

CMV ViraChip® IgG Test Kit

Destinazione d'uso:

Il Viramed® **CMV ViraChip® IgG** è un test immunologico qualitativo, non automatico, in vitro per la rilevazione di anticorpi IgG contro il CMV (citomegalovirus, betaherpesvirus umano 5, HHV-5) in campioni di siero e plasma umani (anticoagulanti citrato di sodio, eparina di litio, K2 EDTA). Il kit di analisi CMV ViraChip® IgG è prodotto da Viramed® Biotech AG, Behringstr.11, 82152 Planegg. Il test deve essere eseguito solo da personale specializzato che abbia ricevuto una formazione specifica sulla procedura di analisi. Non adatto a utenti non professionisti.

Il test Viramed® **CMV ViraChip® IgG** consente di confermare i campioni che risultano positivi o borderline in uno screening/test di ricerca degli anticorpi anti-CMV, ma può essere utilizzato anche in qualsiasi momento dopo la comparsa dei sintomi o nel corso della malattia o della terapia. Il test serve come ausilio per determinare lo stato di infezione in generale e nella diagnosi nello screening prenatale delle donne in gravidanza per rilevare il loro stato immunitario/anticorpale.

Questo test serve solo come ausilio alla diagnosi. Il test non sostituisce valutazioni complete e strategie terapeutiche. Il test non è adatto come metodo di screening nel campo delle trasfusioni, dei trapianti o dei trasferimenti cellulari. Il risultato del test deve essere considerato in combinazione con i sintomi, l'anamnesi del paziente, altri risultati clinici e risultati di test, ad esempio isolamento del virus/cultura cellulare, rilevamento dell'antigene, NAT/PCR, anticorpi IgM anti-CMV, anticorpi neutralizzanti e altri risultati di test sierologici e non sierologici in base alle linee guida e alle raccomandazioni diagnostiche attuali.

I risultati positivi o borderline indicano titoli anticorpali misurabili; essi forniscono un'indicazione dell'esposizione al CMV e devono essere considerati come un sintomo. È possibile trarre conclusioni sull'infezione, sullo stato infettivo o immunitario solo in misura limitata. Un risultato negativo non esclude il contatto con l'agente patogeno o l'infezione.

Principio del test

Sul fondo di ciascuna cavità della piastra da microtitolazione standard a 96 pozzetti (MTP) del kit di test ViraChip® si trova una membrana di nitrocellulosa su cui sono fissati gli antigeni come spot analitici (microarray).

Per rilevare gli anticorpi, si introduce innanzitutto un campione diluito in ciascuna cavità del ViraChip® e lo si incuba. Se nel campione sono presenti anticorpi corrispondenti, questi si legano ai punti di analisi fissati formando complessi antigene-anticorpo.

Dopo ripetuti lavaggi, si aggiunge il coniugato anti-IgG umano accoppiato con fosfatasi alcalina e si procede alla successiva incubazione. Durante questa incubazione, il coniugato si lega ai complessi antigene-anticorpo presenti.

Dopo un nuovo lavaggio e l'aggiunta della soluzione cromogena/substrato, la fosfatasi alcalina presente nei complessi antigene-anticorpo converte il cromogeno/substrato e colora i punti analitici sul microarray di colore dal viola al nero. Dopo ulteriori fasi di lavaggio e asciugatura, vengono misurate le intensità dei punti dell'analisi e valutate mediante il software ViraChip®.

Oltre ai punti analitici, ogni microarray contiene i seguenti punti di controllo: **controlli sierici, controlli dei coniugati, controlli dei calibratori e un controllo negativo**. I punti analitici servono a rilevare gli anticorpi contro gli antigeni specifici del CMV **IE1, p52, p150-1, p150-7, p150-XP1, p28, p65 e gB**.

Per facilitarne l'identificazione, le cavità della piastra da microtitolazione sono codificate con colori diversi:

a tal fine, il CMV ViraChip® IgG è contrassegnato da un **cerchio pieno di colore azzurro** sul bordo della cavità.

Codice articolo:	V-CMCGOK	Codice articolo:	V-CMCGDK (Deca Kit)
Confezione:	1 MTP da 96 cavità separabili singolarmente	Confezione:	10 MTP da 96 cavità separabili
Materiale campione:	10 µl di campione del paziente	Materiale campione:	10 µl di campione del paziente
Durata del test:	circa 130 minuti	Durata del test:	circa 130 minuti

Contenuto del kit

1 o 10 MTP da 96 cavità (CMCGAC)	CMV ViraChip® IgG Antigen Coated Wells	(Codice prodotto: V-
1x o 10x 12 ml (UVCCKI)	Cavità singole separabili con microarray ViraChip®, pronti all'uso ViraChip® AP-Anti-Human IgG Conjugate	(Codice articolo: V-
1x o 10x 100 ml (UVNUWP)	Soluzione coniugata anti-IgG umana per test ViraChip®, da capra, con fosfatasi alcalina bovina, pronta all'uso ViraChip® / ViraStripe® / ViraBlot® Diluente / Tampone di lavaggio	(Codice articolo: V-
1x o 10x 12 ml (UVCUCS)	Tampone di lavaggio concentrato per test ViraChip®, con detergenti e sali per impedire legami non specifici, 10 volte ViraChip® Soluzione cromogena / substrato	(Codice articolo: V-
1x o 10x 50 ml (UVCUPP)	Soluzione cromogena/substrato per test ViraChip®, con BCIP / NBT, pronta all'uso ViraChip® Sample Buffer	(Codice articolo: V-
	Tampone campione per test ViraChip®, pronto all'uso	

Disponibile come optional

1 barra MTP da 8 cavità (CMCGRT)	CMV ViraChip® Pozzetti rivestiti con antigene IgG (8)	(Codice articolo: V-
330 µl (CMCGPK)	Cavità singole separabili con ViraChip® Microarray, pronti all'uso CMV ViraChip® IgG Positive Control	(Codice articolo: V-
330 µl (CMCGWK)	Siero di controllo IgG positivo, umano, pronto all'uso CMV ViraChip® Controllo IgG debolmente positivo	(Codice articolo: V-
	Siero di controllo IgG debolmente positivo, umano, pronto all'uso	

CMV ViraChip® Kit per test IgG

-2 -

330 µl
CMCPNK)

CMV ViraChip® IgG,A,M Controllo negativo

(Codice articolo: V-

Siero di controllo IgG, IgA, IgM negativo, umano, pronto all'uso

Attrezzatura aggiuntiva richiesta e materiale necessario

1. **Software ViraChip®** per la preparazione, l'esecuzione e la valutazione del test, dalla versione (Codice articolo: V-
VCNUPR) v1.3.0-1960
2. **Scanner di codici a barre 2D** per la lettura dei codici DataMatrix
3. **Piastra da microtitolazione** per riempire le barre iniziate della piastra da microtitolazione nel telaio di supporto (codice articolo: V-
UVNMTP) con 96 cavità vuote
4. **Agitatore orbitale (750 giri/min)** per miscelare campioni
e reagenti durante la lavorazione
- o **agitatore lineare (20 Hz)**
5. **Scanner ViraChip®** per la digitalizzazione/misurazione dei test ViraChip® sviluppati, a partire da ViraChip® (codice articolo: V-
UVCSA) o **lettore ViraChip®** Scanner dalla versione v1.0 o ViraChip® Reader dalla versione Rev.03 (codice articolo: V-
UVCCAM)
6. Opzionale: **ventilatore/ventola** per un'asciugatura più rapida delle piastre da microtitolazione sviluppate

Preparazione dei reagenti e dei campioni dei pazienti
Portare tutti i reagenti e la piastra da microtitolazione confezionata a temperatura ambiente (TA: 20-23 °C) prima dell'uso. Mescolare bene tutti i reagenti prima dell'uso.
Tampone di lavaggio: **Diluire il concentrato di tampone di lavaggio 1:10 in acqua distillata o deionizzata (H2O):**

100 ml tampone di lavaggio concentrato + 900 ml H2O

Tampone campione: Pronto all'uso

Soluzione coniugata: Pronta all'uso

Soluzione cromogena / substrato: Pronta all'uso

Cavità MTP: Rimuovere con cautela la piastra da microtitolazione (MTP) dalla confezione e inserire il numero necessario di cavità in un telaio per piastre da microtitolazione vuoto (Preparazione ed esecuzione del test, punto 3). Utilizzare immediatamente le cavità dopo averle estratte dalla confezione. Riporre immediatamente le cavità non utilizzate nella confezione originale, chiuderla ermeticamente e conservarla a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.

Campioni dei pazienti: I campioni dei pazienti vengono utilizzati in una diluizione **1:76**, ad es. **10 µl di campione del paziente + 750 µl di tampone campione**. Per l'elaborazione sono necessari 100 µl per cavità del campione diluito.

Controlli: Se necessario, il siero di controllo positivo e negativo viene utilizzato in una diluizione **1:16**, ad es. **10 µl di siero di controllo + 150 µl di tampone campione**. Per l'elaborazione vengono utilizzati 100 µl per cavità del controllo diluito.

Struttura del CMV ViraChip® IgG Microarray
Antigeni:

Ogni antigene specifico del CMV, **IE1, p52, p150-1, p150-7, p150-XP1, p28, p65** e gB, è applicato tre volte in concentrazione identica come tripletta spot. Ogni tripletta spot corrisponde a una banda nell'immunoblot.

Controlli:

Ogni cavità ViraChip® contiene i seguenti controlli integrati:

due controlli sierici (sc), un controllo negativo (nc), due controlli coniugati IgG (ccG), due controlli coniugati IgM (ccM) e sei controlli calibratore (cal).

CMV ViraChip® Kit per test IgG

-3 -

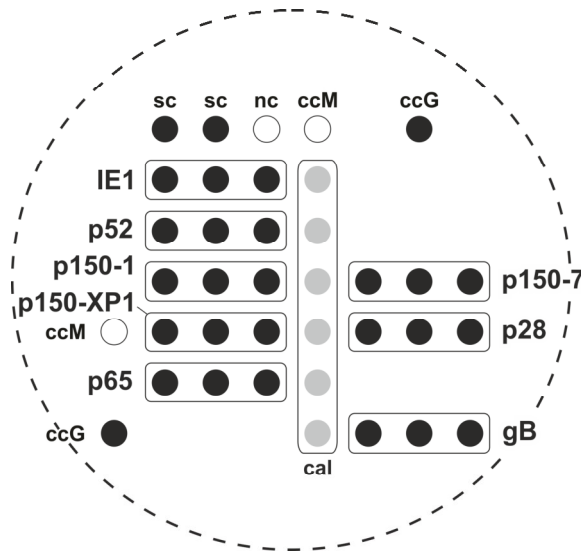


Figura 1: Immagine di una cavità della piastra da microtitolazione con il CMV ViraChip® IgG Microarray (ingrandita). Disposizione dei tripletti di spot per gli antigeni e degli spot per i controlli integrati.

Nomenclatura e descrizione degli antigeni CMV tratti dalla letteratura

Nomenclatura:	Antigene:	Osservazione:
IE1	Proteina immediata precoce 1, proteina non strutturale, pUL123	Le proteine immediate-early IE1 e IE2 sono i primi prodotti genici virali che si formano nelle cellule ospiti dopo l'infezione (7).
p52	Proteina non strutturale, pUL44, CM2	Fattore di processività della DNA polimerasi – una componente essenziale del complesso di replicazione (10)
p150-1	Proteina tegumentaria, pUL32, frammento 1	Grande proteina strutturale fosforilata (8,13), proteina strutturale specifica del CMV senza omologhi in altri herpesvirus (13)
p150-7	Proteina tegumentaria, pUL32, frammento 7	Grande proteina strutturale fosforilata (8,13)
p150-XP1	Proteina tegumentaria, pUL32, frammento XP1	Grande proteina strutturale fosforilata (8,13)
p28	Proteina tegumentaria, pUL99	Proteina strutturale fosforilata e miristoilata (14)
p65	Proteina tegumentaria, pUL83	Proteina strutturale fosforilata (10)
gB	Glicoproteina B, pUL55	Proteina transmembrana di tipo 1 (3), identità di sequenza con HSV-1: 24,2% e con EBV: 30,2% (1)

Preparazione ed esecuzione del test

Il trattamento dei campioni su ViraChip® Antigen Coated Wells può essere automatizzato con i seguenti robot di pipettatura / processori ELISA: GEMINI, BEP2000, ETI-MAX3000, SERION Immunomat, Euroanalyzer I, Euroanalyzer I-2P, EVOLIS, EVOLIS Twin-Plus, ThunderBolt ELISA, ThunderBolt ELISA + CLIA, DS2, DSX, Agility, Agility Integra. Durante la configurazione dei dispositivi e la formazione da parte di Viramed Biotech AG vengono fornite istruzioni dettagliate passo dopo passo per la soluzione di automazione utilizzata e istruzioni per l'uso del software ViraChip®. I dettagli sono descritti nella sezione "Note sui dispositivi e sul software".

Le istruzioni di lavoro riportate di seguito si applicano all'elaborazione manuale con dispositivi di laboratorio generici separati, quali pipette, agitatori e lavatori ELISA, e devono essere seguite alla lettera.

1. Documentazione

Selezione dei test e inserimento dei dati dei campioni nel piano di occupazione del software ViraChip®.

2. Caricamento

Scansione dei codici a barre 2D sulle etichette del kit di test e della piastra da microtitolazione per il trasferimento dei numeri di lotto e dei fattori specifici del lotto (lot specific factors).

3. Elaborazione

Eseguire tutte le fasi di elaborazione a temperatura ambiente.

3.1 Preparazione

- Inserire nel telaio di supporto il numero di cavità definito in base all'occupazione.
- Riempire le posizioni vuote di una barra della piastra da microtitolazione nel telaio di supporto con cavità vuote. Le barre sono contrassegnate sulla piastra da microtitolazione con i numeri da 1 a 12.

Assicurarsi che durante la rottura delle barre nessuna particella di plastica cada nelle cavità.

3.2 Preincubazione

- Aggiungere 300 µl di diluizione pronta all'uso del tampone di lavaggio per ogni cavità.
- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.3 Incubazione dei campioni

- In base al piano di occupazione, aggiungere 100 µl di campione diluito del paziente o 100 µl di siero di controllo diluito nella cavità corrispondente.
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.4 Lavare 3 volte

- Aggiungere 300 µl di tampone di lavaggio pronto all'uso per ogni cavità.
- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.5 Incubazione del coniugato

- Aggiungere 100 µl di soluzione di coniugato per ogni cavità.
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.6 Lavare 3 volte

- Aggiungere 300 µl di tampone di lavaggio diluito pronto all'uso in ciascuna cavità.
- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.7 Lavare 1 volta

- Aggiungere 300 µl di acqua distillata o deionizzata per ogni cavità.
- Incubare per 1 minuto a temperatura ambiente.
- Aspirare il liquido.

3.8 Incubazione del substrato

- Aggiungere 100 µl di soluzione cromogena/substrato per ogni cavità.
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Interrompere: aspirare il liquido.

3.9 Lavare 3 volte

- Aggiungere 300 µl di acqua distillata o deionizzata in

Regolare gli aghi di aspirazione o utilizzare le pipette in modo tale da non danneggiare il fondo delle cavità.

Durante le fasi di incubazione, i fondi delle cavità devono essere completamente coperti dal liquido.

Durante le fasi di incubazione e lavaggio, utilizzare un agitatore orbitale regolabile a una frequenza di circa 750 giri/min o un agitatore lineare regolabile a una frequenza di circa 20 Hz.

CMV ViraChip® Kit per test IgG

-5 -

- ciascuna cavità.
- Nessuna incubazione intermedia.
- Aspirare il liquido.

3.10 Asciugare le cavità

Lasciare asciugare per 20 minuti con umidità massima del 60% sotto flusso d'aria continuo.

In caso di umidità dell'aria più elevata, il tempo di asciugatura può prolungarsi. In alternativa, lasciare asciugare per 12 ore al riparo dalla luce a temperatura ambiente.

4. Scansione

Misurare i microarray ViraChip® con lo scanner ViraChip® o il lettore ViraChip®.

Le misurazioni dei microarray ViraChip® devono essere effettuate entro 24 ore dalla lavorazione (conservare la piastra da microtitolazione al riparo dalla luce). Per le istruzioni dettagliate, consultare il manuale dell'apparecchio.

5. Analisi

5.1 Verificare l'assegnazione dei triplette di antigeni e dei punti di controllo (convalidare tecnicamente)

Ogni spot viene automaticamente assegnato dal software ViraChip® al triplette di antigeni o allo spot di controllo corrispondente in base alla sua posizione. L'assegnazione automatica deve essere verificata visivamente con il modello riportato nella Fig. 1. Le assegnazioni che non corrispondono al modello riportato devono essere contrassegnate come "non valide" nel campo "QC". Il campione corrispondente deve essere ripetuto.

5.2 Controllo di validità

Il controllo di validità viene eseguito automaticamente dal software ViraChip®.

Un microarray ViraChip® è valido se i seguenti spot di controllo soddisfano i criteri memorizzati nel software ViraChip®:

- **Controlli sierici** (sc) superiori al valore limite
- **Controlli coniugati IgG** (ccG) oltre il valore limite
I controlli coniugati IgG devono reagire in modo più forte rispetto ai controlli delle altre classi di coniugati.
- **Controlli calibratore** (cal) al di sopra del valore limite
- **Controllo negativo** (nc) al di sotto del valore limite

Se uno dei criteri sopra indicati non è soddisfatto, il microarray ViraChip® viene classificato come "non valido".

I microarray ViraChip® non validi non devono essere valutati e devono essere ripetuti.

Controllo negativo: il risultato del controllo negativo deve essere negativo.

Controllo positivo: il risultato del controllo positivo deve essere positivo.

Controllo debole positivo: il risultato del controllo debole positivo deve essere positivo.

Il **CMV ViraChip® IgG,A,M Negative Control** può essere utilizzato nei test di validazione.

Il **CMV ViraChip® IgG Positive Control** può essere utilizzato nei test a scopo di validazione.

Il **CMV ViraChip® IgG Weak Positive** può essere utilizzato nei test a scopo di validazione.

5.3 Valutazione dei microarray ViraChip®

La valutazione dei campioni dei pazienti viene eseguita automaticamente dal software ViraChip® in base ai criteri di valutazione definiti di seguito:

Le unità ViraChip® di ogni tripletta di spot vengono calcolate dal software ViraChip® tenendo conto dei fattori specifici del lotto rispetto ai controlli del calibratore.

Criteri di valutazione

Unità ViraChip® dei triplette spot	Risultato	Valutazione
Almeno tre triplette di spot ≥ 100 unità ViraChip® da: IE1, p52, p150-1, p150-7, p150-XP1, p28, p65 o gB	Positivo	Anticorpi IgG specifici contro il CMV rilevabili. È probabile un'infezione da CMV. In caso di sospetta infezione recente, eseguire anche un test per gli anticorpi specifici IgM.
Massimo due triplette di macchie ≥ 100 unità ViraChip®	Negativo	Anticorpi IgG specifici contro il CMV non rilevabili o presenti in quantità minime. In caso di sospetta infezione recente, eseguire anche un test per gli anticorpi IgM specifici e, dopo 2-3 settimane, esaminare un secondo campione per gli anticorpi IgM e IgG specifici.

Significato diagnostico degli anticorpi CMV

CMV ViraChip® Kit per test IgG

- 6 -

1. Gli anticorpi IgG sono rilevabili dopo poche settimane dall'infezione primaria (9). La rilevazione di una sier conversione IgG è considerata prova di un'infezione primaria (12). Gli anticorpi anti-gB IgG sono rilevabili al più presto circa tre mesi dopo la sier conversione (12). In caso di infezione da CMV pregressa e ricorrente, gli anticorpi anti-CMV gB IgG sono solitamente rilevabili immediatamente, tuttavia circa il 18% dei soggetti CMV sieropositivi con infezione pregressa di lunga data non mostra reattività anti-gB IgG (12,2).

2. Gli anticorpi IgM compaiono per la prima volta circa 2-3 settimane dopo l'infezione primaria (9). I titoli diminuiscono di solito

alcune settimane o mesi dopo l'infezione, ma possono persistere fino a 12 mesi (10,9,12,2). Gli anticorpi IgM specifici per il CMV possono essere rilevati sia in caso di recidiva che in caso di coinfezione con il virus di Epstein-Barr o il parvovirus B19 e in caso di malattie autoimmuni (12, 5). La sola rilevazione di anticorpi IgM anti-CMV non è quindi sufficiente per confermare un'infezione primaria (12,2).

3. Reazioni crociate con antigeni CMV, in particolare nella determinazione degli anticorpi IgM, sono state descritte in caso di infezioni da virus di Epstein-Barr (12) o parvovirus B19, nonché in caso di malattie autoimmuni (12,5).

Dati prestazionali

Sensibilità

Per determinare la sensibilità diagnostica, sono stati esaminati sieri di pazienti con reattività positiva prevista con il CMV ViraChip® IgG. Tutti questi campioni erano positivi in almeno due test comparativi (CLIA, immunoblot).

Collettivo	CMV ViraChip® IgG positivo, % (n)
Positivo (n = 132)	>99% (132)

Per determinare la sensibilità analitica, i sieri con reattività positiva sono stati esaminati in un test di riferimento con CMV ViraChip® IgG.

Collettivo (CLIA IgG positivo)	CMV ViraChip® IgG positivo, % (n)
Positivo (n = 35)	>99% (35)

Collettivo (immunoblot IgG positivo)	CMV ViraChip® IgG positivo, % (n)
Positivo (n = 33)	97% (32)

Per determinare la sensibilità clinica, sono stati esaminati i sieri di pazienti con reattività positiva prevista con il CMV ViraChip® IgG.

Collettivo	CMV ViraChip® IgG positivo, % (n)
Positivo (n = 322)	96,3% (310)

Specificità

Per determinare la specificità diagnostica, sono stati esaminati sieri di pazienti con reattività negativa prevista con CMV ViraChip® IgG. Tutti questi campioni sono risultati negativi nei test comparativi (CLIA, ELISA).

Collettivo	CMV ViraChip® IgG negativo, % (n)
Negativo (n = 171)	>99 % (171)

Prevalenza

Per determinare la prevalenza sono stati esaminati sieri di donatori di sangue provenienti dalla Germania con il CMV ViraChip® IgG.

Collettivo	CMV ViraChip® IgG positivo, % (n)
Sieri di donatori di sangue tedeschi (n = 142)	23,9% (34) *

*) Per quanto riguarda la presenza di anticorpi anti-CMV IgG in Germania, uno studio di riferimento ha dimostrato che la sieroprevalenza nella popolazione totale è del 46%, ma dipende fortemente da fattori quali l'età e fattori socioeconomici (11, 6, 4).

Per determinare la prevalenza nelle donne in gravidanza, sono stati esaminati i sieri delle donne in gravidanza con il CMV ViraChip® IgG.

Collettivo	CMV ViraChip® IgG positivo, % (n)
Sieri di donne incinte tedesche (n = 29)	48,3% (14) *
Sieri di donne incinte americane (n = 128)	60,9% (78) **

CMV ViraChip® Kit per test IgG

-7 -

*) In riferimento alla presenza di anticorpi anti-CMV IgG in Germania, la sieroprevalenza nelle donne in gravidanza è pari a circa il 47% (11).

**) Negli Stati Uniti, uno studio di riferimento ha riportato una prevalenza del 58,9% (15).

CMV ViraChip® Kit per test IgG

- 8 -

Reattività crociata

La reattività crociata con gli antigeni CMV è stata descritta in campioni di infezioni da virus di Epstein Barr (EBV) o parvovirus B19 e anche per malattie autoimmuni attraverso l'attivazione policlonale delle cellule B e una risposta immunitaria aspecifica. Per questo motivo, i risultati delle IgG anti-CMV devono essere interpretati in combinazione con i sintomi, l'anamnesi del paziente, altri risultati clinici e risultati dei test, nonché con l'analisi di campioni successivi, al fine di evitare diagnosi errate. 80 campioni che presentano anticorpi contro altri parametri infettivi o anticorpi autoimmuni o che sono potenzialmente cross-reattivi contro il rispettivo agente patogeno o che sono rilevanti dal punto di vista della diagnosi differenziale a causa di omologie antigeniche o sintomi simili sono stati testati con il CMV ViraChip IgG.

CMV ViraChip IgG

Campioni	negativi	positivi	Numero totale	% di positività
Autoimmune	3	7	10	(7/10) 70%
Celiachia	7	3	10	(3/10) 30%
EBV	8	2	10	(2/10) 20%
HSV	2	8	10	(8/10) 80%
Influenza	3	7	10	(7/10) 70%
Parvovirus	5	5	10	(5/10) 50%
Rosolia	8	2	10	(2/10) 20%
VZV	6	4	10	(4/10) 40%
Totale	42	38	80	(38/80) 47,5%

Su un totale di 80 campioni potenzialmente cross-reattivi, il 47,5% (38/80) ha reagito positivamente al CMV ViraChip IgG. Data l'elevata sieroprevalenza, è prevedibile che una percentuale significativa di questi campioni cross-reattivi contenga effettivamente anticorpi anti-CMV e reagisca quindi correttamente in modo positivo al CMV ViraChip IgG. Il tasso di positività del 47,4% non può essere differenziato in modo significativo dall'intervallo di sieroprevalenza sopra indicato per i donatori di sangue (23,9%), le donne incinte tedesche (48,3%) e le donne incinte statunitensi (60,9%). Tuttavia, non è possibile escludere reazioni crociate con antigeni CMV.

Matrice del campione

Campioni provenienti da diverse matrici/anticoagulanti (siero, plasma citrato di sodio, plasma eparina di litio, plasma K2 EDTA) dello stesso paziente sono stati testati con il CMV ViraChip IgG. I campioni sono stati addizionati con un campione di riferimento CMV IgG positivo, in modo che la concentrazione finale della diluizione del campione fosse 1:76. Tutti i campioni testati delle diverse matrici/anticoagulanti (siero, plasma citrato di sodio, plasma eparina di litio, plasma K2 EDTA) hanno mostrato lo stesso risultato positivo del campione di riferimento CMV IgG positivo (corrispondenza del 100%).

Interferenza

13 campioni risultati positivi al fattore reumatoide (IgG/IgA o IgM) sono stati esaminati con il CMV ViraChip IgG.

CMV ViraChip IgG

Pannello	negativo	positivo	Numero totale	% di positività
Fattore reumatoide IgG/IgA o IgM positivi	3	10	13	(10/13) 76,9%

Nei campioni positivi al fattore reumatoide IgG/IgA o IgM, la positività nel CMV ViraChip IgG è pari al 79,9%. A causa dell'elevata sieroprevalenza, è prevedibile che una percentuale significativa di questi campioni positivi al fattore reumatoide contenga effettivamente anche anticorpi anti-CMV e reagisca quindi correttamente in modo positivo con il CMV ViraChip IgG.

Inoltre, sono stati testati campioni con diverse interferenze (fattore reumatoide (RF), emolitico, itterico, lipemico) sul CMV ViraChip IgG. I campioni sono stati addizionati con un campione di riferimento CMV IgG positivo, in modo che la concentrazione finale della diluizione del campione corrispondesse alla concentrazione standard 1:76. Tutti i campioni di interferenza testati hanno mostrato lo stesso risultato positivo del campione di riferimento CMV IgG positivo (corrispondenza del 100%). Vedere Limiti del metodo.

CMV ViraChip® Kit per test IgG

-9 -

Intervallo di misurazione

Lo standard PEI è stato testato in diversi livelli di diluizione sul CMV ViraChip IgG.

PEI Std. - Concentrazione	CMV ViraChip IgG								Risultato
	IE1	p52	p150-1	p150-XP1	p65	p150-7	p28	gB	
110 U/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	positivo
55 U/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	positivo
27,5 U/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	positivo
13,8 U/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	positivo
6,9 U/ml	1	1	1	1	1	1	1	1	positivo
3,4 U/ml	1	1	1	1	1	1	1	0	positivo
1,7 U/ml	1	0	1	1	0	1	1	0	positivo
0,9 U/ml	0	0	1	1	0	1	1	0	positivo
0,4 U/ml	0	0	1	1	0	1	1	0	positivo
0,2 U/ml	0	0	1	0	0	0	0	0	negativo
0,1 U/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo

Lo standard PEI è positivo nel CMV ViraChip IgG fino a una concentrazione di 0,4 U/ml.

CMV ViraChip® Kit per test IgG

-10 -

Riproducibilità

Utilizzando un lotto di produzione, il CMV ViraChip IgG è stato elaborato in cinque giorni diversi. Ogni campione è stato riprodotto tre volte in ogni ciclo da due persone/operatori. In totale, ogni campione è stato elaborato 30 volte. I campioni utilizzati sono stati caratterizzati come negativi, debolmente, mediamente o fortemente positivi sulla base di un test di riferimento, in modo da corrispondere all'intero spettro di titoli anticorpali / intervallo di misurazione di un test ELISA CMV. I risultati sono stati confrontati mediante classificazione e sono riportate le percentuali di riproducibilità.

CMV ViraChip IgG									
ID	IE1	p52	p150-1	p150-XP1	p65	p150-7	p28	gB	risultato
VM2820	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(26/30)* 86,7%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM2821	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM2833	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM2870	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM2874	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM2900	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM4685-05	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
tutti i campioni	(210/210) 100%	(210/210) 100%	(210/210) 100%	(210/210) 100%	(206/210) 98,1%	(210/210) 100%	(210/210) 100%	(210/210) 100%	(210/210) 100%
totale	(1676/1680) 99,8%								(210/210) 100%

Studio di riproducibilità. Viramed® Biotech AG CMV ViraChip® IgG Percentuale di riproducibilità nei risultati del test = 100%.

L'antigene p65 presenta una maggiore variabilità nel campione VM2820.

Precisione / Ripetibilità

Il CMV ViraChip IgG è stato elaborato con gli stessi campioni in triplicato per ogni ciclo in un giorno da un operatore. I campioni utilizzati sono stati caratterizzati come negativi, debolmente, mediamente o fortemente positivi sulla base di un test di riferimento, in modo da corrispondere all'intero spettro di titoli anticorpali / intervallo di misurazione di un test ELISA CMV. I risultati sono stati confrontati mediante classificazione e sono riportate le percentuali di ripetibilità.

CMV ViraChip IgG									
ID	IE1	p52	p150-1	p150-XP1	p65	p150-7	p28	gB	risultato
VM2820	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM2821	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM2833	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM2870	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM2874	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM2900	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM4685-05	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
tutti i campioni	(21/21) 100%	(21/21) 100%	(21/21) 100%	(21/21) 100%	(21/21) 100%	(21/21) 100%	(21/21) 100%	(21/21) 100%	(21/21) 100%
totale	(168/168) 99,8%								(21/21) 100%

Studio di precisione. Viramed® Biotech AG CMV ViraChip® IgG Percentuale di ripetibilità dei risultati del test = 100%

Per determinare i dati prestazionali sono stati utilizzati ¹software ViraChip® 1.3.0, ²scanner ViraChip® v1.0 e il lettore ViraChip® Rev.03 o versioni successive.

Requisiti per l'utente

1. Questo test deve essere eseguito solo in un laboratorio specializzato che disponga delle attrezzature di laboratorio adeguate (ad es. secondo GLP) e delle autorizzazioni ufficiali eventualmente necessarie per la manipolazione dei campioni da testare.

2. Questo test deve essere eseguito solo da personale specializzato che abbia ricevuto una formazione specifica sulla procedura di test.
3. Per ottenere un risultato accurato, è necessario attenersi alle istruzioni per l'uso e alle "Buone Pratiche di Laboratorio (GLP)".

Conservazione e durata dei reagenti

1. **Microarray ViraChip®**: conservabili nella confezione originale sigillata a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C fino alla data di scadenza.
2. **Tampone di lavaggio concentrato, 10 volte**: conservare a 2-8 °C fino alla data di scadenza.
3. **Diluito pronto all'uso del tampone di lavaggio**: conservabile a 2-8 °C per circa 2 settimane.

4. **Tampone campione**: conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza, una volta aperto 10T.
5. **Soluzione coniugata**: conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza, una volta aperto 10T.
6. **Soluzione cromogena/substrato**: conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza, una volta aperto 24 mesi. Proteggere dalla luce!

Precauzioni/Misure di sicurezza

1. Tutti i componenti del siero umano sono stati testati per gli anticorpi HCV, HIV1,2 e l'antigene HBs e sono risultati negativi. Tuttavia, tutti i componenti del kit umano, così come i campioni dei pazienti, devono essere considerati potenzialmente infettivi e utilizzati con le dovute precauzioni. Quando si lavora con materiali potenzialmente pericolosi o infettivi, è necessario rispettare le leggi, i regolamenti e le norme nazionali/internazionali applicabili. Ciò vale anche per lo stoccaggio e lo smaltimento dei prodotti chimici e dei reagenti utilizzati.
2. Le misure di protezione per lavorare con sostanze pericolose e biologiche devono essere rispettate in conformità con le direttive nazionali attualmente in vigore per i laboratori. Le misure includono:
– Non pipettare con la bocca.
– Indossare guanti monouso e occhiali protettivi/protezione per il viso.
– Non mangiare, bere o fumare sul posto di lavoro.

3. I campioni e tutti i materiali potenzialmente contaminati, nonché i rifiuti liquidi infettivi, devono essere decontaminati in conformità con le linee guida di laboratorio generalmente riconosciute, ad esempio mediante sterilizzazione in autoclave per almeno 20 minuti a 121 °C. Per lo smaltimento dei rifiuti liquidi, questi possono essere miscelati, ad esempio, con ipoclorito di sodio in un rapporto volumetrico tale che la miscela finale contenga l'1% di ipoclorito di sodio. Lasciare agire per 30 minuti per una disinfezione completa.
4. Le informazioni sui possibili pericoli, le misure di primo soccorso, le misure da adottare in caso di rilascio accidentale di grandi quantità, la manipolazione e lo stoccaggio, i dispositivi di protezione individuale, le istruzioni per lo smaltimento e le informazioni tossicologiche sono documentate nelle schede di sicurezza.
5. Evitare che polvere e altri contaminanti entrino nelle cavità dell'MTP, poiché ciò potrebbe compromettere la validità dei risultati.
6. Tutti gli incidenti gravi relativi al prodotto devono essere segnalati al fabbricante e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiede l'utilizzatore e/o il paziente.

Prelievo, manipolazione e conservazione del campione del paziente

CMV ViraChip® Kit per test IgG

-12 -

1. Il kit **CMV ViraChip® IgG Test Kit** deve essere utilizzato con campioni di siero umano e plasma (anticoagulanti citrato di sodio, eparina di litio, K2 EDTA) come materiale campione.

2. Il prelievo e la conservazione dei campioni devono essere effettuati da personale medico specializzato secondo gli standard, i metodi e le condizioni vigenti dal sangue intero. Il trasporto dei campioni è possibile a temperatura ambiente (17; 18; 19; 20).

3. Di norma, i campioni non diluiti possono essere conservati fino a 5 giorni a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.

4. Prima di iniziare il test, i campioni devono essere portati a temperatura ambiente. Dopo lo scongelamento, mescolare delicatamente i campioni e, se necessario, rimuovere le particelle visibili mediante centrifugazione.

5. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti dei campioni.

Limiti della procedura di analisi

1. Un risultato positivo del test sul campione del paziente deve essere considerato un sintomo. L'interpretazione e la valutazione dei risultati del test devono essere effettuate solo da personale medico specializzato, tenendo conto di tutti i dati rilevanti (16).

2. Un risultato negativo del test non esclude il contatto con l'agente patogeno o un'infezione.

3. La rilevazione di anticorpi specifici può portare a risultati diversi se effettuata con test diversi o di produttori diversi a causa delle diverse sensibilità, specificità e metodologie di test.

4. In caso di immunosoppressione, causata ad esempio da HIV/AIDS o chemioterapia, la valutazione è limitata. Il test degli anticorpi CMV potrebbe non corrispondere allo stato infettivo attuale completo (16).

5. I farmaci e le somministrazioni di immunoglobuline possono provocare reazioni anticorpali aspecifiche (16).

6. I dispositivi diagnostici *in vitro* non devono essere utilizzati oltre la data di scadenza indicata, poiché in tal caso non è più possibile garantire risultati affidabili.

7. Il rispetto rigoroso delle istruzioni operative è essenziale per ottenere risultati accurati. Una lavorazione non conforme, ad esempio un'esecuzione insufficiente delle fasi di lavaggio, può causare risultati errati.

8. L'approccio dei «campioni collettivi», in cui vengono esaminati contemporaneamente più sieri, non è ammesso, poiché in tali approcci non è possibile garantire la sensibilità e la specificità del test.

9. I campioni pretrattati con il calore, emolitici, itterici, lipemici o positivi al fattore reumatoide possono portare a risultati non validi.

10. I campioni non devono essere contaminati da microrganismi.

11. Non è possibile escludere reazioni crociate con antigeni CMV, descritte in caso di infezioni da virus di Epstein-Barr, parvovirus B19 o anche in caso di malattie autoimmuni. Poiché la sieroprevalenza del CMV è elevata, i campioni di pazienti affetti da altri parametri possono contenere anche anticorpi IgG CMV.

Note relative alle apparecchiature e al software

1. In caso di esecuzione automatizzata, è necessario programmare e utilizzare fasi di lavoro validate da Viramed Biotech AG per il rispettivo tipo di processore.

2. Se si utilizzano materiali di consumo specifici per il processore, le configurazioni corrispondenti devono essere approvate da Viramed Biotech AG secondo le indicazioni del produttore.

3. La configurazione dell'apparecchiatura e del software fornita da Viramed Biotech AG non deve essere modificata. Qualsiasi modifica può causare risultati errati.

4. È consentito utilizzare esclusivamente software specifico per l'apparecchio. Le modifiche ai file di configurazione possono essere effettuate solo da Viramed Biotech AG.

5. Come strumenti di misura devono essere utilizzati esclusivamente sistemi approvati da Viramed Biotech AG.

6. La valutazione dei microarray ViraChip® avviene esclusivamente tramite il software ViraChip®. Non è possibile effettuare una valutazione manuale/visiva.

Bibliografia

- BURKE, HG & HELDWEIN, EE: Crystal Structure of the Human Cytomegalovirus Glycoprotein B, PLoS Path, 2015
- HAMPRECHT, K: Ostacoli nella diagnostica prenatale dell'HCMV - Importanza dell'avidità delle IgM e delle IgG, Diagnostik im Dialog, 2017
- KINZLER, ER & COMPTON, T: Caratterizzazione della fusione cellula-cellula indotta dalla glicoproteina del citomegalovirus umano, J Virol, 2005
- LACHMANN, R et al.: Sieroprevalenza del citomegalovirus (CMV) nella popolazione adulta tedesca, PLoS One, 2018
- LAZZAROTTO, T et al.: Aggiornamento sulla prevenzione, diagnosi e gestione dell'infezione da citomegalovirus durante la gravidanza, Clin Microbiol Infect, 2011
- ABELE-HORN, M et al.: MiQ 11b: Infezioni genitali Parte II, Elsevier Urban & Fischer, 2011
- PAULUS, C & NEVELS, M: Le principali proteine immediate-precoci del citomegalovirus umano come antagonisti delle risposte antivirali intrinseche e innate dell'ospite, Viruses, 2009
- PLACHTER, B et al.: Espressione procariotica della proteina tegumentale fosforilata pp65 del citomegalovirus umano e applicazione di peptidi ricombinanti per analisi immunoblot, J Clin Microbiol, 1990
- PRINCE, HE & LAPE-NIXON, M: Ruolo del test di avidità delle IgG del citomegalovirus (CMV) nella diagnosi dell'infezione primaria da CMV durante la gravidanza, Clinical and Vaccine Immunology, 2014
- REVELLO, MG & GERNA, G: Diagnosi e gestione dell'infezione da citomegalovirus umano nella madre, nel feto e nel neonato, Clin Microbiol Rev, 2002
- RKI Robert Koch Institut: Guida RKI per medici: Infezione da citomegalovirus, Bollettino epidemiologico n. 3, 2014
- HAMPRECHT, K: Diagnostica di laboratorio delle infezioni virali rilevanti in gravidanza, linea guida S2K, numero di registrazione AWMF 0093/001, AWMF, 2014
- SCHOLL, BC et al.: Espressione procariotica dei polipeptidi immunogenici della grande fosfoproteina (pp150) del citomegalovirus umano, J Gen Virol, 1988
- SILVA, MC et al.: La pp28 codificata dal citomegalovirus umano UL99 è necessaria per l'involucro citoplasmatico dei capisidi associati al tegumento, J Virol, 2003
- STARAS, SAS et al.: Sieroprevalenza dell'infezione da citomegalovirus negli Stati Uniti, 1988-1994, Clin Infect Dis, 2006
- THOMAS, L: Labor und Diagnose, Med Verlagsgesellschaft Marburg, 2012
- TUCK, MK et al.: Procedure operative standard per la raccolta di siero e plasma, J Proteome Res, 2009
- Direttiva 2008/68/CE: relativa al trasporto interno di merci pericolose, versione aggiornata.
- RKI: Manuali di preanalisi, versione aggiornata.
- Linee guida AWMF S2k 093/001: Diagnostica di laboratorio delle infezioni virali rilevanti in gravidanza, 2021

CMV ViraChip® Kit per test IgG

-13 -

Produttore

Viramed® Biotech AG
Behringstr.11
82152 Planegg
Germania

Altre informazioni

Motivo della revisione Revisione per IVDR

IVDR (articolo 29) Una breve relazione sulla sicurezza e le prestazioni è disponibile qui: EUDAMED - banca dati pubblica - Ricerca di UDI-DI e dati relativi ai dispositivi, compresi SS(C)P.

Spiegazione simboli

dei

	Hersteller		Bestell-Nummer
	Gebrauchsanweisung beachten		Verwendbar bis / Mindesthaltbarkeitsdatum
	In-Vitro Diagnostikum		Temperaturbegrenzung (Lagerung)
	Chargen-Nummer		Positives Kontrollserum
	Ausreichend für 96 Ansätze		Negatives Kontrollserum