

Test Kit per il test IgM CMV ViraChip®

Istruzioni per l'uso



Destinazione d'uso:

Il Viramed®CMV ViraChip® IgM è un test immunologico in vitro qualitativo e non automatizzato per la rilevazione di anticorpi IgM contro il CMV (citomegalovirus, betaherpesvirus umano 5, HHV-5) in matrici di campione quali siero e plasma umani (anticoagulanti: citrato di sodio, eparina di litio, K2 EDTA). Il Test Kit di analisi CMV ViraChip® IgM è prodotto da ViramedBiotech AG, Behringstr. 11, 82152 Planegg. Test altamente complesso. Il test deve essere eseguito esclusivamente da personale specializzato che abbia ricevuto una formazione specifica sulla procedura di analisi. Non destinato a utenti non esperti.

Il test Viramed®CMV ViraChip®IgM consente di confermare i campioni che risultano positivi o borderline in uno screening o in un test di ricerca degli anticorpi anti-CMV; il test può tuttavia essere utilizzato anche in qualsiasi momento dopo la comparsa dei sintomi o nel corso della malattia o della terapia. Il test funge da strumento ausiliario per determinare lo stato infettivo in generale e nella diagnosi nell'ambito dello screening prenatale delle donne in gravidanza, al fine di rilevare il loro stato immunitario e la presenza di anticorpi contro il CMV.

Questo test serve solo come ausilio diagnostico. Il test non intende sostituire valutazioni complete e strategie terapeutiche. Non è indicato per trapianti e trasfusioni. Il risultato del test va considerato nel contesto dei sintomi, dell'anamnesi del paziente, di altri reperti clinici e dei risultati di altri test, ad esempio isolamento del virus / coltura cellulare, rilevamento dell'antigene (CMV-pp65), NAT/PCR, anticorpi IgG anti-CMV, avidità degli anticorpi IgG anti-CMV, anticorpi neutralizzanti e altri risultati di test sierologici e non sierologici, in conformità con le attuali linee guida e raccomandazioni diagnostiche.

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

Principio del test

Sul fondo di ciascuna cavità della piastra da microtitolazione standard a 96 pozzetti (MTP) del Test Kit di analisi ViraChip® è presente una membrana di nitrocellulosa sulla quale sono fissati gli antigeni sotto forma di spot analitici (microarray).

Per la rilevazione degli anticorpi, si versa innanzitutto un campione diluito in ciascuna cavità del ViraChip® e si procede all'incubazione. Se nel campione sono presenti gli anticorpi corrispondenti, questi si legano agli spot di analita fissati, formando complessi antigene-anticorpo.

Dopo ripetuti lavaggi, viene aggiunto un coniugato anti-IgM umana accoppiato con fosfatasi alcalina, seguito da un'ulteriore incubazione. Durante questa incubazione, il coniugato si lega ai complessi antigene-anticorpo presenti.

Dopo un ulteriore lavaggio e l'aggiunta della soluzione di Chromogen/Substrate, la fosfatasi alcalina presente nei complessi anticorpo-anticorpo-coniugato converte il Chromogen/Substrate, colorando così le macchie dell'analita sul microarray di un colore che va dal viola al nero. Dopo ulteriori fasi di lavaggio e asciugatura, vengono misurate le intensità delle macchie dell'analita e valutate tramite il software ViraChip®Software.

Ogni microarray contiene, oltre agli spot degli analiti, i seguenti spot di controllo: **controlli sierici, controlli del coniugato, controlli di calibrazione e un controllo negativo**. Gli spot degli analiti servono a rilevare gli anticorpi contro gli antigeni specifici del CMV IE1, IE2, p52, p130, p150-1, p150-XP1, p65, p38, gL e gB.

Per facilitarne l'identificazione, i pozzetti della piastra da microtitolazione sono contrassegnati da un codice cromatico:

in particolare, il CMV ViraChip®IgM è contrassegnato da un **quarto di cerchio azzurro** sul bordo del pozzetto.

Codice articolo:	V-CMCMOK	Codice articolo:	V-CMCMOK (Deca Kit)
Confezione:	1 MTP da 96 cavità separabili singolarmente	Confezione:	10 MTP da 96 cavità separabili singolarmente
Materiale di prova:	10 µl	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 pozzetti ciascuno	CMV ViraChip®Antigen Coated Wells	(Cod. prod.: V-CMCMAC)
1x o 10x da 12 ml	Pozzetti separabili singolarmente con microarray ViraChip®, pronti all'uso ViraChip®Conjugate AP-Anti-Human anti-IgM	(Cod. art.: V-UVCMKI)
1x o 10x da 100 ml	Soluzione di coniugato anti-IgM umana per test ViraChip®, di origine caprina, con fosfatasi alcalina bovina, pronta all'uso ViraChip®/ ViraStripe®/ ViraBlot®Diluyente / Wash Buffer	(Cod. art.: V-UVNUWP)
1x o 10x 12 ml	Tampone di lavaggio concentrato per test ViraChip®, con detergenti e sali per prevenire legami non specifici, 10x ViraChip®Chromogen / Substrate Solution	(Codice articolo: V-UVCUCS)
1x o 10x 50 ml	Soluzione Chromogen/substrato per test ViraChip®, con BCIP / NBT, pronta all'uso ViraChip®Sample Buffer	(Cod. art.: V-UVCUPP)
	Tampone per campioni per test ViraChip®, pronto all'uso	

Disponibile come opzione

1 striscia MTP da 8 pozzetti	CMV ViraChip® Antigen Coated Wells (8)	(Cod. art.: V-CMCMRT)
330 µl	Cavità singolarmente separabili con microarray ViraChip®, pronte all'uso CMV ViraChip®Positive Control IgM	(Cod. art.: V-CMCMCK)
330 µl	Siero di controllo positivo per IgM, umano, pronto all'uso CMV ViraChip®Weak Positive Control IgM	(Codice articolo: V-CMCMWK)
330 µl	Siero di controllo IgM debolmente positivo, umano, pronto all'uso CMV ViraChip®Negative Control IgG, A, M	(Codice articolo: V-CMCPNK)
	Siero di controllo negativo per IgG, IgA, IgM, umano, pronto all'uso	

Attrezzatura aggiuntiva richiesta e materiale necessario

1. ViraChip®Software	per la preparazione, l'esecuzione e l'analisi del test, a partire dalla versione v1.3.0-1960	(cod. art.: V-VCNUPR)
2. Scanner di codici a barre 2D	per la lettura dei codici DataMatrix	

3117_CMV_ViraChip_IgM_AL_IVDR_de

1.1

© Copyright Viramed Biotech AG dicembre 2024

Revisione 19 dicembre 2024

Test Kit per il test IgM CMV Virachip[®]

- 2 -

3. **Piastra da microtitolazione** per il riempimento delle file parzialmente utilizzate della piastra da microtitolazione nel telaio di supporto (Cod. art.: V-UVNMTP) con 96 pozzetti vuoti
4. **Agitatore orbitale (750 giri/min) lineare (20 Hz)** per la miscelazione di campioni e reagenti durante il trattamento oppure **agitatore**
5. **Virachip[®]Scanner** per la digitalizzazione / misurazione dei test Virachip[®]sviluppati, a partire da (cod. art.: V-UVCSA)
oppure **Virachip[®]Reader** a partire dalla versione v1.0 oppure Virachip[®]Scanner Reader a partire dalla (Cod. art.: V-UVCCAM)
versione Rev.03
6. Opzionale: **ventilatore** per un'asciugatura più rapida delle piastre da microtitolazione sviluppate

Preparazione dei reagenti e dei campioni dei pazienti

- Prima dell'uso, portare tutti i reagenti e la piastra da microtitolazione ancora nella confezione alla temperatura ambiente (TA: 20-23 °C). Mescolare bene tutti i reagenti prima dell'uso.**
- Tampone di lavaggio:** Diluire il tampone di lavaggio concentrato in rapporto **1:10** con acqua distillata o deionizzata (H₂O):
100 ml di tampone di lavaggio concentrato + 900 ml di H₂O
- Tampone per campioni:** Pronto all'uso
- Soluzione di coniugato:** Pronta all'uso
- Soluzione Chromogen / substrato:** Pronta all'uso
- Cavità della piastra MTP:** Estrarre con cautela la piastra da microtitolazione (MTP) dalla confezione e inserire il numero necessario di pozzetti in un telaio per piastre da microtitolazione vuoto (Preparazione ed esecuzione del test, punto 3). Una volta estratti dalla confezione, utilizzare immediatamente i pozzetti. Riporre immediatamente i pozzetti non utilizzati 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 esempio **10 µl + 750 µl di tampone per campioni**. Per l'elaborazione sono necessari 100 µl per cavità del campione diluito.
- Controlli:** Se necessario, il siero di controllo positivo e quello negativo vengono utilizzati in una diluizione **1:16**, ad esempio: **10 µl di siero di controllo + 150 µl di tampone per campioni**. Per l'elaborazione, vengono utilizzati 100 µl del controllo diluito per ogni cavità.

Struttura del microarray CMV Virachip[®]IgM

Antigeni:

Ogni antigene specifico del CMV, **IE1, IE2, p52, p130, p150-1, p150-XP1, p65, p38, gL e gB**, è applicato tre volte in concentrazione identica sotto forma di tripletta di spot. Ogni tripletta di spot corrisponde a una banda nel Western blot / immunoblot.

Controlli:

Ogni cavità^{del} Virachip[®]contiene i seguenti controlli integrati:

due controlli sierici (sc), un controllo negativo (nc), due controlli di coniugato IgG (ccG), due controlli di coniugato IgM (ccM) e sei controlli di calibrazione (cal).

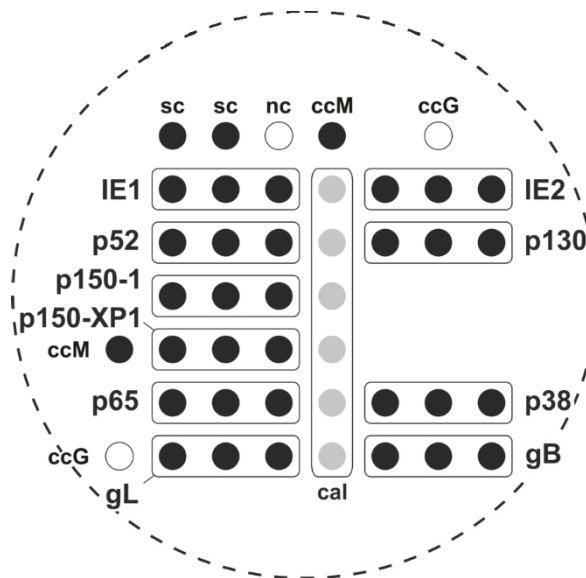


Figura 1: Immagine di una cavità della piastra da microtitolazione con il CMV Virachip[®]IgM Microarray (ingrandita). Disposizione delle triplette di spot per gli antigeni e degli spot per i controlli integrati.

Nomenclatura e descrizione degli antigeni del CMV tratti dalla letteratura

Nomenclatura:

IE1

Antigene:

Proteina immediata-precoce 1, proteina non strutturale, pUL123

Osservazioni:

Le proteine immediate-early IE1 e IE2 sono i primi prodotti genici virali che vengono sintetizzati nelle cellule ospiti dopo l'infezione (6).

Test Kit per il test IgM CMV ViraChip®

- 3 -

Nomenclatura:

IE2

p52

p130

p150-1
pUL32,

p150-XP1

p65

p38

gL

gB

Antigene:
**Proteina immediata-precocce 2,
proteina non strutturale,
pUL122**
Proteina non strutturale, pUL44
Proteina non strutturale, pUL57
Proteina tegumentale,
frammento 1
**Proteina tegumentale,
pUL32, frammento XP1**
Proteina tegumentale, pUL83
Proteina tegumentale, pUL80a
Glicoproteina L, pUL115
Glicoproteina B, pUL55
Osservazioni:

Le proteine immediate-early IE1 e IE2 sono i primi prodotti genici virali che vengono sintetizzati nelle cellule ospiti dopo l'infezione (6).

Fattore di processività della DNA polimerasi – una componente essenziale del complesso di replicazione (9).

Proteina principale di legame al DNA (9)

Grande proteina strutturale fosforilata (7,12)

Grande proteina strutturale fosforilata (7,12)

Proteina strutturale fosforilata (9)

Proteina strutturale fosforilata (5)

Glicoproteina dell'involucro del virione (10)

Proteina transmembrana di tipo 1 (3), identità di sequenza con l'HSV-1: 24,2% e con l'EBV: 30,2% (1)

Preparazione ed esecuzione del test

L'elaborazione dei campioni sui Antigen Coated Wells ViraChip® può essere automatizzata 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 delle apparecchiature e la formazione a cura di Viramed Biotech AG vengono fornite istruzioni dettagliate passo dopo passo relative alla soluzione di automazione utilizzata, nonché le istruzioni per l'uso del ViraChip® Software. I dettagli sono descritti nella sezione «Note sulle apparecchiature e sul software».

Le istruzioni operative riportate di seguito si applicano alla lavorazione manuale con apparecchiature di laboratorio generiche e indipendenti, 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 assegnazione del ViraChip® Software.

2. Caricamento

Scansione dei codici a barre 2D presenti sulle etichette del Test Kit 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 (RT).

3.1 Preparazione

- Inserire nel telaio di supporto il numero di pozzetti definito in base alla disposizione.
- Riempire le posizioni vuote di una striscia della piastra da microtitolazione nel telaio di supporto con pozzetti vuoti. Le strisce sono contrassegnate sulla piastra da microtitolazione con i numeri da 1 a 12.

Assicurarsi che, durante la rottura dei sigilli, nessuna particella di plastica cada nei pozzetti.

3.2 Preincubazione

- Aggiungere 300 µl di tampone di lavaggio già diluito in ogni pozzetto.
- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (RT) sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.3 Incubazione dei campioni

- In base allo schema di distribuzione, aggiungere 100 µl di campione del paziente diluito 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 già diluito per ogni pozzetto.
- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

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

Durante le fasi di incubazione, il fondo delle cavità deve essere completamente coperto di liquido.

Durante le fasi di incubazione e lavaggio, utilizzare un agitatore orbitale, regolabile a una frequenza di circa 750 rpm, oppure un agitatore lineare, regolabile a una frequenza di circa 20 Hz.

3.5 Incubazione con il coniugato

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

3.6 Lavare 3 volte

- Aggiungere 300 µl di tampone di lavaggio già diluito in ogni pozzetto.
- Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Aspirare il liquido.

3.7 1 lavaggio

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

3.8 Incubazione del substrato

- Aggiungere 100 µl di soluzione Chromogen/substrato in ciascuna cavità.
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente sull'agitatore.
- Arrestare la reazione: aspirare il liquido.

3.9 Lavare 3 volte

- Aggiungere 300 µl di acqua distillata o deionizzata in ogni pozzetto.
- Nessuna incubazione intermedia.
- Aspirare il liquido.

3.10 Asciugare i pozzetti

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

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

Test Kit per il test IgM CMV ViraChip®

- 5 -

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 dal trattamento (conservare la piastra da microtitolazione al riparo dalla luce). Per le istruzioni dettagliate, consultare il manuale dell'apparecchio.

5. Analisi

5.1 Verificare la corrispondenza tra le triplette di spot antigenici e gli spot di controllo (convalida tecnica)

Ogni spot viene automaticamente assegnato dal ViraChip® Software, in base alla sua posizione, alla corrispondente tripletta di spot dell'antigene o allo spot di controllo corrispondente.

L'assegnazione automatica deve essere verificata visivamente confrontandola con lo schema riportato nella Fig. 1. Le assegnazioni che non corrispondono allo schema illustrato devono essere contrassegnate come «non valide» nel campo «QC». Il campione in questione deve essere ripetuto.

5.2 Verifica di validità

La verifica di validità viene eseguita automaticamente dal ViraChip® Software.

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

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

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

Un microarray ViraChip® è valido se i seguenti spot di controllo soddisfano i criteri definiti nella ViraChip® Software:

- **Controlli sierici** (sc) superiori al valore limite
- **Controlli dei coniugati IgM** (ccM) al di sopra del valore limite
I controlli del coniugato IgM devono presentare una reazione più intensa rispetto ai controlli delle altre classi di coniugati.
- **Controlli di calibrazione** (cal) al di sopra del valore limite
- **Controllo negativo** (nc) al di sotto del valore limite

Se uno dei criteri 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.

Il **Negative Control CMV ViraChip® IgG,A,M** può essere utilizzato nelle serie di test a scopo di convalida.

Il **controllo positivo CMV ViraChip® IgM** può essere utilizzato a scopo di validazione durante le serie di test.

Il **CMV ViraChip® IgM Weak Positivo** può essere utilizzato a scopo di validazione nelle serie di test.

5.3 Analisi dei microarray ViraChip®

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

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

Criteri di valutazione

Unità ViraChip® delle triplette di spot	Risultato	Valutazione
Almeno tre triplette di spot ≥ 100 unità ViraChip® da: p52, p150-1, p150-XP1, p65 <u>Oppure</u> Almeno cinque triplette di spot ≥ 100 unità ViraChip® di tutti gli antigeni: IE1, IE2, p52, p130, p150-1, p150-XP1, p65, p38, gL o gB	Positivo	Sono rilevabili anticorpi IgM specifici contro il CMV . È probabile un'infezione da CMV.
Tutte le altre combinazioni	Negativo	Non sono rilevabili anticorpi IgM specifici contro il CMV o ne sono presenti solo in quantità minime. In caso di sospetta infezione recente, dopo 2-3 settimane eseguire un secondo prelievo per analizzare la presenza di anticorpi specifici IgM e IgG.

Significato diagnostico degli anticorpi anti-CMV

1. Gli anticorpi IgG sono rilevabili in caso di infezione primaria dopo poche settimane (8). La rilevazione di una sier conversione IgG è considerata prova di un'infezione primaria (11). Gli anticorpi anti-gB IgG sono rilevabili al più presto circa tre mesi dopo la sier conversione (11). Circa il 18% dei soggetti sieropositivi al CMV non presenta

un'infezione risalente a molto tempo fa (11,2).

2. Gli anticorpi IgM compaiono per la prima volta circa 2-3 settimane dopo un'infezione primaria (8). I titoli di solito diminuiscono da alcune settimane a diversi mesi dopo l'infezione, ma possono persistere fino a 12

Test Kit per il test IgM CMV ViraChip®

- 6 -

persistono per mesi (9,8,11,2). Gli anticorpi IgM specifici anti-CMV possono essere rilevati sia in caso di recidiva sia in caso di coinfezione con il virus di Epstein-Barr o il parvovirus B19, nonché in presenza di malattie autoimmuni (11, 4). La sola rilevazione di anticorpi IgM anti-CMV non è quindi sufficiente per confermare un'infezione primaria (11, 2).

3. Sono state descritte reazioni crociate con antigeni del CMV, in particolare nella determinazione degli anticorpi IgM, in caso di infezioni da virus di Epstein-Barr (11) o parvovirus B19, nonché in caso di malattie autoimmuni (11,4).

Dati prestazionali

Sensibilità

Per determinare la sensibilità diagnostica, sono stati analizzati con il CMV ViraChip®IgM campioni provenienti da pazienti con diversi stadi clinici di infezione da CMV / momenti successivi all'insorgenza dei sintomi.

Dati aggregati (riassuntivi)	CMV ViraChip IgM positivo, % (n)
Infezioni precoci (circa 0-6/7 settimane, n = 56)	60,7% (34)
Infezioni recenti / acute / primarie (circa 6-16 settimane, n = 256)	90,6% (232)
Infezioni di circa >16 settimane (n = 48)	70,8% (34)

Tab. 1: Viene illustrata la sensibilità del test CMV ViraChip IgM nelle diverse fasi dell'infezione da CMV / in base al momento successivo all'insorgenza dei sintomi (dati sintetizzati provenienti da diversi gruppi). Nelle infezioni primarie (circa 6-16 settimane dall'insorgenza dei sintomi) la sensibilità raggiunge il valore massimo del 90,6% (valori medi di tutti i gruppi) fino al 100%, a seconda del gruppo considerato. La sensibilità è inferiore nelle fasi molto precoci (circa 0-7 settimane), in cui i titoli di IgM attesi sono ancora bassi. Negli stadi successivi (>16 settimane dall'infezione) la sensibilità diminuisce nuovamente al 70,8%, il che corrisponde alla naturale diminuzione degli anticorpi IgM.

Specificità

Per determinare la specificità diagnostica, sono stati analizzati sieri di pazienti con reattività negativa prevista al CMV ViraChip®IgM. Tutti questi campioni erano risultati negativi nei test di riferimento (CLIA, ELISA).

Collettivo	CMV ViraChip® IgM negativo, % (n)
Negativo (n = 291)	99% (289)

Tab. 2: Viene illustrata la specificità del CMV ViraChip IgM.

Prevalenza

Per determinare la prevalenza, sono stati analizzati sieri di donatori di sangue e donne in gravidanza con il CMV ViraChip®IgM.

Popolazione	CMV ViraChip® IgM positivo, % (n)
Sieri di donatori di sangue e donne in gravidanza (n = 299)	2% (5)

Tab. 3: Viene riportata la prevalenza del CMV ViraChip IgM.

Test Kit per il test IgM CMV ViraChip®

- 7 -

Reattività crociata

La reattività crociata con gli antigeni del CMV è nota nei campioni provenienti da infezioni da virus di Epstein-Barr (EBV) o parvovirus B19, nonché nelle malattie autoimmuni, in quanto provoca un'attivazione policlonale delle cellule B e una risposta immunitaria aspecifica. Per questo motivo, i risultati delle IgM anti-CMV devono essere interpretati nel contesto dei sintomi, dell'anamnesi del paziente, di altri reperti clinici e risultati di analisi, nonché dell'esame di campioni di follow-up, al fine di evitare diagnosi errate. Sono stati analizzati con il CMV ViraChip IgM 86 campioni che presentavano anticorpi contro altri agenti infettivi o anticorpi autoimmuni, o che erano potenzialmente cross-reattivi nei confronti del patogeno in questione, oppure rilevanti dal punto di vista della diagnosi differenziale a causa di omologie antigeniche o sintomatologia simile.

CMV ViraChip IgM

Campioni	negativo	positivo	% di positività
Autoimmune	10	0	(0/10) 0%
Celiachia	10	0	(0/10) 0%
EBV	10	0	(0/10) 0%
HSV	10	0	(0/10) 0%
Influenza A	9	1	(1/10) 10%
Parvovirus	10	0	(0/10) 0%
Rosolia	10	0	(0/10) 0%
VZV	10	0	(0/10) 0%
Clamidia	10	0	(0/10) 0%
Numero totale	85	1	(1/86) 1,2%

Tab. 4 Su un totale di 86 campioni con reattività crociata, l'1,2% (1/86) risulta positivo al CMV ViraChip IgM. Il campione positivo è uno dei 10 (10%) campioni che presentano una caratterizzazione preliminare positiva per l'influenza A. Tutti i campioni con una caratterizzazione preliminare relativa all'EBV e al parvovirus sono risultati negativi nel test CMV ViraChip IgM.

Matrice del campione

Sono stati analizzati con il CMV ViraChip IgM campioni provenienti da diverse matrici/anticoagulanti (siero, plasma con citrato di sodio, plasma con eparina al litio, plasma con K2 EDTA) dello stesso paziente. Ai campioni è stato aggiunto un campione di riferimento positivo per CMV IgM, in modo che la concentrazione finale della diluizione dei campioni fosse di 1:76. Tutti i campioni analizzati delle diverse matrici / anticoagulanti (siero, plasma con citrato di sodio, plasma con eparina di litio, plasma con K2 EDTA) hanno mostrato lo stesso risultato positivo del campione di riferimento positivo per CMV IgM (corrispondenza del 100%).

Interferenza

13 campioni risultati positivi allo screening per il fattore reumatoide (IgG/IgA o IgM) sono stati analizzati con il CMV ViraChip IgM.

CMV ViraChip IgM

Pannello	negativo	positivo	Numero totale	% di positività
Fattore reumatoide IgG/IgA o IgM positivo	10	3	13	(3/13) 23,1%

Tab. 6: Nei campioni positivi al fattore reumatoide IgG/IgA o IgM, la positività al CMV ViraChip IgM è pari al 23,1%.

Inoltre, i campioni sono stati analizzati con il CMV ViraChip IgM in presenza di diverse interferenze (fattore reumatoide (RF), emolitiche, itteriche, lipemiche). I campioni sono stati addizionati con un campione di riferimento positivo per CMV IgM, in modo che la concentrazione finale della diluizione del campione corrispondesse alla concentrazione standard di 1:76. Tutti i campioni di interferenza analizzati hanno mostrato lo stesso risultato positivo del campione di riferimento positivo per CMV IgM (corrispondenza del 100%). Vedi limitazioni del metodo.

Intervallo di misurazione

Non essendo disponibile uno standard di riferimento per le IgM anti-CMV, sono state analizzate diverse diluizioni di campioni positivi alle IgM anti-CMV sul CMV ViraChip IgM, confrontandole con un test di riferimento che utilizzava le stesse diluizioni. Le prediluizioni dei campioni sono state preparate con un siero negativo.

		CMV ViraChip IgM											
ID	Pre-diluizione del campione	IE1	p52	p150-1	p150-XP1	p65	gL	IE2	p130	p38	gB	Risultati	Test di riferimento Risultato
Campione 1	non diluito	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	positivo	positivo
	1:8	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	negativo	positivo
	1:80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo	negativo
Campione 2	non diluito	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	positivo	positivo
	1:8	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	positivo	positivo
	1:32	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	negativo	positivo
	1:320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo	negativo
Campione negativo	non diluito	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	negativo	negativo

Tab. 8: Il campione 1 non diluito risulta positivo sia nel test di riferimento che nel CMV ViraChip IgM. Il campione pre-diluito 1:8 risulta negativo nel CMV ViraChip IgM, ma positivo nel test di riferimento. Con il campione pre-diluito 1:80, entrambi i test risultano negativi. Il campione 2 risulta positivo nel test di riferimento e nel CMV ViraChip IgM utilizzando il campione non diluito e quello pre-diluito 1:8. Il campione pre-diluito 1:32 risulta negativo nel CMV ViraChip IgM, ma positivo nel test di riferimento. Utilizzando campioni pre-diluiti 1:320, entrambi i test risultano negativi.

Test Kit per il test IgM CMV Virachip®

- 9 -

Riproducibilità

Utilizzando un lotto di produzione, il CMV Virachip IgM è stato analizzato in cinque giorni diversi. Ogni campione è stato analizzato tre volte in ogni ciclo da due persone/operatori ciascuno. Complessivamente, ogni campione è stato analizzato 30 volte. I campioni utilizzati sono stati classificati, sulla base di un test di riferimento, come negativi, debolmente, moderatamente o fortemente positivi, in modo da corrispondere all'intero spettro dei titoli anticorpali / all'intero intervallo di misurazione di un test ELISA per il CMV. I risultati sono stati confrontati mediante classificazione; sono riportate le percentuali di riproducibilità.

CMV Virachip IgM											
ID	IE1	p52	p150-1	p150-XP1	p65	gL	IE2	p130	p38	gB	Risultati
VM2825	(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%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM2853	(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%	(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%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM2915	(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%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM2939	(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%	(30/30) 100%	(30/30) 100%
VM4685-04	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(30/30) 100%	(29/30) 96,7%*	(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%	(29/30) 96,7%*	(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%	(210/210) 100%	(208/210) 99,0%	(210/210) 100%	(210/210) 100%	(210/210) 100%	(210/210) 100%	(210/210) 100%
Totale	(2098/2100) 99,9%										(210/210) 100%

Tab. 9: Studio di riproducibilità. Viramed®Biotech AG CMV Virachip®IgM Percentuale di riproducibilità nel risultato del test = 100%

*La reattività antigenica di gL rientra nell'intervallo di cut-off dei campioni VM4685-04 e VM4685-05.

Precisione / Ripetibilità

Il CMV ViraChip IgM è stato analizzato da un unico operatore utilizzando gli stessi campioni in triplicato per ogni ciclo, in un'unica giornata. I campioni utilizzati sono stati classificati, sulla base di un test di riferimento, come negativi, debolmente positivi, moderatamente positivi o fortemente positivi, in modo da corrispondere all'intero spettro dei titoli anticorpali / all'intero intervallo di misurazione di un test ELISA per il CMV. I risultati sono stati confrontati mediante classificazione; sono riportate le percentuali di ripetibilità.

CMV ViraChip IgM											
ID	IE1	p52	p150-1	p150-XP1	p65	gL	IE2	p130	p38	gB	risultato
VM2825	(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%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM2853	(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%	(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%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM2915	(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%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM2939	(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%	(3/3) 100%	(3/3) 100%
VM4685-04	(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%	(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%	(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%	(21/21) 100%	(21/21) 100%
Totale	(210/210) 100%										(21/21) 100%

Tab. 10: Studio di precisione. Viramed® Biotech AG CMV ViraChip® IgM Percentuale di ripetibilità nei risultati del test = 100%

Per determinare i dati prestazionali sono stati utilizzati il ViraChip®Software 1.3.0, il ViraChip®Scanner v1.0 e il ViraChip®Reader Rev.03 o versioni successive.

Requisiti per l'utente

- Questo test deve essere eseguito esclusivamente in un laboratorio specializzato, dotato delle attrezzature di laboratorio adeguate (ad esempio conformi alle norme GLP) e delle eventuali autorizzazioni ufficiali necessarie per la manipolazione dei campioni da analizzare.
- Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale specializzato che abbia ricevuto una formazione specifica sulla procedura di analisi.
- Per ottenere un risultato accurato, è necessario attenersi alle istruzioni per l'uso e alle "Buone Pratiche di Laboratorio (GLP)".

Conservazione e durata di validità dei reagenti

- Microarray ViraChip®:** conservabili nella confezione originale chiusa a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C fino alla data di scadenza.
- Tampone di lavaggio concentrato, 10x:** conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza.
- Tampone di lavaggio pronto all'uso:** conservabile a 2-8 °C per circa 2 settimane.
- Tampone per campioni:** conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza; una volta aperto, 10 giorni.
- Soluzione di coniugato:** conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza; una volta aperta, 10 giorni.
- Soluzione Cromogen/substrato:** conservabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza; una volta aperta, 10 giorni. Proteggere dalla luce!

Precauzioni / Misure di sicurezza

- Tutti i componenti sierici umani sono stati sottoposti a test per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV 1 e 2 e per l'antigene HBs, risultando negativi. Ciononostante, tutti i componenti umani del kit, così come i campioni dei pazienti, devono essere considerati potenzialmente infettivi e utilizzati con le opportune precauzioni. Quando si lavora con materiali potenzialmente pericolosi o infettivi, è necessario rispettare le leggi, i regolamenti e le norme nazionali e internazionali applicabili. Ciò vale anche per lo stoccaggio e lo smaltimento delle sostanze chimiche e dei reagenti utilizzati.
- È necessario attenersi alle misure di protezione previste dalle direttive specifiche per i laboratori, attualmente in vigore a livello regionale, relative alla manipolazione di sostanze pericolose e biologiche. Tra le misure figurano:
 - Non pipettare con la bocca.
 - Indossare guanti monouso e occhiali protettivi/mascherina.
 - Non mangiare, bere o fumare sul posto di lavoro.
- I campioni e tutti i materiali potenzialmente contaminati, nonché i rifiuti liquidi infettivi, devono essere smaltiti secondo le norme di laboratorio generalmente riconosciute
- decontaminare secondo le linee guida, 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.
- Le informazioni relative ai possibili pericoli, alle misure di primo soccorso, alle misure da adottare in caso di rilascio accidentale di grandi quantità, alla manipolazione e allo stoccaggio, ai dispositivi di protezione individuale, alle indicazioni per lo smaltimento e ai dati tossicologici sono documentate nelle schede di sicurezza.
- È necessario evitare che polvere e altre impurità penetrino nelle cavità dell'MTP, poiché ciò potrebbe causare risultati non validi.
- Tutti gli incidenti gravi verificatisi in relazione al prodotto devono essere segnalati al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui ha sede l'utilizzatore e/o il paziente.

Prelievo, manipolazione e conservazione del campione del paziente

1. Il **Test Kit CMV ViraChip® IgM** deve essere utilizzato con campioni di siero e plasma umani (anticoagulanti: citrato di sodio, eparina di litio, K2 EDTA).
2. Il prelievo e la conservazione dei campioni devono essere effettuati da personale medico specializzato, utilizzando sangue intero, secondo gli standard, i metodi e le condizioni vigenti. Il trasporto dei campioni è possibile a temperatura ambiente (14; 15; 16; 17).
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 l'esecuzione del test, i campioni devono essere portati a temperatura ambiente. Dopo lo scongelamento, mescolare con cura i campioni e, se necessario, rimuovere le particelle visibili mediante centrifugazione.
5. È necessario evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti dei campioni.

Limiti della procedura di analisi

1. Un risultato positivo del test sul campione del paziente in questione deve essere considerato un sintomo. L'interpretazione e la valutazione dei risultati del test devono essere effettuate esclusivamente da personale medico specializzato, tenendo conto di tutti i dati rilevanti (13).
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 a seconda dei test utilizzati o dei diversi produttori, a causa delle differenze in termini di sensibilità, specificità e metodi di analisi.
4. In caso di immunosoppressione, derivante tra l'altro dall'HIV/AIDS o dalla chemioterapia, la valutabilità risulta limitata. Il test degli anticorpi anti-CMV potrebbe non rispecchiare appieno lo stato infettivo attuale (13).
5. I farmaci e la somministrazione di immunoglobuline possono provocare reazioni anticorpali non specifiche (13).

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 di analisi precisi. Un'esecuzione non conforme della procedura, come ad esempio l'esecuzione inadeguata delle fasi di lavaggio, può causare risultati errati.
8. Non è consentito l'uso di «campioni in pool», in cui vengono analizzati più sieri contemporaneamente, poiché in tali casi la sensibilità e la specificità del test non sono garantite.
9. I campioni che sono stati pretrattati con il calore, che sono emolitici, itterici, lipemici o positivi al fattore reumatoide possono portare a risultati non validi.
10. I campioni non devono presentare contaminazione microbica.
11. A causa di reazioni crociate, sono stati riscontrati risultati falsi positivi per l'influenza A; tuttavia, tali risultati possono verificarsi, ad esempio, anche in caso di infezioni da EBV o parvovirus B19.

Note su apparecchiature e software

1. In caso di esecuzione automatizzata, è necessario programmare e utilizzare le fasi operative convalidate da Viramed Biotech AG per il rispettivo tipo di processore.
2. In caso di utilizzo di materiali di consumo specifici per il processore, le relative configurazioni devono essere approvate da Viramed Biotech AG in base alle 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 necessario utilizzare esclusivamente il software specifico per lo strumento. Le modifiche ai file di configurazione possono essere effettuate solo da Viramed Biotech AG.
5. Come strumenti di misurazione devono essere utilizzati esclusivamente sistemi approvati da Viramed Biotech AG.
6. L'analisi dei microarray ViraChip® avviene esclusivamente tramite il ViraChip® Software. Non è possibile effettuare un'analisi manuale/visiva.

Bibliografia

1. BURKE, HG & HELDWEIN, EE: Struttura cristallina della glicoproteina B del citomegalovirus umano, PLoS Path, 2015
2. HAMPRECHT, K: Ostacoli nella diagnostica prenatale dell'HCMV – Importanza dell'avidità delle IgM e delle IgG, Diagnostik im Dialog, 2017
3. KINZLER, ER & COMPTON, T: Caratterizzazione della fusione cellula-cellula indotta dalla glicoproteina del citomegalovirus umano, J Virol, 2005
4. LAZZAROTTO, T et al.: Aggiornamento sulla prevenzione, la diagnosi e la gestione dell'infezione da citomegalovirus durante la gravidanza, Clin Microbiol Infect, 2011
5. LOVELAND, AN et al.: Il dominio amino-conservato delle proteine UL80a del citomegalovirus umano è necessario per interazioni chiave durante le prime fasi della formazione del capside e della produzione virale, J Virol, 2007
6. PAULUS, C & NEVELS, M: Le principali proteine immediate-precoce del citomegalovirus umano come antagonisti delle risposte antivirali intrinseche e innate dell'ospite, Viruses, 2009
7. 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
8. PRINCE, HE & LAPÉ-NIXON, M: Ruolo del test di avidità delle IgG anti-citomegalovirus (CMV) nella diagnosi dell'infezione primaria da CMV durante la gravidanza, Clinical and Vaccine Immunology, 2014
9. REVELLO, MG & GERNA, G: Diagnosi e gestione dell'infezione da citomegalovirus umano nella madre, nel feto e nel neonato, Clin Microbiol Rev, 2002
10. RYCKMAN, BJ et al.: Caratterizzazione del complesso gH/gL/UL128-131 del citomegalovirus umano che media l'ingresso nelle cellule epiteliali ed endoteliali, EMS Microbiol, 2008
11. HAMPRECHT, K: Diagnostica di laboratorio delle infezioni virali rilevanti in gravidanza, Linee guida S2K, numero di registrazione AWMF 0093/001, AWMF, 2014
12. SCHOLL, BC et al.: Espressione procariotica dei polipeptidi immunogenici della grande fosfoproteina (pp150) del citomegalovirus umano, J Gen Virol, 1988
13. THOMAS, L: Laboratorio e diagnosi, Med Verlagsgesellschaft Marburg, 2012
14. TUCK, MK et al.: Procedure operative standard per il prelievo di siero e plasma, J Proteome Res, 2009
15. Direttiva 2008/68/CE: relativa al trasporto interno di merci pericolose, versione aggiornata
16. RKI: Manuali di preanalitica, versione aggiornata
17. Linee guida AWMF S2k 093/001: Diagnostica di laboratorio delle infezioni virali rilevanti per la gravidanza, 2021

Test Kit per il test IgM CMV ViraChip®

- 12 -

Produttore

Viramed® Biotech AG
Behringstr. 11
82152 Planegg, Germania

Altre informazioni

Motivo della revisione Revisione ai fini dell'IVDR

IVDR (articolo 29) La relazione sintetica sulla sicurezza e sulle prestazioni è disponibile qui: EUDAMED - banca dati pubblica - Ricerca per UDI-DI e dati relativi al dispositivo, compreso l'SS(C)P.

Legenda dei simboli

	Produttore		Codice articolo
	Attenersi alle istruzioni per l'uso		Utilizzabile fino al / Data di scadenza
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>		Limiti di temperatura (conservazione)
	Numero di lotto		Siero di controllo positivo
	Sufficiente per 96 test		Siero di controllo negativo