clinica su una vasta gamma di popolazioni di aplotipi HLA di classi diverse, la copertura di questi peptidi non è del 100%. Poiché gli aplotipi HLA dei soggetti sottoposti a test sierologico per CMV non erano noti, una piccola percentuale di soggetti positivi al test sierologico era probabile che non rispondesse alle provette QF-CMV.

## Specificità

In uno studio condotto su soggetti sani con nessuna evidenza di esposizione a CMV precedente (i soggetti sieronegativi per CMV erano  $n = 250$ ), il livello di concordanza tra le risposte dell'IFN- $\gamma$  ai peptidi CMV, misurate dal test QF-CMV, e le informazioni sierologiche anti-CMV è risultato essere del 100%.

In tutte le altre valutazioni sulla specificità condotte su soggetti sottoposti a trapianto di organi solidi (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), soggetti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (7, 13) e soggetti affetti da HIV (2), il livello di concordanza tra le risposte dell'IFN- $\gamma$  ai peptidi CMV, misurate dal test QF-CMV e dal controllo sierologico anti-CMV, è risultato essere costantemente pari al 100%.

## Sensibilità

In uno studio condotto su soggetti sani con evidenza di esposizione a CMV precedente (i soggetti sieropositivi per CMV erano  $n = 341$ ), il livello di concordanza tra le risposte dell'IFN- $\gamma$  ai peptidi CMV, misurate dal test QF-CMV, e il controllo sierologico anti-CMV è risultato essere dell'80,6% (275 su 341). È possibile che la discordanza osservata sia dovuta all'uso di una soglia del test più alta (0,2 IU/ml), al risultato falso positivo del controllo sierologico per CMR o alla mancata risposta dei soggetti ai peptidi CMV inclusi nel test.

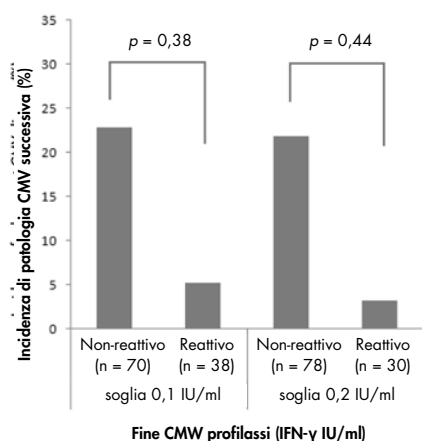
Nelle valutazioni sulla sensibilità condotte su soggetti sottoposti a trapianto di organi solidi (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), soggetti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (7, 13) e soggetti affetti da HIV (2), sono emersi livelli di concordanza leggermente inferiori tra le risposte dell'IFN- $\gamma$  ai peptidi CMV, misurate dal test QF-CMV, e le risposte sieropositive per CMV. È possibile che il livello più basso di concordanza sia dovuto al risultato falso positivo del controllo sierologico per CMV, alla mancata risposta dei pazienti ai peptidi CMV inclusi nel test o all'assenza di cellule T reattive dovuta all'immunosoppressione.

## Studi che evidenziano l'utilità clinica

Sia il controllo sierologico sia il test QF-CMV hanno come uso previsto la rilevazione dell'immunità al 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 (6, 9-11).

Numerosi studi clinici pubblicati su diverse tipologie di trapianto hanno dimostrato l'utilità del test QuantiFERON-CMV (1-5, 7, 8, 11-16).

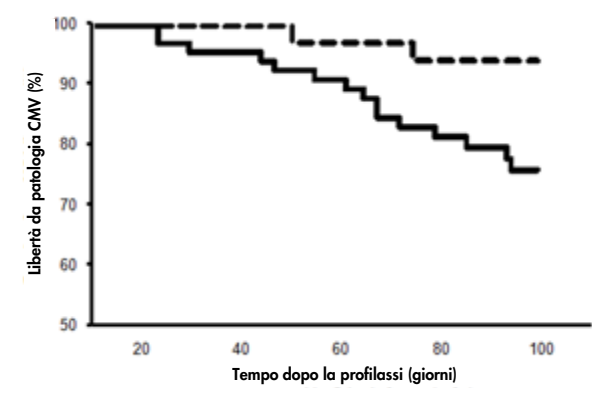
In un ampio studio condotto su 108 soggetti sottoposti a trapianto di organi solidi (4), i pazienti che hanno riportato un risultato reattivo al test QF-CMV al termine della profilassi anti-CMV hanno mostrato un livello notevolmente più basso di insorgenza tardiva della malattia rispetto ai pazienti che hanno riportato un risultato non reattivo al test QF-CMV (il 5,3% contro il 22,9% rispettivamente,  $p=0,044$ ) (Figura 5).



**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 riprodotti da Kumar et al.(4)

Inoltre, i pazienti reattivi al test QF-CMV al termine della profilassi rimanevano immuni dalla malattia da CMV con maggiore frequenza e per un periodo più lungo (Figura 6), confermando che il test QF-CMV può essere utilizzato per rilevare i soggetti a rischio di sviluppare la malattia da CMV ad insorgenza tardiva.

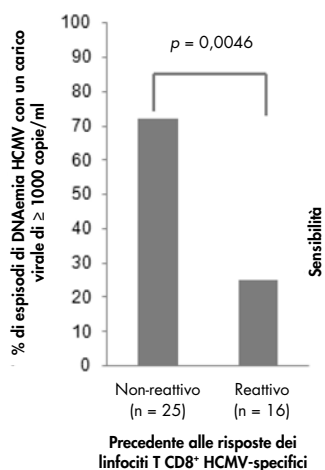


**Figura 6. Tempo trascorso per lo sviluppo della malattia da CMV nei pazienti con risultato reattivo al test QuantiFERON-CMV (indicato dalla linea tratteggiata) rispetto al risultato non reattivo del test QuantiFERON-CMV (indicato dalla linea continua) al termine della profilassi.** Dati riprodotti da Kumar et al.(4)

Da questo studio è emerso anche che nella coorte di pazienti sottoposti a trapianto a elevato rischio di sviluppare la malattia da CMV (pazienti sieronegativi per CMV sottoposti a trapianto di organo proveniente da un donatore sieropositivo per CMV, ovvero D+/R-), il risultato reattivo del QF-CMV successivo alla profilassi era associato al 90% di probabilità di rimanere immuni alla malattia da CMV.

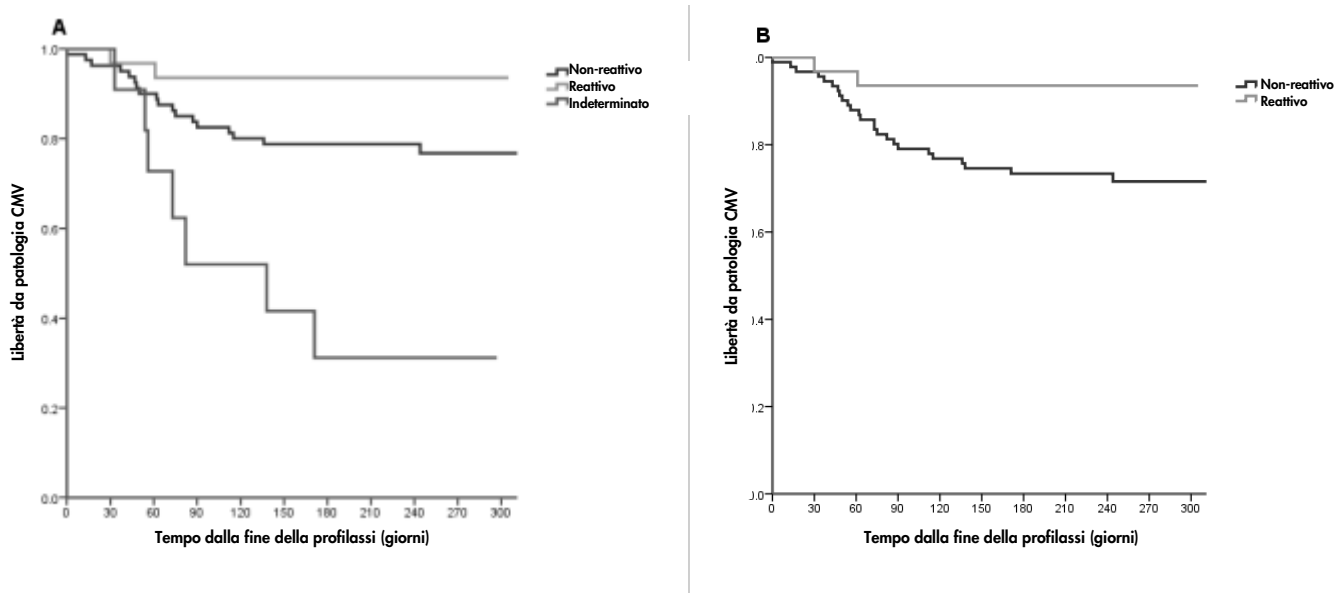
In uno studio di 37 pazienti sottoposti a trapianto di organi solidi (12), la valutazione delle risposte delle cellule T CD8<sup>+</sup> specifiche per il CMV mediante QF-CMV ha agevolato la predizione della guarigione spontanea del virus rispetto alla progressione della malattia da CMV, in seguito ad aumenti della viremia CMV. In questo studio, 24 pazienti su 26 (92,3%) con risultato reattivo del test QF-CMV 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 CMV che ha valutato episodi di viremia CMV post-trapianto (14) è emerso che 18 episodi di viremia CMV su 25 (72%) erano stati preceduti da un risultato non reattivo del test QF-CMV, contro 4 episodi su 16 (25%) preceduti da risposta reattiva al test QF-CMV (test esatto di Fisher,  $p = 0,0046$ , vedi Figura 7).



**Figura 7. Analisi statistica delle risposte delle cellule T CD8<sup>+</sup> specifiche per il CMV rilevate dal test QuantiFERON-CMV e sviluppo della viremia CMV (test esatto di Fisher,  $p = 0,0046$ ). Dati riprodotti da Weseslindtner et al (14).**

In un ampio studio prospettico multicentrico condotto su 127 soggetti sottoposti a trapianto di organi solidi (15) D+/R- e profilassi antivirale, i pazienti che hanno riportato un risultato reattivo al test QF-CMV (utilizzando una soglia del test di 0,1 IU/ml) in un momento qualsiasi successivo al termine della profilassi anti-CMV hanno mostrato un livello notevolmente più basso di insorgenza tardiva della malattia nei 12 mesi successivi al trapianto, rispetto ai pazienti che hanno riportato un risultato non reattivo al test QF-CMV e un risultato indeterminato (il 6,4% contro il 22,2% contro il 58,3% rispettivamente,  $p < 0,001$ ). 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%,  $p = 0,024$  (vedi Figura 8). I valori predittivi positivi e negativi del test QF-CMV relativi alla protezione dalla malattia da CMV erano rispettivamente pari a 0,90 (95% CI 0,74-0,98) e 0,27 (95% CI 0,18-0,37), indicando che un risultato reattivo al test QuantiFERON-CMV in qualsiasi momento successivo alla profilassi era associato a una probabilità del 90% di restare immune alla malattia da CMV. Da questo studio è emerso che il test QF-CMV può rivelarsi utile nel determinare se i pazienti sono a alto, medio o basso rischio di sviluppare la malattia da CMV in seguito alla profilassi.



**Figura 8. Curve di Kaplan-Meier relative all'insorgenza della malattia da CMV in base al risultato del test QF-CMV.**

**A** Confronto dei risultati del test QF-CMV reattivo, non reattivo e indeterminato (test dei ranghi logaritmici,  $p < 0,001$ ).

**B** Confronto risultato reattivo e non reattivo; i risultati indeterminati vengono considerati "non reattivi" (test dei ranghi logaritmici,  $p = 0,024$ ).

In uno studio prospettico condotto su 55 pazienti sottoposti a trapianto di organi solidi (16) in cui è stata analizzata la relazione tra i risultati del test QF-CMV prima del trapianto e gli episodi di replicazione del CMV dopo il trapianto, l'insorgenza più elevata di replicazione del CMV dopo il trapianto è stata osservata nei soggetti R(+) che avevano riportato un risultato non reattivo al test QF-CMV prima del trapianto (7 su 14 o il 50%), rispetto ai pazienti R(+) con risultato reattivo al test QF-CMV (4 su 30 o il 13,3%).

Da questo studio è emerso che i pazienti che hanno ricevuto un organo da un donatore sieropositivo per CMV e che risultano non reattivi al test QF-CMV prima del trapianto corrono un rischio dieci volte superiore di replicare il CMV rispetto ai soggetti reattivi al test QF-CMV prima del trapianto (OR regolato 10,49, 95% CI 1,88-58,46). Inoltre, lo studio dimostra che il test QF-CMV condotto prima del trapianto può rivelarsi utile nel prevedere il rischio di replicazione del CMV dopo il trapianto e, di conseguenza, nel personalizzare la gestione dell'infezione da CMV in seguito al trapianto di organi solidi.

Sono stati condotti (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) o sono attualmente in corso in tutto il mondo numerosi altri studi per analizzare le risposte delle cellule T CD8<sup>+</sup> specifiche per il CMV mediante il test QF-CMV in una coorte di pazienti sottoposti a trapianto.

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

L'importanza del monitoraggio immunitario specifico per CMV è stata riconosciuta e pubblicata in "International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation" (6). Queste linee guida internazionali, sviluppate da un gruppo di esperti in CMV e trapianto di organi solidi convenuti alla The Infectious Diseases Section of The 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 nel condurre la profilassi e le terapie preventive (6).

Inoltre, le linee guida forniscono anche consigli sulle caratteristiche del test ideale per il monitoraggio immunitario che deve:

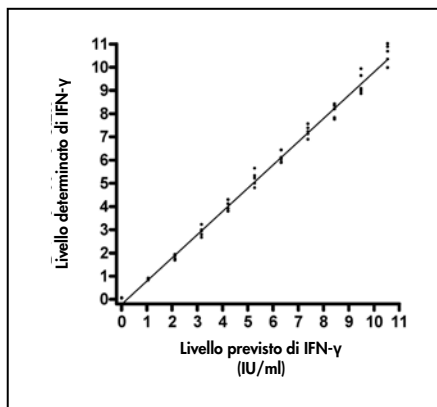
- Valutare la quantità e la funzione delle cellule T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> del paziente sottoposto a trapianto
- Misurare l'IFN- $\gamma$
- Essere semplice da eseguire, efficace dal punto di vista dei costi e riproducibile
- Essere rapido nell'esecuzione
- Facilitare la spedizione dei campioni a laboratori di riferimento specializzati

QF-CMV soddisfa virtualmente tutti i criteri specificati dalle linee guida ed è l'unico test di monitoraggio immunitario standardizzato in grado di rilevare l'IFN- $\gamma$  specifico per CMV.

## Caratteristiche prestazionali del test

Il metodo di misurare la concentrazione di IFN- $\gamma$  con il test QF-CMV ELISA si è rivelato lineare da 0 a 10 IU/ml (Figura 9). Lo studio sulla linearità è stato condotto posizionando in modo casuale 5 repliche di 11 pool di plasma di concentrazioni di IFN- $\gamma$  note sulla piastra ELISA.

Il test QF-CMV ELISA non indica nessuna evidenza di effetto gancio (prozone) a dosi elevate con concentrazioni di IFN- $\gamma$  fino a 100.000 IU/ml.



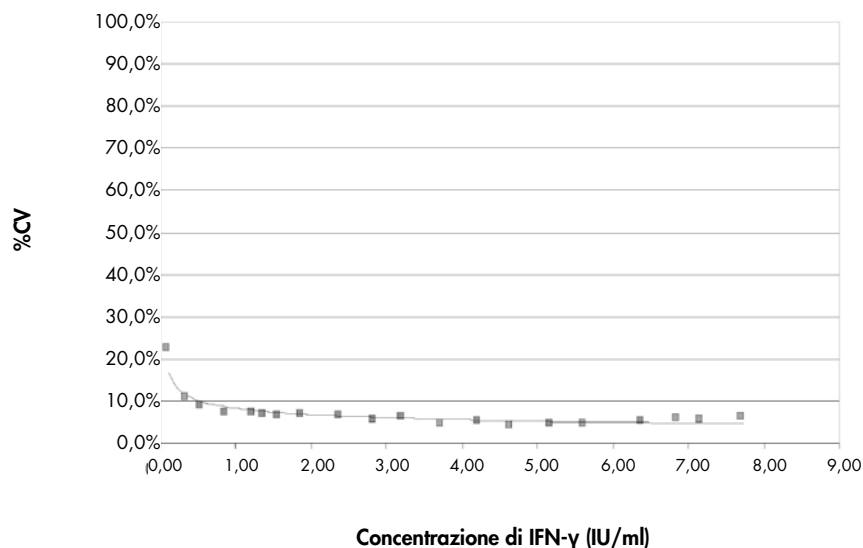
**Figura 9. Profilo di linearità del test QF-CMV ELISA determinato analizzando 5 repliche di 11 campioni di plasma di concentrazioni di IFN- $\gamma$  note.** La retta di regressione lineare ha una pendenza di  $1,002 \pm 0,011$  e un coefficiente di correlazione di 0,99.

L'imprecisione intra e inter-test (%CV) del test QF-CMV ELISA è stata misurata analizzando 20 campioni di plasma con diverse concentrazioni di IFN- $\gamma$  in repliche di 3, in 3 laboratori, per 3 giorni non consecutivi e da parte di 3 operatori. Pertanto, ogni campione è stato analizzato 27 volte, in 9 sedute del test indipendenti. Un campione era un controllo nullo e aveva una concentrazione di IFN- $\gamma$  calcolata pari allo 0,08 (95% CI 0,07-0,09) IU/ml. Dei restanti 19 campioni di plasma, l'intervallo di concentrazioni era compreso tra 0,33 (0,31-0,34) e 7,7 IU/ml (7,48-7,92).

L'imprecisione intra-test o all'interno della seduta è stata calcolata facendo la media dei %CV per ciascun campione di plasma contenente l'IFN- $\gamma$  a partire da ciascuna seduta della piastra (n=9) ed è compresa tra 4,1 e 9,1%CV. La media interna alla seduta %CV ( $\pm$ 95% CI) è stata di 6,6%  $\pm$  0,6%. La media del plasma con IFN- $\gamma$  zero è pari a 14,1%CV.

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

Il profilo di precisione del test QF-CMV ELISA è riportato in Figura 10 e indica che l'imprecisione non aumenta con concentrazioni più elevate di IFN- $\gamma$ .



**Figura 10. Profilo di precisione del test QF-CMV ELISA determinato dall'analisi di 20 campioni di plasma per tre volte, per 3 giorni non consecutivi, in 3 laboratori e da parte di 3 operatori.** La trendline è un calcolo dei minimi quadrati.

È stato condotto uno studio per determinare la riproducibilità del test QF-CMV utilizzando campioni ematici di 8 soggetti con stato per CMV sconosciuto. Per ogni soggetto il sangue è stato prelevato in tre set di provette QF-CMV (3 x nullo, 3 x CMV e 3 x mitogeno). I tre set di provette sono stati incubati in tre siti diversi (un set di nullo, CMV e mitogeno per sito), come descritto nel Foglietto illustrativo. Trascorso 16-24 ore di incubazione, le provette sono state centrifugate ed è stato raccolto il plasma.

I test ELISA sono stati eseguiti per tre volte in ciascuno dei tre siti, generando tre risultati QF-CMV per ciascun soggetto per sito (in totale 9 risultati per tutti i siti). In ciascun sito è stato utilizzato un operatore diverso. Le piastre utilizzate per lo studio non facevano necessariamente parte dello stesso numero di lotto, ma erano tutte ancora valide.

La riproducibilità, in termini di stato diagnostico (reattivo, non reattivo o indeterminato) e di valore numerico, è stata determinata per ciascun campione. La riproducibilità del valore numerico è stata valutata soltanto nei campioni reattivi (espressa come %CV), in quanto i livelli di IFN- $\gamma$  nei campioni "non reattivi" erano troppo esigui per fornire una stima significativa della precisione.

La riproducibilità diagnostica complessiva era del 100% laddove è stato riprodotto lo stato diagnostico di QF-CMV degli 8 volontari in tutti i siti e le circostanze, senza riportare campioni indeterminati. La riproducibilità dei campioni reattivi era accettabile sia all'interno del sito sia tra siti. La media dei %CV per ciascuno dei siti del test era del 4,5% (sito 1), 5,9% (sito 2) e 7,3% (sito 3). In generale, il %CV tra siti era pari al 5,9% per tutti e 5 i campioni reattivi. I valori percentuali dei coefficienti di variazioni inferiori al 10% vengono considerati eccellenti.

## 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 (17-27 °C).
- Provette per il prelievo ematico non miscelate a sufficienza.

Si 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 del plasma 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.



# Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per ulteriori informazioni, consultare anche le informazioni tecniche disponibili su: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Per informazioni sui contatti, consultare pagina 27 e il retro di copertina.

## Risoluzione dei problemi ELISA

---

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

<b>Causa possibile</b>	<b>Soluzione</b>
a) Errore di diluizione dello standard	Verificare che le diluizioni dello standard del kit siano preparate correttamente secondo le istruzioni presenti nel foglietto informativo.
b) Errore di pipettamento	Verificare che le pipette siano calibrate e utilizzate in conformità alle istruzioni del produttore.
c) Temperatura di incubazione troppo bassa	L'incubazione del test ELISA dovrebbe avvenire a temperatura ambiente (tra i 17 °C e i 27 °C).
d) Periodo di incubazione troppo corto	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 piastra va letta a 450 nm con un filtro di riferimento da 620-650 nm.
f) Reagenti troppo freddi	Tutti i reagenti, tranne il coniugato concentrato 100X, devono essere portati a temperatura ambiente prima di avviare il test. È necessaria circa 1 ora.
g) Kit/componenti scaduti	Verificare di utilizzare il kit prima della data di scadenza. Verificare di utilizzare lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100X entro 3 mesi dalla data di ricostituzione.

### *Sviluppo del colore non specifico/fondo elevato*

<b>Causa possibile</b>	<b>Soluzione</b>
a) Lavaggio incompleto della piastra	Lavare la piastra almeno 6 volte con 400µl di tampone di lavaggio per pozzetto. È possibile che siano necessari più di 6 cicli di lavaggio a seconda del sistema di lavaggio utilizzato. È opportuno effettuare un ciclo ammollo di almeno 5 secondi tra un ciclo e l'altro.
b) Temperatura di incubazione troppo elevata	L'incubazione del test ELISA dovrebbe avvenire a temperatura ambiente (tra i 17 °C e i 27 °C).
c) Kit/componenti scaduti	Verificare di utilizzare il kit prima della data di scadenza. Verificare di utilizzare lo standard ricostituito e il coniugato concentrato 100X entro tre mesi dalla data di ricostituzione.
d) Soluzione di substrato enzimatico contaminato	Se si presenta una colorazione blu, smaltire il substrato. Verificare 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.

# Bibliografia

1. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* **9**, 165.
2. Singh, K.P., Howard, J.L., Wild, S.P., Jones, S.L., Hoy, J., Lewin, S.R. (2007) Human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of HCMV disease despite CD4+ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* **124**, 200.
3. Westall, G.P., Mifsud, N., Kotsimbos, T. (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. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22(1)**, 76.
6. Kotton, C.N., et al. (2010) International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* **89**, 779.
7. 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.
8. Lachmanova, A.I., et al. (2010) Quantiferon-CMV Test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* **42(9)**, 3574.
9. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* advance online publication 26 October 2010; doi:10.1038/nrneph.2010.
10. 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(10)**, 735.11.
11. Giulieri, S, Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **11(1)**, 17.
12. Lisboa, L.F., Kumar, D., Wilson, L.E., Humar, A. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* **93(2)**, 195.
13. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detecting and estimating the magnitude and functionality of the CMV-specific IFN- $\gamma$  CD8+ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* Online ahead of print 29 February 2012; doi: 10.1128/CVI.05633-111.
14. 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(8)**, 2172.
15. Manuel, O., et al. (2012) 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.* (Manoscritto approvato a novembre 2012).
16. Cantisán, S., et al. (2012) Pre-transplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8+ T-cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* (Manoscritto approvato a novembre 2012).

# Assistenza tecnica

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

**Asia-Pacific** ■ techservice-ap@qiagen.com

**Europe** ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

**Middle East/Africa** ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

**USA/Canada** ■ techservice-na@qiagen.com

**Latin America (not including Brazil or Mexico)** ■ techservice-latam@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-MX@qiagen.com

**Brazil** ■ techsebr@qiagen.com

Pagina lasciata vuota intenzionalmente.

Pagina lasciata vuota intenzionalmente.

# Procedura abbreviata del test

## Fase 1 - Incubazione del sangue

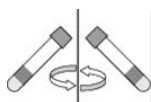
1. Raccogliere il sangue dei pazienti nelle provette per il prelievo ematico e miscelare scuotendole energicamente per dieci (10) volte in modo da assicurare che l'intera superficie interna della provetta sia ricoperta di sangue e che gli antigeni si dissolvano sulle pareti.



2. Incubare le provette in posizione verticale a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  per 16-24 ore.



3. Dopo l'incubazione, per separare il plasma dai globuli rossi, centrifugare le provette per 15 minuti a 2000-3000 RCF (g).



4. In seguito alla centrifugazione, evitare di pipettare in alto o in basso 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 - ELISA per IFN- $\gamma$

1. Tenere i componenti ELISA, tranne il coniugato concentrato 100X, a temperatura ambiente per almeno 60 minuti.



2. Ricostituire lo standard del kit a 8,0 IU/ml con acqua distillata o deionizzata. Preparare quattro (4) diluizioni dello standard.

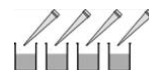


3. Ricostituire il coniugato concentrato 100X liofilizzato con acqua distillata o deionizzata.

4. Preparare il coniugato pronto per l'uso con il diluente verde e aggiungere 50  $\mu$ l a tutti i pozzetti.



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



6. Incubare per 120 minuti a temperatura ambiente.



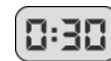
7. Lavare i pozzetti almeno 6 volte con 400  $\mu$ l di tampone di lavaggio per pozzetto.



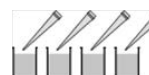
8. Aggiungere 100  $\mu$ l di soluzione di substrato enzimatico nei pozzetti. Miscelare con l'agitatore.



9. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.



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



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



12. Analizzare i risultati.



Marchi commerciali: QIAGEN®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); Microsoft®, Excel® (Microsoft).

#### **Contratto di licenza limitata per il kit QuantiFERON-CMV ELISA**

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

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo kit. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alcuni protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre nessuna garanzia in merito alla violazione di eventuali diritti di terzi.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN nega espressamente qualsiasi altra licenza, esplicita o implicita, ad eccezione delle licenze espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

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

© 2012 Cellestis, società del gruppo QIAGEN. Tutti i diritti riservati.

Phone: (Australia) +613- 9840-9800, (Europe) +49-2103-29-12000, (USA) 1-800-362-7737

E-mail: [quantiferon@cellestis.com](mailto:quantiferon@cellestis.com)

