AESKU.DIAGNOSTICS
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS



AESKULISA®
THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

LIBRETTO
DI ISTRUZIONI

AESKULISA® Cytomegalovirus IgG / IgM
AESKULISA® Cytomegalovirus gB IgG
Ref 6032 / 6033 / 6035

CE 2797 | Σ 96 | 2°C–8°C | IVD

Aggiornamenti	
Ultima versione	V.005 del 19/11/2024
Versione precedente	V.004 del 07/04/2021
Capitolo modificato	Indirizzo, Capitolo 13
Motivo delle modifiche	Implementazione UDI, aggiornamento dell'indirizzo, aggiunta del capitolo 13

Aesku.Diagnostics GmbH & Co. KG
Mikroforum Ring 2
55234 Wendelsheim
Germany
Phone: +49 6734 9622-0
Fax: +49 6734 9622-2222
Website: www.aesku.com
Mail: info@aesku.com

Indice dei contenuti

1 Destinazione d'uso 1
2 Significato diagnostico 1
3 Principio del test *AESKULISA*® 2
4 Antigeni 2
5 Componenti del test *AESKULISA*® 2
6 Materiale aggiuntivo richiesto 3
7 Immagazzinamento e durata di conservazione 3
8 Esecuzione del test *AESKULISA*® 4
8.1 Avvertenze generali 4
8.2 Preparazione dei reagenti 4
8.2.1 Strisce da microtitolazione (pronte all'uso) 4
8.2.2 Calibratori (pronti all'uso) 4
8.2.3 Controlli (pronti all'uso) 5
8.2.4 Tampone di diluizione dei campioni (conc. 5x) 5
8.2.5 Tampone di lavaggio (conc. 50x) 5
8.2.6 Coniugato POD anti IgA, IgG o IgM umane (pronto all'uso) 5
8.2.7 Tampone substrato (pronto all'uso) 5
8.2.8 Reagente bloccante (pronto all'uso) 5
8.3 Preparazione del campione 5
8.3.1 Materiale dei campioni 5
8.3.2 Diluente per campioni 5
8.3.3 Assorbimento del fattore reumatoide con *AESKULISA*® IgM 5
8.3.4 Conservazione dei campioni 6
8.4 Esecuzione del test 6
8.4.1 Schema di pipettamento 6
8.4.2 Svolgimento del test 7
8.5 Esecuzione con applicazione automatica 8
9 Valutazione di *AESKULISA*® 8
9.1 Standardizzazione 8
9.2 Valutazione quantitativa 8
9.3 Intervallo dei valori limite 9
9.4 Intervalli di misura 9
9.5 Valutazione qualitativa 9
9.6 Criteri di validità 9
9.7 Interpretazione dei risultati 10
10 Caratteristiche delle prestazioni di *AESKULISA*® 11
10.1 Sensibilità e specificità analitiche 11
10.2 Sensibilità e specificità diagnostica 11
10.3 Valori attesi 12
10.4 Ripetibilità 12
11 Istruzioni di sicurezza 14
11.1 Avvertenze e precauzioni 14
11.2 Smaltimento 14
12 Bibliografia 15
13 Simboli normativi 17

1 Destinazione d'uso

I test *AESKULISA*® Cytomegalovirus IgG e IgM sono immunodosaggi qualitativi e quantitativi per la determinazione di anticorpi IgG e IgM umani diretti contro il citomegalovirus nel siero o nel plasma. Il test *AESKULISA*® Cytomegalovirus IgM viene utilizzato come test iniziale per la determinazione di infezioni acute. Il test *AESKULISA*® Cytomegalovirus IgG permette la conferma di un contatto patogeno e supporta il rilevamento dello stato immunitario.

Il test *AESKULISA*® Cytomegalovirus gB IgG è un immunodosaggio qualitativo e quantitativo per la determinazione di anticorpi IgG umani diretti contro la glicoproteina B (gB) di HCMV nel siero o nel plasma.

L'interpretazione dei risultati può avvenire solo in correlazione con il quadro clinico. Una diagnosi non dovrebbe basarsi esclusivamente sui risultati del test eseguito, ma deve essere formulata tenendo in considerazione tutti i riscontri clinici e di laboratorio. Sono inoltre consigliabili ulteriori indagini per conferma. Gli immunodosaggi *AESKULISA*® sono progettati esclusivamente per l'uso diagnostico *in vitro* da parte di personale qualificato, addestrato, specificamente consigliato e che abbia familiarità con i metodi di laboratorio.

2 Significato diagnostico

I citomegalovirus umani (HCMV) sono virus patogeni umani della famiglia *Herpesviridae*, noti anche come herpes virus umani 5 (HHV 5), diffusi in tutto il mondo. Gli agenti patogeni della citomegalia, grandi 200 nm, hanno un capside icosaedrico che circonda il genoma dsDNA composto da circa 230.000 bp ed è racchiuso da una membrana lipidica in cui sono incorporate varie glicoproteine. I citomegalovirus sono caratterizzati da un ciclo di replicazione notevolmente lento. Le cellule infettate sono generalmente molto ingrandite.

I citomegalovirus umani si trasmettono principalmente tramite infezioni da striscio di secrezioni corporee (ad esempio saliva, lacrime, urina o sperma), tramite contatto con le mucose, trasfusioni di sangue, trapianti di organi e per via transplacentare o intrauterina. La sieroprevalenza mostra una più marcata dipendenza dallo standard di vita socioeconomico e in Europa si attesta tra il 40 e il 60%. Le infezioni primarie sono solitamente asintomatiche in individui altrimenti sani e immunocompetenti. In caso di malattia, dopo un periodo di incubazione da due a sei settimane, possono manifestarsi sintomi simili all'influenza con febbre, mal di testa e dolori articolari e ingrossamento dei linfonodi. Complicazioni quali miocardite, trombocitopenia o polineurite sono rare in individui immunocompetenti. Come per tutti gli herpes virus, l'infezione primaria comporta la persistenza dell'agente patogeno per tutta la vita.

In individui con immunodeficienze congenite o acquisite, oppure sotto terapia immunosoppressiva, l'infezione da HCMV può causare gravi complicazioni quali colite, epatite, polmonite o encefalite. I pazienti con trapianti, in caso di infezione o riattivazione di HCMV, sono a rischio di compromissione funzionale o addirittura di perdita del trapianto.

Un'infezione primaria da HCMV durante la gravidanza risulta particolarmente rischiosa, infatti, in caso di trasmissione transplacentare dell'agente patogeno, vi è il rischio di un'infezione congenita con danni notevoli e persino la morte del feto. Il rischio d'infezione fetale e l'entità dei danni, in tal caso, possono essere più o meno marcati a seconda del momento dell'infezione. Le infezioni da HCMV congenite possono provocare disturbi della crescita, deficit motori, microcefalia, disturbi neurologici con ritardo mentale e soprattutto problemi di udito o addirittura sordità. Oltre a questi, si osservano anche epatosplenomegalia, ittero, petecchie, calcificazioni intracerebrali e corioretinite. L'infezione da HCMV è considerata l'infezione congenita più comune.

Per la diagnosi di un'infezione da citomegalovirus sono disponibili metodi di determinazione diretta e indiretta. Nella diagnostica di routine, la determinazione indiretta di infezioni da citomegalovirus avviene mediante la rilevazione sierologica degli anticorpi IgG e IgM specifici di HCMV.

3 Principio del test *AESKULISA*®

AESKULISA® (AESKU *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) è una procedura immunologica che si è dimostrata particolarmente efficace per la rilevazione degli anticorpi. La reazione di determinazione si basa sull'interazione specifica di anticorpi e antigeni. A questo scopo, le strisce reattive delle piastre da microtitolazione del test *AESKULISA*® sono rivestite con antigeni specifici di agenti infettivi che legano gli anticorpi presenti nel campione del paziente. Ulteriori anticorpi secondari marcati con perossidasi rilevano gli immunocomplessi così formatisi. L'enzima catalizza una reazione durante la quale un tampone substrato incolore viene trasformato in un prodotto colorato. L'intensità del segnale del prodotto di reazione è proporzionale all'attività anticorpale nel campione e viene misurata con metodo fotometrico.

4 Antigeni

La determinazione degli anticorpi con il test *AESKULISA*® Cytomegalovirus IgG e IgM si basa sull'uso di citomegalovirus inattivati (ceppo AD_169). La determinazione degli anticorpi con il test *AESKULISA*® Cytomegalovirus gB IgG si basa sull'uso di una proteina di fusione ricombinante costituita da domini immunogenici AD2 delle glicoproteine B (gB) dei citomegalovirus.

5 Componenti del test *AESKULISA*®

Componente del test	Colore della soluzione	Colore del coperchio	Quantità / Volume
Strisce da microtitolazione separabili MP ciascuna con otto pozzetti rivestiti (per un totale di 96), 1 vassoio. Il materiale di rivestimento specifico del test è inattivato.	-	-	12 unità
Calibratori A - D CAL (pronti all'uso) Siero umano o anticorpo chimerico in soluzione proteica (BSA); colorati; conservante ProClin. L'attività anticorpale dei calibratori è indicata sulle loro etichette e sul certificato di controllo qualità del test *AESKULISA*®.	giallo*	bianco	4 da 1,5 ml
Controllo positivo CON + (pronto all'uso) Siero umano o anticorpo chimerico in soluzione proteica (BSA); colorati; conservante ProClin.	giallo*	rosso	1 da 1,5 ml
Controllo negativo CON – (pronto all'uso) Siero umano o anticorpo chimerico in soluzione proteica (BSA); colorati; conservante ProClin.	giallo*	verde	1 da 1,5 ml
Tampone di diluizione dei campioni SB 5x **conc. 5x** Soluzione proteica (BSA); colorato; conservante sodio azide < 0,1 %. Il tampone dei campioni per gli immunodosaggi *AESKULISA*® IgM contiene Rf-Absorbent.	IgG, IgA: giallo IgM: verde	bianco	1 da 20 ml

Tampone di lavaggio WASHB 50x **conc. 50x** Soluzione con Tween 20; colorato; conservante ProClin.	verde	bianco	1 da 20 ml
Coniugato anti IgA, IgG o IgM umane CONJ (pronto all'uso) Anticorpo policlonale diretto contro le IgA, IgG o IgM umane, coniugato con perossidasi di rafano, stabilizzato in soluzione proteica (BSA); colorato; conservante ProClin.	IgA: rosso IgG: blu IgM: verde	IgA: rosso IgG: blu IgM: verde	1 da 15 ml
Tampone substrato SUB (pronto all'uso) TMB/H_2O_2 stabilizzato.	incolore	nero	1 da 15 ml
Reagente bloccante STOP (pronto all'uso) 1 M di acido cloridrico (HCl).	incolore	bianco	1 da 15 ml
Certificato di controllo qualità	-	-	1 unità
Istruzioni per l'uso	-	-	1 unità

*L'intensità del colore aumenta con l'attività degli anticorpi.

6 Materiale aggiuntivo richiesto

- Normale attrezzatura da laboratorio con vetreria (cilindri graduati da 100-1000 ml), tubi per diluizioni, agitatore Vortex, micropipette (10, 100, 200, 500, 1000 µl) o multipipetta regolabile (100-1000 µl).
- Spettrofotometro per piastre da microtitolazione con filtro, lunghezza d'onda 450 nm, lunghezza d'onda di riferimento raccomandata nell'intervallo 600-690 nm (es. 620 nm)
- Dispositivo di lavaggio per piastre da microtitolazione
  (multipipetta da 300 µl, pipetta multicanale o sistema di lavaggio automatico)
- Carta da filtro
- *Acqua dist*.
  Gli immunodosaggi *AESKULISA*® sono stati sviluppati per utilizzo con acqua purificata (*purified water*) secondo la definizione della farmacopea U.S. (USP 26 - NF 21) ed europea (Eur. Ph. IV ed.).

7 Immagazzinamento e durata di conservazione

Le strisce da microtitolazione devono sempre essere conservate nella pellicola della confezione con una bustina di materiale igroscopico. Se conservati correttamente nella confezione originale e a 2-8 °C/35,6-46,4 °F), i reagenti e la piastra da microtitolazione sono stabili dopo l'apertura fino alla data di scadenza indicata. Le soluzioni diluite sono stabili per quattro settimane a 2-8 °C/35,6-46,4 °F).

8 Esecuzione del test *AESKULISA*®

8.1 Avvertenze generali

L'esatta osservanza delle istruzioni per l'uso garantisce risultati corretti. Per un corretto impiego degli immunodosaggi *AESKULISA*® utilizzare solo i reagenti *AESKULISA*®. Non sostituirli con reagenti di altri produttori.

Le piastre da microtitolazione, i calibratori, i controlli e i coniugati degli immunodosaggi *AESKULISA*® sono tarati per test e lotti specifici e non possono essere utilizzati con altri lotti. Le valutazioni dei calibratori e dei controlli sono indicate sul certificato di controllo qualità dell'immunodosaggio *AESKULISA*®. La soluzione di lavaggio, la soluzione del tampone substrato e il reagente bloccante possono essere combinati con tutti i gli immunodosaggi *AESKULISA*® indipendentemente dal test e dal lotto.

Il diluente del campione degli immunodosaggi *AESKULISA*® IgA e IgG può essere utilizzato con tutti gli immunodosaggi *AESKULISA*® IgA e IgG (codice articolo 6xxx) indipendentemente dal test e dal lotto. Il tampone di diluizione del campione degli immunodosaggi *AESKULISA*® IgM contiene Rf-Absorbent e può essere utilizzato con tutti gli immunodosaggi *AESKULISA*® IgM per sierologia infettiva (codice articolo 6xxx) indipendentemente dal test e dal lotto.

Al fine di evitare contaminazioni, per il prelievo dei reagenti è opportuno utilizzare sempre tecniche asettiche. Il coniugato e la soluzione del tampone substrato non devono mai essere pipettati con puntali contaminati da altri reagenti. La riproducibilità dei risultati dipende, tra l'altro, dall'accurata omogeneizzazione dei reagenti. Per questo motivo, le diluizioni del reagente e del campione devono essere accuratamente miscelate prima dell'uso. Una diluizione inadeguata può causare un calo di sensibilità nel rilevamento.

Inoltre, occorre garantire un'accurata tecnologia di pipettaggio e il rispetto dei tempi e delle temperature di incubazione specificati. Un lavaggio corretto previene le imprecisioni dei test.

Durante la conservazione e l'incubazione proteggere i reagenti dalla luce intensa. Evitare sempre l'esposizione a temperature superiori a 37 °C / 98,6 °F. Dopo l'uso, i reagenti devono essere chiusi ermeticamente per evitare la disidratazione e la contaminazione. Evitare di scambiare i tappi durante la chiusura dei flaconi.

Gli immunodosaggi *AESKULISA*® possono essere valutati solo se i criteri di validità sono stati soddisfatti.

8.2 Preparazione dei reagenti

Tutti i componenti e la piastra da microtitolazione devono essere portati a temperatura ambiente (20-25 °C/68-77 °F) prima della preparazione del test. I reagenti liquidi devono essere accuratamente miscelati. Per la diluizione dei concentrati tampone usare solo flaconi di vetro puliti.

8.2.1 Strisce da microtitolazione (pronte all'uso)

Le strisce da microtitolazione sono provviste di sigle che identificano l'antigene con cui sono rivestite.

8.2.2 Calibratori (pronti all'uso)

I calibratori CAL A - CAL D sono pronti all'uso e non devono essere diluiti. I calibratori devono essere eseguiti a ogni test, indipendentemente dal numero di strisce reattive utilizzate.

8.2.3 Controlli (pronti all'uso)

Il controllo positivo CON+ e il controllo negativo CON- sono pronti all'uso e non devono essere diluiti. I controlli devono essere eseguiti a ogni test, indipendentemente dal numero di strisce reattive utilizzate.

A seconda delle linee guida nazionali, i laboratori possono anche convalidare i propri controlli e utilizzarli in alternativa.

8.2.4 Tampone di diluizione dei campioni (conc. 5x)

Il tampone concentrato deve essere diluito 1:5 con acqua distillata (ad esempio 20 ml + 80 ml) prima dell'uso. Il tampone degli immunodosaggi *AESKULISA*® IgM contiene Rf-Absorbent.

8.2.5 Tampone di lavaggio (conc. 50x)

Il tampone di lavaggio concentrato deve essere diluito 1:50 con acqua distillata (ad esempio 20 ml + 980 ml) prima dell'uso.

8.2.6 Coniugato POD anti IgA, IgG o IgM umane (pronto all'uso)

Il coniugato è pronto all'uso.

8.2.7 Tampone substrato (pronto all'uso)

Il tampone substrato TMB deve essere sempre pipettato con puntali nuovi per evitare contaminazioni. Evitare di esporre la soluzione di tampone substrato alla luce intensa.

8.2.8 Reagente bloccante (pronto all'uso)

Il reagente bloccante è pronto all'uso.

8.3 Preparazione del campione

8.3.1 Materiale dei campioni

Si raccomanda l'uso di campioni freschi di siero o di plasma EDTA. Non usare campioni che presentino contaminazione itterica, lipemica, emolitica o batterica. I campioni contenenti particolato devono essere centrifugati (< 1000 x g) e il surnatante deve essere rimosso per un ulteriore utilizzo. I campioni non devono essere sottoposti a inattivazione termica.

8.3.2 Diluente per campioni

I campioni dei pazienti devono essere diluiti 1:101 (ad esempio 10 µl + 1000 µl) con tampone del campione 1x e miscelati accuratamente.

8.3.3 Assorbimento del fattore reumatoide con *AESKULISA*® IgM

I fattori reumatoidi (Rf) sono prevalentemente autoanticorpi della classe IgM, che si legano preferibilmente agli immunocomplessi IgG. La determinazione di anticorpi IgM specifici per gli agenti patogeni può portare a risultati falsi positivi dovuti a questi fattori reumatoidi. Inoltre, gli anticorpi IgM con un legame più debole e specifici per gli agenti patogeni potrebbero essere sostituiti da anticorpi IgG con un legame più forte. La determinazione delle IgM potrebbe quindi portare a un falso negativo. Per questo motivo, il tampone del campione degli immunodosaggi

AESKULISA® IgM contiene uno speciale Rf-Absorbent. L'assorbimento dei fattori reumatoidi avviene diluendo il campione del paziente in tampone del campione 1x dell'immunodosaggio *AESKULISA*® IgM e incubando per almeno 15 minuti a temperatura ambiente.

8.3.4 Conservazione dei campioni

I campioni dei pazienti devono essere utilizzati entro 8 ore e non devono essere conservati per più di 48 ore a 2-8 °C/35,6-46,4 °F. Per conservare i campioni più a lungo tenerli a ≤ -20 °C/-4 °F. Evitare il ripetuto scongelamento e congelamento.

8.4 Esecuzione del test

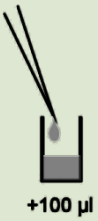
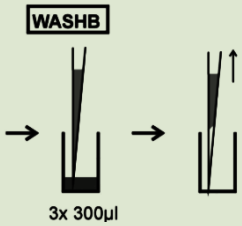
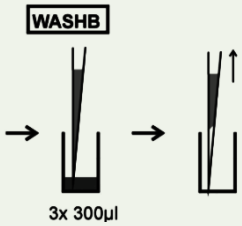
8.4.1 Schema di pipettamento

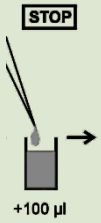
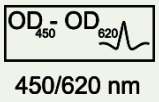
A seconda dell'impiego quantitativo o qualitativo previsto per l'immunodosaggio *AESKULISA*®, si raccomanda il seguente schema di pipettaggio:

	Impiego quantitativo						Impiego qualitativo				
	1	2	3	4			1	2	3	4	
A	CAL A	P3				A	CON–	P5			
B	CAL B	P4				B	CAL B	P6			
C	CAL C	P5				C	CAL B	…			
D	CAL D	P6				D	CON+				
E	CON–	…				E	P1				
F	CON+					F	P2				
G	P1					G	P3				
H	P2					H	P4				
	CAL A	Calibratore A					CON–	Controllo negativo			
	CAL B	Calibratore B					CAL B	Controllo *cut-off*			
	CAL C	Calibratore C					CON+	Controllo positivo			
	CAL D	Calibratore D									
	CON–	Controllo negativo									
	CON+	Controllo positivo									

8.4.2 Svolgimento del test

Inserire il numero di pozzetti richiesto nel vassoio e creare la scheda del protocollo.
Per la processazione manuale si consiglia di lavorare a temperatura ambiente.

Fase di lavoro	Simbolo	Descrizione
1. Aggiunta di calibratori, controlli e campioni diluiti		Aggiungere 100 µl di calibratori pronti all'uso, controlli e campioni diluiti a ogni pozzetto.
2. Incubazione del campione		Incubare per 30 +/- 3 minuti a 20-32 °C/68-89,6 °F
3. Lavare 3 volte		Aspirare il liquido dai pozzetti; aggiungere 300 µl di soluzione di lavaggio 1x per pozzetto, aspirare la soluzione di lavaggio e ripetere la procedura altre due volte; battere la piastra.
4. Aggiunta del coniugato		Aggiungere 100 µl di coniugato pronto all'uso per ogni pozzetto.
5. Incubazione del coniugato		Incubare per 30 +/- 3 minuti a 20-32 °C/68-89,6 °F
6. Lavare 3 volte		Aspirare il liquido dai pozzetti; aggiungere 300 µl di soluzione di lavaggio 1x per pozzetto, aspirare la soluzione di lavaggio e ripetere la procedura altre due volte; battere la piastra.
7. Aggiunta del tampone substrato		Aggiungere 100 µl di tampone substrato pronto all'uso per ogni pozzetto.

8. Incubazione del tampone substrato		Incubare per 30 +/- 3 minuti a 20-32 °C/68-89,6 °F, proteggere dalla luce intensa.
9. Aggiunta del reagente bloccante		Aggiungere 100 µl di reagente bloccante pronto all'uso per ogni pozzetto nella sequenza di aggiunta del tampone substrato.
10. Incubazione		Opzionale: incubare 5 minuti.
11. Miscelazione		Scuotere la piastra con cautela per 5 secondi.
12. Analisi		Misurare la densità ottica entro 30 minuti a 450 nm rispetto alla lunghezza d'onda di riferimento raccomandata di 620 nm.

8.5 Esecuzione con applicazione automatica

La processazione automatica degli immunodosaggi *AESKULISA*® è analoga all'applicazione manuale. Seguire la procedura specificata. Gli immunodosaggi *AESKULISA*® vengono valutati per l'uso con diversi strumenti; i relativi file sono disponibili su richiesta. Per la processazione automatica dei dosaggi immunoenzimatici *AESKULISA*® su altre macchine, si raccomanda di sottoporre il file di test alla valutazione del fornitore del kit in collaborazione con il fornitore dello strumento. La corretta processazione automatica degli immunodosaggi *AESKULISA*® deve essere convalidata dall'utente.

9 Valutazione di *AESKULISA*®

9.1 Standardizzazione

La calibrazione del test *AESKULISA*® Cytomegalovirus IgG e IgM e del test *AESKULISA*® Cytomegalovirus gB IgG è stata eseguita su sieri di riferimento interni. I risultati quantitativi sono indicati in U/ml.

9.2 Valutazione quantitativa

In linea di principio, per gli immunodosaggi *AESKULISA*® si raccomanda una valutazione quantitativa. Per generare la curva standard, i segnali di misura ottici (densità ottica, DO) dei calibratori sono valutati in funzione della loro attività anticorpale (in IU/ml o U/ml). Le attività anticorpali dei calibratori sono indicate sul certificato di controllo qualità specifico del lotto di test *AESKULISA*®. Per la valutazione si consiglia il metodo log/lin e un curve fit con logistica a 4

parametri (4 PL). Sulla base della curva generata, l'attività anticorpale corrispondente è derivata dai segnali ottici di misura dei campioni.

9.3 Intervallo dei valori limite

L'intervallo dei valori limite del l'immunodosaggio *AESKULISA*® è indicato sul certificato di controllo qualità e identifica gli intervalli dei risultati delle misurazioni borderline. Se la valutazione di un campione di un paziente si attesta al di sotto dell'intervallo dei valori limite il risultato del test è negativo; se la valutazione si attesta al di sopra dell'intervallo dei valori limite il risultato del test viene interpretato come positivo. A causa delle differenze nelle sieroprevalenze e nei programmi di vaccinazione dei singoli paesi, consigliamo di verificare l'intervallo dei valori limite con analisi condotte in proprio e, se necessario, di modificarlo.

9.4 Intervalli di misura

L'intervallo di misura dell'immunodosaggio *AESKULISA*® è indicato sul certificato di controllo qualità. Lo studio di valutazione delle prestazioni ha dimostrato la linearità di diluizione dei campioni e l'alta precisione e riproducibilità dei risultati delle misurazioni in questo intervallo. I campioni che danno risultati superiori all'intervallo di misura devono essere classificati >max. I campioni che danno risultati al di sotto dell'intervallo di misura devono essere classificati <min. Se i campioni dei pazienti superano l'intervallo di misura, possono essere rianalizzati con una diluizione maggiore. Per la quantificazione, le attività anticorpali ottenute vengono poi moltiplicate per il fattore di diluizione aggiuntivo.

9.5 Valutazione qualitativa

La valutazione qualitativa con gli immunodosaggi *AESKULISA*® avviene confrontando la densità ottica (DO) del campione del paziente con la densità ottica media del calibratore B applicato due volte (calibratore di *cut off* CAL B). Se la densità ottica del campione del paziente rientra nell'intervallo +/- 20 % della densità ottica media del calibratore di *cut off* CAL B, deve essere valutata come borderline. Nel caso di una DO superiore, il campione del paziente deve essere ritenuto positivo, nel caso di una DO inferiore negativo.

9.6 Criteri di validità

Affinché il test sia ritenuto valido, devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- DO CAL A < 0,3
- DO CAL A < DO CAL B < DO CAL C < DO CAL D < DO CAL D
- DO CAL D > 1,3
- Il controllo negativo deve risultare negativo.
- Il controllo positivo non deve risultare negativo.
- Per l'impiego quantitativo dell'immunodosaggio *AESKULISA*®, il controllo positivo deve rientrare nell'intervallo di validità indicato sul certificato di controllo qualità specifico del lotto di test *AESKULISA*®.
- Per l'impiego qualitativo dell'immunodosaggio *AESKULISA*®, i valori di DO del calibratore di *cut off* B (CAL B) eseguito due volte non devono differire di oltre il 20 %.

Se questi criteri non sono soddisfatti, il test non è valido e deve essere ripetuto.

Se il test risulta non valido, occorre controllare la data di scadenza dei reagenti (pronti all'uso), le condizioni di conservazione, i tempi e le temperature di incubazione, le pipette, il dispositivo di lavaggio, compresi i cicli di lavaggio, il fotometro e le altre apparecchiature utilizzate. Se nulla giustifica l'invalidità del test o si riscontrano altri risultati divergenti, contattare il fornitore o il fabbricante del kit.

9.7 Interpretazione dei risultati

Un immunodosaggio *AESKULISA*® positivo conferma la presenza di anticorpi specifici. Un risultato negativo mostra che nel campione del paziente non vi è alcuna attività anticorpale clinicamente rilevante contro l'agente patogeno, ma non esclude una nuova infezione. Nel caso di risultato borderline, non è possibile giungere a una valutazione certa del campione del paziente. In tal caso, il test deve essere ripetuto in parallelo con un nuovo campione di siero (coppia di sieri) prelevato a distanza di una o due settimane.

Un'infezione primaria da HCMV è solitamente associata alla formazione di anticorpi IgM e IgG e sieroconversione. L'attività IgG responsabile della protezione immunitaria di solito persiste per tutta la vita. Dopo un'infezione, l'attività degli anticorpi IgM di solito diminuisce di nuovo, tuttavia può persistere anche per diversi mesi. Pertanto, le determinazioni di IgM positive possono essere causate da IgM persistenti più a lungo, da riattivazioni di HCMV, da una precedente stimolazione policlonale, oppure anche da reazioni incrociate con anticorpi contro altri virus e da fattori reumatoidi. La determinazione sierologica di anticorpi IgM del citomegalovirus da sola dunque non è indicativa di un'infezione acuta da citomegalovirus. Una determinazione positiva di IgM deve quindi essere sempre chiarita da ulteriori indagini come la PCR, la determinazione dell'avidità, oppure anche la determinazione di anticorpi IgG diretti contro la glicoproteina B (gB AD2) di HCMV.

Nell'ambito di infezioni primarie da HCMV si osserva una formazione ritardata di anticorpi IgG contro la glicoproteina B (gB) di HCMV. Al contrario, gli anticorpi IgG diretti contro gB possono spesso essere determinati immediatamente nelle infezioni HCMV ricorrenti. L'assenza di anticorpi IgG diretti contro gB AD2 può quindi servire come indicatore per l'identificazione di donne in gravidanza a maggiore rischio di trasmissione transplacentare di HCMV, anche se va notato che circa il 20 % di tutti gli individui infettati da HCMV non sviluppano anticorpi IgG diretti contro gB.

Non si possono tuttavia escludere reazioni incrociate di anticorpi contro altri virus dell'herpes (per esempio HSV, EBV o VZV).

Schema di interpretazione di base dei risultati sierologici

HCMV Attività IgM	HCMV Attività IgG	HCMV gB Attività IgG	Valutazione
negativo	negativo	negativo	Non sono rilevabili anticorpi specifici. Se vi sono motivi di sospetto, si raccomanda un nuovo test dopo una o due settimane.
positivo	negativo / positivo	negativo	Indicazione di infezione HCMV acuta. Si raccomandano ulteriori indagini per conferma.
negativo	positivo	positivo	Indicazione di infezione HCMV pregressa / latente.

L'interpretazione dei risultati può avvenire solo in correlazione con il quadro clinico. Una diagnosi non dovrebbe basarsi esclusivamente sui risultati del test eseguito, ma deve essere formulata tenendo in considerazione tutti i riscontri clinici e di laboratorio. Sono inoltre consigliabili ulteriori indagini per conferma.

10 Caratteristiche delle prestazioni di *AESKULISA*®

10.1 Sensibilità e specificità analitiche

Il limite di bianco (LoB) è stato valutato mediante analisi multiple di pozzetti contenenti solo il tampone del campione. Il limite di rivelabilità (LoD) è stato valutato mediante analisi multiple di campioni negativi.

	Limite di bianco (LoB)	Limite di rivelabilità (LoD)
AESKULISA® Cytomegalovirus IgG	0,09 U/ml	1,73 U/ml
AESKULISA® Cytomegalovirus IgM	0,11 U/ml	0,64 U/ml
AESKULISA® Cytomegalovirus (gB) IgG	0,69 U/ml	2,50 U/ml

La specificità analitica degli immunodosaggi *AESKULISA*® è stata studiata aggiungendo ai campioni sostanze potenzialmente interferenti e determinandone l'influenza sui risultati delle analisi. Non è stato possibile determinare un'influenza significativa di emoglobina (fino a 800 mg/dl), bilirubina (fino a 20 mg/dl), coniugato di bilirubina (fino a 20 mg/dl) e trigliceridi (fino a 3000 mg/dl) sui risultati delle analisi.

10.2 Sensibilità e specificità diagnostica

Per determinare la sensibilità e la specificità degli immunodosaggi *AESKULISA*® Cytomegalovirus IgG e IgM, sono stati analizzati rispettivamente 180 sieri di donatori di sangue e persone con sospetta infezione da citomegalovirus; i risultati sono stati confrontati con quelli degli immunodosaggi IgG e IgM del citomegalovirus di un importante competitor europeo.

Per il calcolo della specificità dell'immunodosaggio *AESKULISA*® Cytomegalovirus gB IgG, sono stati analizzati 100 campioni di siero di madri sieronegative al CMV con sintomatologia clinica non evidente al momento della nascita dei loro bambini. I risultati sono stati confrontati con quelli dell'immunodosaggio Cytomegalovirus IgG di un importante competitor europeo.

La determinazione della sensibilità dell'immunodosaggio *AESKULISA*® Cytomegalovirus gB IgG avvenuta mediante l'analisi di 101 campioni di siero di donne in gravidanza con infezione latente da CMV, in cui è stata osservata una reazione positiva contro l'antigene gB2 nell'immunoblot di un importante produttore europeo. Nell'ambito di questa analisi non si sono osservati sieri con segnale isolato contro gB1 e segnale negativo contro gB2.

	Sensibilità	Specificità
AESKULISA® Cytomegalovirus IgG	97,8 %	97,7 %
AESKULISA® Cytomegalovirus IgM	> 99 %	98,1 %
AESKULISA® Cytomegalovirus (gB) IgG	> 99 %	93,6 %

Per il calcolo della sensibilità e della specificità non sono stati presi in considerazione i risultati classificati come borderline.

10.3 Valori attesi

L'analisi dei sieri di donatori di sangue non selezionati con *AESKULISA*® Cytomegalovirus IgG e IgM e con *AESKULISA*® Cytomegalovirus gB IgG ha mostrato la seguente distribuzione:

AESKULISA®	Numero di campioni	negativo	borderline	positivo
Cytomegalovirus IgG	100	30 (30,0 %)	0 (0,0 %)	70 (70,0 %)
Cytomegalovirus IgM	100	96 (96,0 %)	3 (3,0 %)	1 (1,0 %)
Cytomegalovirus gB IgG	100	46 (46,0 %)	3 (3,0 %)	51 (51,0 %)

10.4 Ripetibilità

Per determinare la precisione e la riproducibilità dei risultati delle analisi con *AESKULISA*® Cytomegalovirus IgG e IgM e con *AESKULISA*® Cytomegalovirus gB IgG, sono state determinate la varianza intra e inter-dosaggio e la varianza da lotto a lotto con più campioni di attività anticorpale diversa.

AESKULISA® Cytomegalovirus IgG

Campione	Estinzione (DO)	Attività IgG	Intra-test CV (U/ml)	Inter-test CV (U/ml)	CV (U/ml) da lotto a lotto
Siero 1	0,259	3,5 U/ml	5,6 %	18,1 %	20,5 %
Siero 2	0,832	19,4 U/ml	5,8 %	14,1 %	10,8 %
Siero 3	1,474	54,0 U/ml	7,2 %	11,6 %	6,6 %
Siero 4	1,688	72,4 U/ml	8,8 %	14,9 %	13,4 %
Siero 5	1,704	73,6 U/ml	6,6 %	10,3 %	7,8 %

AESKULISA® Cytomegalovirus IgM

Campione	Estinzione (DO)	Attività IgM	Intra-test CV (U/ml)	Inter-test CV (U/ml)	CV (U/ml) da lotto a lotto
Siero 1	0,419	7,0 U/ml	4,5 %	6,8 %	6,6 %
Siero 2	0,882	19,7 U/ml	5,9 %	6,3 %	6,5 %
Siero 3	1,098	27,8 U/ml	4,8 %	5,6 %	9,1 %
Siero 4	1,559	52,6 U/ml	5,4 %	7,7 %	10,3 %
Siero 5	1,627	57,4 U/ml	5,4 %	6,4 %	9,7 %

AESKULISA® Cytomegalovirus gB IgG

Campione	Estinzione (DO)	Attività IgG	Intra-test CV (U/ml)	Inter-test CV (U/ml)	CV (U/ml) da lotto a lotto
Siero 1	0,322	5,2 U/ml	2,7 %	10,8 %	15,6 %
Siero 2	0,746	17,8 U/ml	3,8 %	7,2 %	9,3 %
Siero 3	1,237	38,5 U/ml	5,7 %	7,4 %	8,5 %
Siero 4	1,592	57,7 U/ml	3,9 %	10,3 %	11,9 %
Siero 5	2,588	138,0 U/ml	3,7 %	14,5 %	14,9 %

Relazioni di studio più complete sulle caratteristiche prestazionali aggiuntive come la sensibilità analitica, la specificità analitica, l'esattezza, la precisione, l'accuratezza, il recupero, la linearità, i limiti di rivelabilità e l'intervallo di misurazione sono disponibili su richiesta.

11 Istruzioni di sicurezza

11.1 Avvertenze e precauzioni

Gli immunodosaggi *AESKULISA*® sono destinati esclusivamente alla diagnostica *in vitro* e solo a personale qualificato con una perfetta padronanza delle tecniche di lavoro. La manipolazione dei reagenti e dei campioni dei pazienti è disciplinata dalla buona pratica di laboratorio riconosciuta. Se il prodotto è danneggiato o se le informazioni sul prodotto, compresa l'etichettatura, sono errate, contattare il fabbricante o il fornitore del kit.

Non pipettare con la bocca. Nelle aree in cui vengono utilizzati i reagenti o i campioni dei pazienti evitare di mangiare, bere o fumare. Quando si maneggiano i reagenti e i campioni dei pazienti, evitare il contatto diretto indossando camici da laboratorio, guanti monouso e occhiali di sicurezza. In seguito lavarsi accuratamente le mani.

Il prodotto contiene diluizioni di sieri umani. Sebbene tutti i sieri utilizzati siano risultati negativi per gli anticorpi anti-HIV 1 e 2, per HBsAg (antigene di superficie del virus dell'epatite B) e per gli anticorpi anti-HCV, devono essere considerati potenzialmente infettivi. Il prodotto contiene anche componenti di origine animale. Nell'uso devono essere rispettate le direttive nazionali.

I singoli componenti del kit contengono reagenti potenzialmente pericolosi che possono causare irritazione agli occhi e alla pelle.

I singoli componenti contengono azoturo di sodio (NaN_3) come conservante. L'azoturo di sodio può risultare tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi. Combinato con piombo o tubi di rame può formare azoturi metallici altamente esplosivi. Per evitare concentrazioni di azoturo, smaltire queste soluzioni insieme ad abbondante acqua.

I calibratori e i controlli nonché i campioni dei pazienti devono essere classificati come potenzialmente infettivi e trattati in conformità alle linee guida nazionali. I campioni dei pazienti e tutti i materiali potenzialmente infettivi devono essere decontaminati dopo l'esecuzione del test.

Tenere i reagenti fuori dalla portata dei bambini.

Qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo deve essere segnalato al fabbricante e all’autorità competente dello Stato membro in cui risiede l’utilizzatore e/o il paziente.

Un documento di sintesi sulla sicurezza e le prestazioni cliniche è disponibile tramite Eudamed e su richiesta.

11.2 Smaltimento

Per la decontaminazione e lo smaltimento, osservare le raccomandazioni del CDC e le disposizioni di legge locali e nazionali vigenti.

12 Bibliografia

Enders, G. (2006) Labormedizinische Aspekte bei Zytomegalie und Toxoplasmose. Gynäkologie + Geburtshilfe *1*, 24 – 8.

Hamprecht, K. (2014) Zytomegalie. AWMF-Leitlinie zur Labordiagnostik schwangerschafts-relevanter Virusinfektionen.

Rothe, M. *et al*. (2001) An antigen fragment encompassing the AD2 domains of glycoprotein B from two different strains is sufficient for differentiation of primary vs. recurrent human cytomegalovirus infection by ELISA. J. Med. Virol. *65*, 719 – 29.

Schoppel, K. *et al.* (1997). The humoral immune response against human CMV is characterized by a delayed synthesis of glycoproteinspecific antibodies. J. Inf. Dis. *175*, 533 – 44.

13 Simboli normativi

IVD	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In Vitro Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
REF	- Numero d'ordine	- Cataloge number
	- Référence Catalogue	- Numéro de catálogo
	- Bestellnummer	- Αριθμός παραγγελίας
	- Número de catálogo	
LOT	- Descrizione lotto	- Lot
	- Lot	- Lote
	- Chargen Bezeichnung	- Χαρακτηρισμός παρτίδας
	- Lote	
UDI	- Identificatore univoco del dispositivo	- Unique Device Identifier
	- Identifiant unique de l'appareil	- Identificador único del dispositivo
	- eindeutige Produktidentifizierung	- Μοναδικό αναγνωριστικό συσκευής
	- Identificador único do dispositivo	
CE	- Conformità europea	- EC Declaration of Conformity
	- Déclaration CE de Conformité	- Declaración CE de Conformidad
	- Europäische Konformität	- Ευρωπαϊκή συμφωνία
	- Déclaracão CE de Conformidade	
Σ 96	- 96 determinazioni	- 96 tests
	- 96 tests	- 96 pruebas
	- 96 Bestimmungen	- 96 προσδιορισμοί
	- 96 Testes	
	- Rispettare le istruzioni per l'uso	- See instructions for use
	- Voir les instructions d'utilisation	- Ver las instrucciones de uso
	- Gebrauchsanweisung beachten	- Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	- Ver as instrucões de uso	
	- Da utilizzarsi entro	- Use by
	- Utilise avant le	- Utilizar antes de
	- Verwendbar bis	- Χρήση μέχρι
	- Utilizar antes de	
+2°C +8°C	- Conservare a 2-8°C / 35,6-46,4 °F	- Store at 2-8°C / 35.6-46.4 °F
	- Conserver à 2-8°C / 35,6-46,4 °F	- Conservar a 2-8°C / 35,6-46,4 °F
	- Lagerung bei 2-8°C / 35,6-46,4 °F	- Φυλάσσεται στους 2-8°C / 35,6-46,4 °F
	- Conservar entre 2-8°C / 35,6-46,4 °F	
	- Prodotto da	- Manufactured by
	- Fabriqué par	- Fabricado por
	- Hergestellt von	- Κατασκευάζεται από
	- Fabricado por	
CO-CAL	- Calibratore cut-off	- Cut off Calibrator
	- Etalon Seuil	- Calibrador de cut-off
	- Grenzwert Kalibrator	- Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	- Calibrador de cut-off	
CON +	- Controllo positivo	- Positive Control
	- Contrôle Positif	- Control Positivo
	- Positiv Kontrolle	- Θετικός ορός ελέγχου
	- Controlo positivo	
CON −	- Controllo negativo	- Negative Control
	- Contrôle Négatif	- Control Negativo
	- Negativ Kontrolle	- Αρνητικός ορός ελέγχου
	- Controlo negativo	
CAL	- Calibratore	- Calibrator
	- Etalon	- Calibrador
	- Kalibrator	- Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	- Calibrador	
CONJ	- Coniugato	- Conjugate
	- Conjugé	- Conjugado
	- Konjugat	- Σύζευγμα
	- Conjugado	
MP	- Micropiastra rivestita	- Coated microtiter plate
	- Microplaque sensibilisée	- Microplaca sensibilizada
	- Beschichtete Mikrotiterplatte	- Επικαλυμμένη μικροπλάκα
	- Microplaca revestida	
WASHB 50x	- Tampone di lavaggio	- Wash buffer
	- Tampon de Lavage	- Solución de lavado
	- Waschpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	- Solucão de lavagem	
SUB	- Tampone substrato	- Substrate buffer
	- Substrat	- Tampón sustrato
	- Substratpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	- Substrato	
STOP	- Reagente bloccante	- Stop solution
	- Solution d'Arrêt	- Solución de parada
	- Stopreagenz	- Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
	- Solucão de paragem	
SB 5x	- Tampone campione	- Sample buffer
	- Tampon Echantillons	- Tampón Muestras
	- Probenpuffer	- Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	- Diluente de amostra	