

Incontro di aggiornamento

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRA_s)
NELLA DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLE
MALATTIE INFETTIVE

19 aprile 2013
Trento

IGRA_s TEST NELLA DIAGNOSI
DELL'INFEZIONE DA CMV

Dott.ssa Angela Chiereghin

U.O. Microbiologia
Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna
Policlinico S. Orsola-Malpighi

RISCHIO DI INFEZIONE E MALATTIA DA CMV IN SOGGETTI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO

L'infezione da CMV rappresenta una delle più comuni infezioni opportunistiche ad eziologia virale nei pazienti sottoposti a trapianto → 44% - 85%

GRAFT	RISCHIO DI INFEZIONE	RISCHIO DI MALATTIA
RENE	8 – 32 %	8 %
CUORE	9 – 35 %	25 %
FEGATO	22 – 29%	29 %
POLMONE CUORE/POLMONE	39 – 41 %	39 %
PANCREAS RENE/PANCREAS	50 %	50 %
CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE	20-35%	15 %

Mc Devitt LM, American Journal of Health-System Pharmacy 2006; 63:S3-S9

→ nel 30-50% dei casi in assenza di strategie di profilassi o di terapia pre-emptive ha ripercussione clinica di varia entità

INFEZIONE DA CMV

SISTEMA IMMUNITARIO dell'ospite:

IMMUNITA' INNATA → immunità umorale non specifica: sistema del complemento/immunità cellulare non-specifica: neutrofili, eosinofili, monociti e cellule natural killers

IMMUNITA' ADATTATIVA → risposta immunitaria specifica umorale e **cellulo-mediata**

CMV → utilizza una serie di strategie per evadere le difese immunitarie dell'ospite

CMV persiste a lungo nell'ospite immunocompetente senza raggiungere elevati livelli di replicazione

Nel soggetto immunocompetente → l'infezione non comporta lo sviluppo di quadri clinico-patologici particolari

Soggetto nel quale il sistema immunitario → motivi fisiologici, farmacologici, patologici → non risponde adeguatamente agli stimoli antigenici



STRATEGIE DI PREVENZIONE

PROFILASSI → tutti i pazienti indipendentemente dal rischio
→ solo pazienti a rischio (D+/R-, trapianto di polmone, intestino, pancreas etc.)

TERAPIA PRE-EMPTIVE → pazienti a rischio di insorgenza di malattia, identificati precocemente mediante il ritrovamento di carichi virali elevati nei campioni biologici

MONITORAGGIO DELL'INFEZIONE DA CMV NEL PAZIENTE TRAPIANTATO D'ORGANO SOLIDO

MONITORAGGIO VIROLOGICO : PCR Real-Time - DNAemia

MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO :

Test diagnostici che permettano di analizzare le diverse proprietà funzionali dei linfociti T CMV-specifici e correlarle al controllo dell'infezione

Diversi metodi di laboratorio



Rilevazione della citochina Interferon- γ secreta dai linfociti T dopo stimolazione in vitro con specifici antigeni virali

**INTERFERON GAMMA RELEASE
ASSAYS -IGRA_s- TEST**

MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO

TABLE 2. Advantages and limitations of various assays for immune monitoring of CMV

Assay	Advantages	Limitations	Comments	Predict viremia	Predict disease
Intracellular cytokine staining	Whole-blood assay with low blood volume (1 mL) or PBMC Short incubation time Results available within 24 hr Knowledge of HLA not necessarily required Identification of CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells Quantitative and qualitative characterization	Needs access to a flow cytometer Not standardized	Most data available with this technique Potential to freeze PBMCs and ship to reference laboratory for testing	Yes	Yes
QuantiFERON-CMV (Cellestis Inc.)	Whole-blood assay with low blood volume (3 mL) Simple to perform Results available after 30–40 hr Can be performed in any center and stimulated plasma could be sent to reference laboratory	CD8 ⁺ responses only Sensitive to lymphopenia Rare patients whose HLA types are not covered in assay	Approved in Europe	No data	Yes
ELISPOT	Identifies both CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T cells Knowledge of HLA not necessarily required	Need for purified PBMC from at least 10 mL blood Cannot differentiate CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells	Potential to freeze PBMCs and ship to reference laboratory for testing	No	Yes
MHC multimer staining	Results available within 30–40 hr Fast assay (1–2 hr) Whole-blood assay with low blood volume (0.5–1 mL) or PBMC	Not standardized CD8 ⁺ responses only Needs access to a flow cytometer HLA and epitope specific No information about function unless combined with ICS Not standardized	Unlikely to be used on a widespread basis	No	No
Cylex ImmunKnow	CD4 ⁺ response	Not specific for CMV	Commercially available in United States	No	No

PBMC, peripheral blood monocyte cell; HLA, human leukocyte antigen; CMV, cytomegalovirus; MHC, major histocompatibility complex.

International consensus guidelines on the management of Cytomegalovirus in solid organ transplantation Transplantation 2010;89: 779–795

QuantiFERON[®]-CMV cellestis



QuantiFERON[®]-CMV è una metodica per la valutazione della risposta immunitaria cellulo T CD8+ - mediata CMV specifica

Tale test immunoenzimatico rileva la capacità dei linfociti T CD8+ CMV-specifici di secernere Interferon- γ (INF- γ) in seguito a stimolazione antigenica *in vitro* con antigeni di CMV

L'utilizzo del test QuantiFERON[®]-CMV è previsto per il monitoraggio del livello di immunità CMV-specifica in soggetti a rischio di sviluppare malattia da CMV

PRELIEVO DEI CAMPIONI



QFN-CMV peptidi

QuantiFERON®-CMV

3 provette eparinizzate → 1 ml sangue intero/provetta

- ❖ controllo nullo (tappo grigio)
- ❖ controllo mitogeno (tappo viola)
- ❖ antigene CMV:
(tappo blu)
- ✓ 22 peptidi
- ✓ 6 proteine di CMV
- ✓ linfociti T CD8+
- ✓ 20 HLA classe I
- ✓ copertura > 98% della popolazione umana

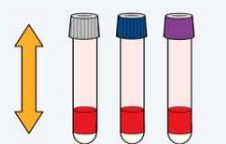
Peptide	Sequenza	Proteina	Restrizione HLA
1	VTEHDITLLY	pp58	A1
2	VLEETSWML	IE-1	A2
3	NLVPMTATV	pp65	A2
4	IMREFNSYK	gB	A3
5	AYAQKIFKL	IE-1	A23 & A24
6	QYDPVAALF	pp65	A24
7	DIYRIFAEL	pp65	A26
8	TPRVTGGGAM	pp65	B7
9	QIKRVDMV	IE-1	B8
10	ARVYEIKOR	pp28	B27
11	CPSQEPMSIYY	pp65	B35
12	ELRRKMMYM	IE-1	B8
13	FEQPTETPP	IE-2	B41
14	QEFFWDANDI	pp65	B44
15	QAIREVEL	pp65	B57 & B58
16	QMWQARLTV	pp65	B52
17	PTFTSQYRIQGL	pp65	A24
18	GPISGHMLK	pp65	A11
19	DALPGPCI	pp65	B51
20	KMQVIGDQY	pp65	B40/B60
21	CEDVPSGKL	pp65	B40/B60
22	TRATKMQVI	pp65	Cw6 (A30/B13)

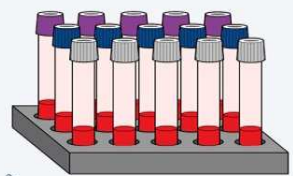
QuantiFERON[®]-CMV

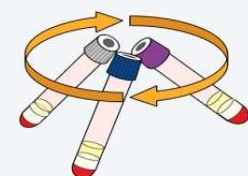
QuantiFERON[®]-CMV

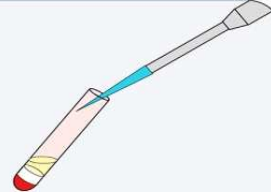
Assay Quick Reference Guide

Part 1. Blood Incubation and Harvesting

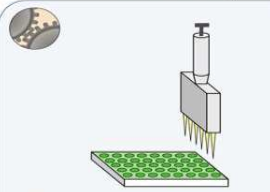
Step 1.  After blood collection, mix the QuantiFERON[®] tubes thoroughly, by shaking vigorously for 5 seconds.

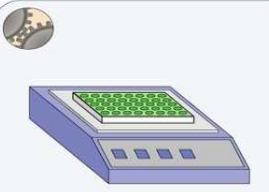
Step 2.  As soon as possible, and within 16 hours of collection, incubate tubes upright at 37°C for 16-24 hours.

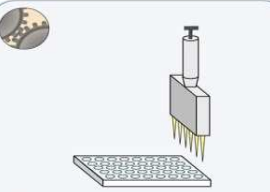
Step 3.  Centrifuge tubes at 2000-3000 g (RCF) for 15 minutes.

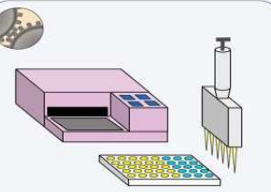
Step 4.  Harvest at least 200 µL plasma from each tube. Store in racked microtubes or uncoated microplates.

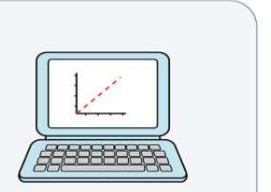
Part 2. Human IFN-γ ELISA

Step 5.  Add 50 µL of working conjugate to each well. Add 50 µL of plasma or standard.

Step 6.  Shake covered plate for 1 min. Incubate for 120 minutes at room temperature.

Step 7.  Wash plate ≥ 6 times. Add 100 µL of substrate. Incubate 30 min. at room temperature.

Step 8.  Add 50 µL of stop solution. Read absorbance within 5 min. at 450 nm (620-650 nm ref).



Step 9.  Calculate results using QuantiFERON[®]-CMV Analysis Software.

For comprehensive instructions, please refer to the QuantiFERON[®]-CMV Package Insert

North America / South America
Email: customer.service@cellestis.com
Tel: +1 661 775 7480
Toll free: 800 519 4627 (USA only)
Fax: +1 661 775 7479

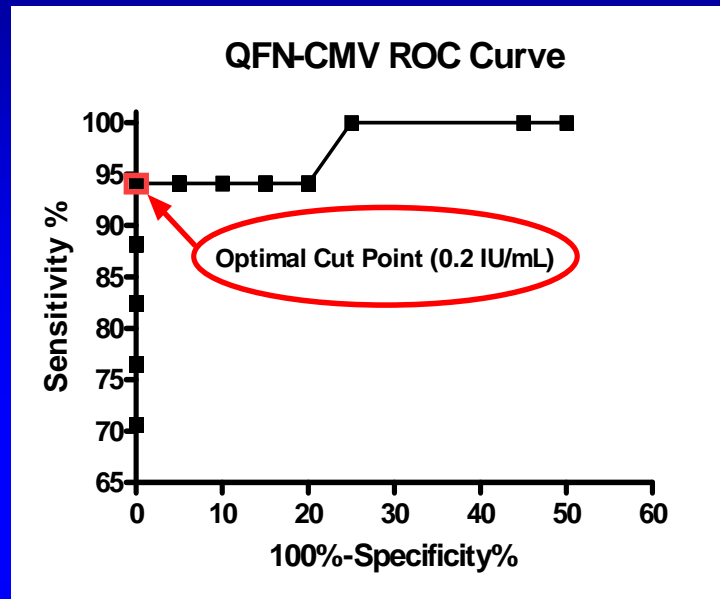
Europe / Middle East / Africa
Email: europe@cellestis.com
Tel: +49 6151 428 59 0
Fax: +49 6151 428 59 110

Asia / Oceania
Email: quantiferon@cellestis.com
Tel: +61 3 9571 3500
Fax: +61 3 9571 3544

 Step not required with automation.
 Step can be automated.

QuantiFERON®-CMV

INTREPRETAZIONE DEI RISULTATI



<u>Cut-off</u>	<u>N° Pos</u>	<u>Se</u>	<u>N° Neg</u>	<u>Sp</u>	<u>Total</u>
0	17	100.0%	10	50.0%	150.0%
0.01	17	100.0%	11	55.0%	155.0%
0.02	17	100.0%	15	75.0%	175.0%
0.03	16	94.1%	16	80.0%	174.1%
0.07	16	94.1%	17	85.0%	179.1%
0.11	16	94.1%	18	90.0%	184.1%
0.12	16	94.1%	19	95.0%	189.1%
0.2	16	94.1%	20	100.0%	194.1%
0.3	15	88.2%	20	100.0%	188.2%
0.61	14	82.4%	20	100.0%	182.4%
1.37	13	76.5%	20	100.0%	176.5%
1.54	12	70.6%	20	100.0%	170.6%

CMV meno nullo [UI/ml]	Mitogeno meno nullo [UI/ml]	Risultato QFN-CMV	Interpretazione
< 0,2	< 0,5	INDETERMINATO	Risultato INDETERMINATO per la risposta al CMV
< 0,2	≥ 0,5	NON reattivo	Immunità cellulare CMV-specifica NON rilevata
≥ 0,2	qualsiasi	REATTIVO	Immunità cellulare CMV-specifica RILEVATA

POPOLAZIONE IN STUDIO

32 PAZIENTI TRAPIANTATI DI CUORE

STUDIO DI POPOLAZIONE	Pazienti TOTALI n = 32	Gruppo PRE-EMPTIVE n = 17	Gruppo PROFILASSI n = 15
ETA'	52.5 anni range 19-68	54.4 anni range 30-63	50.3 range 19-68
Rapporto M/F	24/8	14/3	10/5
Sierostato CMV Donatore/Ricevente			
D+/R-	0	0	0
D-/R+	4	2	2
D+/R+	28	15	13

POPOLAZIONE IN STUDIO

32 PAZIENTI TRAPIANTATI DI CUORE

	Gruppo PRE-EMPTIVE n = 17	Gruppo PROFILASSI n = 15
TERAPIA ANTIVIRALE valganciclovir/os	900mg/Kg/12 ore	900mg/Kg/12 ore
Durata della profilassi	NO	3 MESI
Fase di induzione con timoglobuline	SI	SI
Terapia immunosoppressiva		
ciclosporina	SI	SI
everolimus	8 pazienti	7 pazienti
micofenolato mofetile	9 pazienti	8 pazienti
cut-off CMV DNAemia terapia antivirale	10.000 copie/ml sangue intero	20.000 copie/ml sangue intero

MONITORAGGIO VIROLOGICO E IMMUNOLOGICO
1 ANNO POST-TRAPIANTO 32 PAZIENTI TRAPIANTATI DI CUORE



SCOPO dello STUDIO

- ❖ Valutare l'andamento della risposta cellulo T CD8+ - mediata CMV-specifica con il test QuantiFERON[®]-CMV
- ❖ Fornire informazioni addizionali circa il rischio di infezione e lo sviluppo di malattia da CMV

MONITORAGGIO VIROLOGICO

PCR Quantitativa Real-Time per CMV (Nanogen Advanced Diagnostics SRL, Italy)

→ campioni di sangue:

- ❖ 2 volte/settimana → 1° mese
- ❖ 1 volta/settimana → fino al 4° mese
- ❖ 2 volte/mese → fino al 6° mese
- ❖ dopo il 6° mese → cadenza mensile fino alla fine del primo anno

MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO

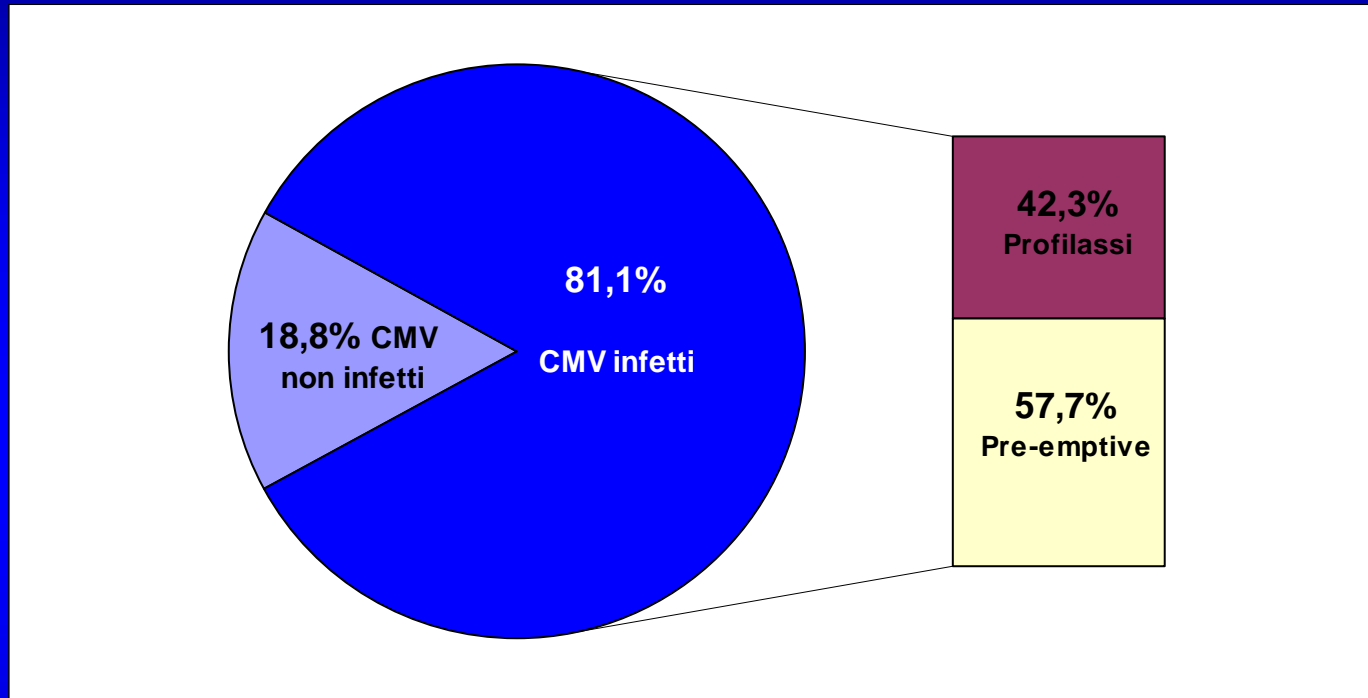
QuantiFERON®-CMV assay (Cellestis-Qiagen, Melbourne, Australia)

→ campioni di sangue → 6 specifici Time points:

- ❖ T0 → pre-trapianto
- ❖ Tbio → prima biopsia
- ❖ T1, T3, T6, T12 → 1, 3, 6, 12 mesi post-trapianto

RISULTATI

INCIDENZA DELL'INFEZIONE DA CMV NELLA POPOLAZIONE IN STUDIO



- ❖ NO infezione da CMV post-trapianto → 6/32 pazienti (18,8%)
- ❖ SI' infezione da CMV post-trapianto → 26/32 pazienti (81,2%)

- ❖ Profilassi: 11/26
- ❖ Pre-emptive: 15/26

PROFILASSI vs PRE-EMPTIVE INFEZIONE DA CMV POST-TRAPIANTO

	Numero di pazienti	Pazienti con infezione da CMV	Insorgenza dell'infezione giorni post-TX MEDIANA
Profilassi	15	11 (73,3%)	129
Pre-emptive	17	15 (88%)	29
Totale	32	26	
<i>P Value</i>			0.04

- ✓ Gruppo PROFILASSI → minor frequenza dell'infezione da CMV
- ✓ Vi è una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi nel tempo di insorgenza dell'infezione

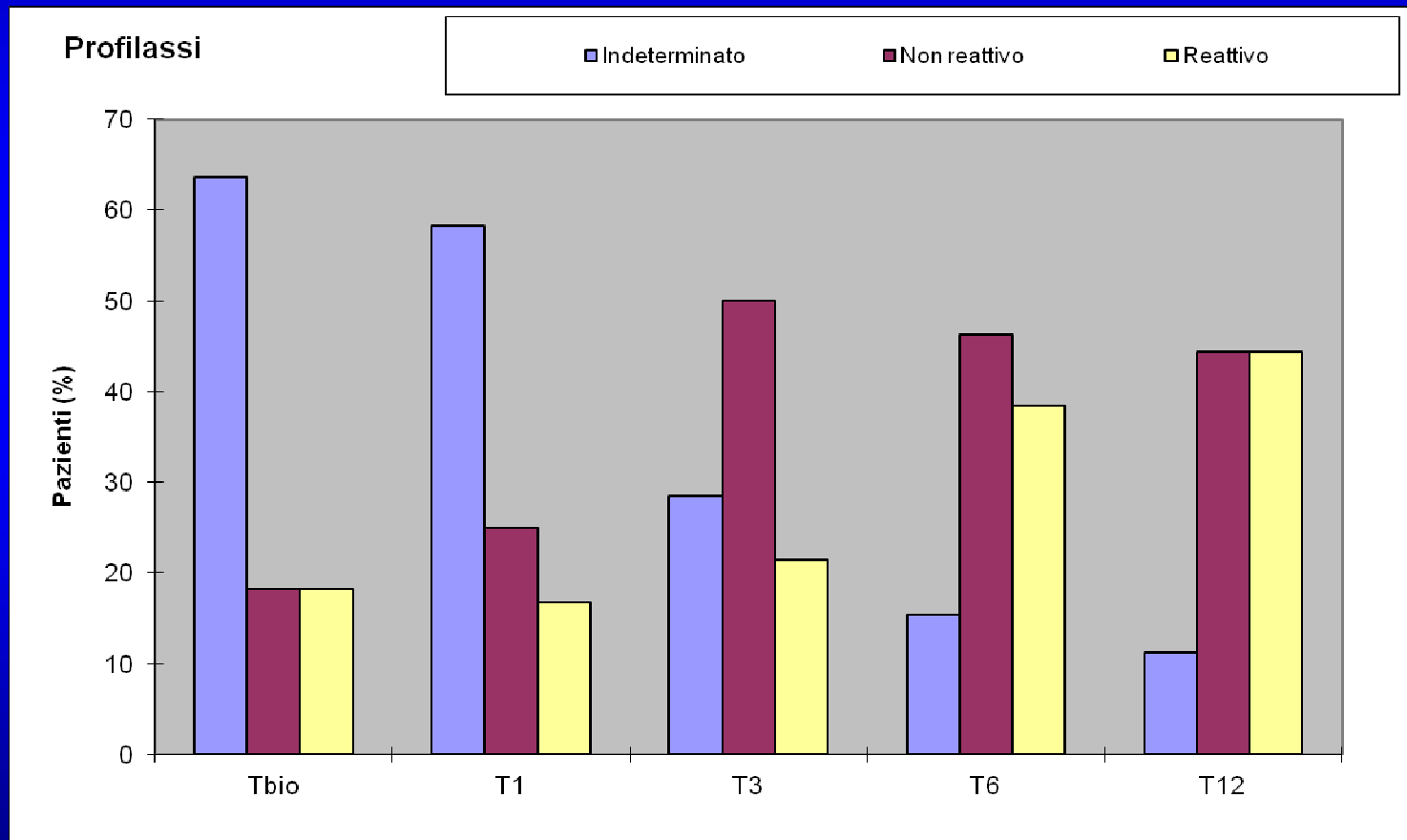
PROFILASSI vs PRE-EMPTIVE INCIDENZA DELL'INFEZIONE DA CMV POST-TRAPIANTO

	NUMERO DI PAZIENTI TOTALI	PAZIENTI CON INFEZIONE DA CMV			
		MESI POST-TX			
		1-3	4-6	7-12	Fine primo anno
PROFILASSI	15	5 (33,3%)	9 (60%)	2 (13%)	0
PRE-EMPTIVE	17	14 (82,3%)	11 (64,7%)	4 (23%)	0

RISULTATI

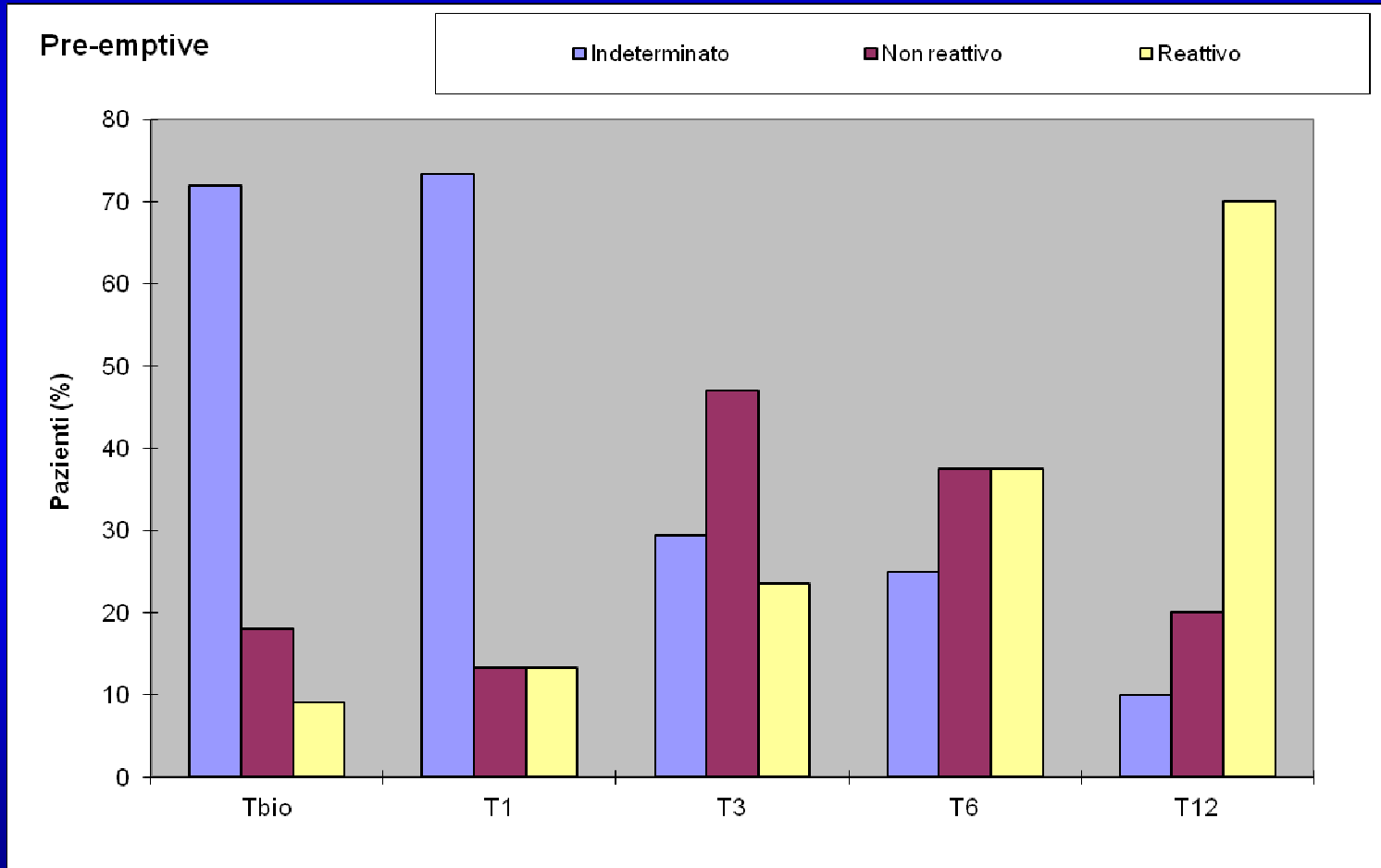
MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO QuantiFERON[®]-CMV

GRUPPO PROFILASSI



MONITORAGGIO IMMUNOLOGICO - QuantiFERON®-CMV

GRUPPO PRE-EMPTIVE



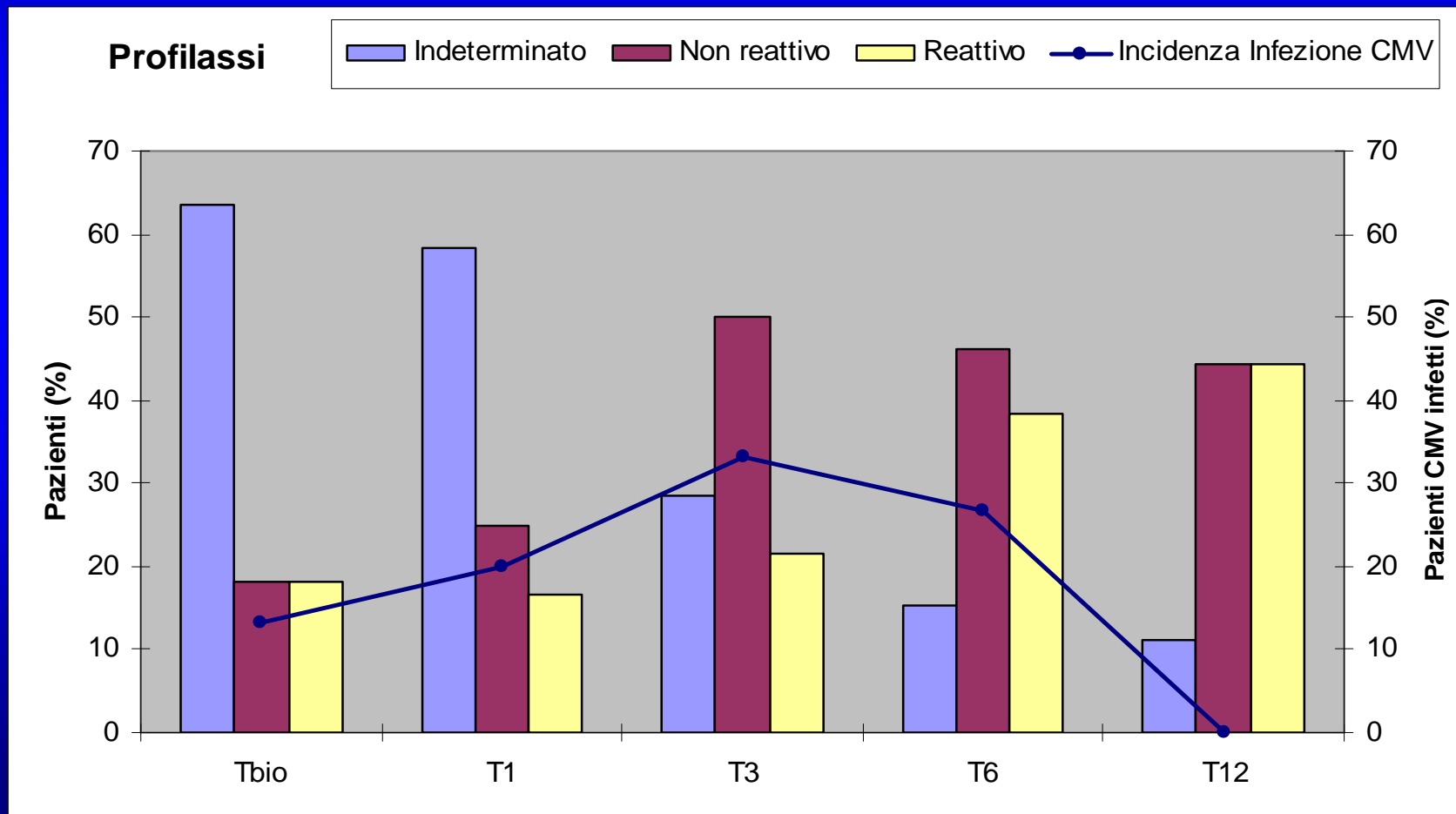
DETERMINAZIONE QuantiFERON®-CMV PRE-TRAPIANTO (T0)

6 PAZIENTI/32

RISULTATO QuantiFERON®-CMV	PROFILASSI n = 3	PRE-EMPTIVE n = 3	TOT
INDETERMINATO	2	2	4
NON REATTIVO	1	0	1
REATTIVO	0	1	1

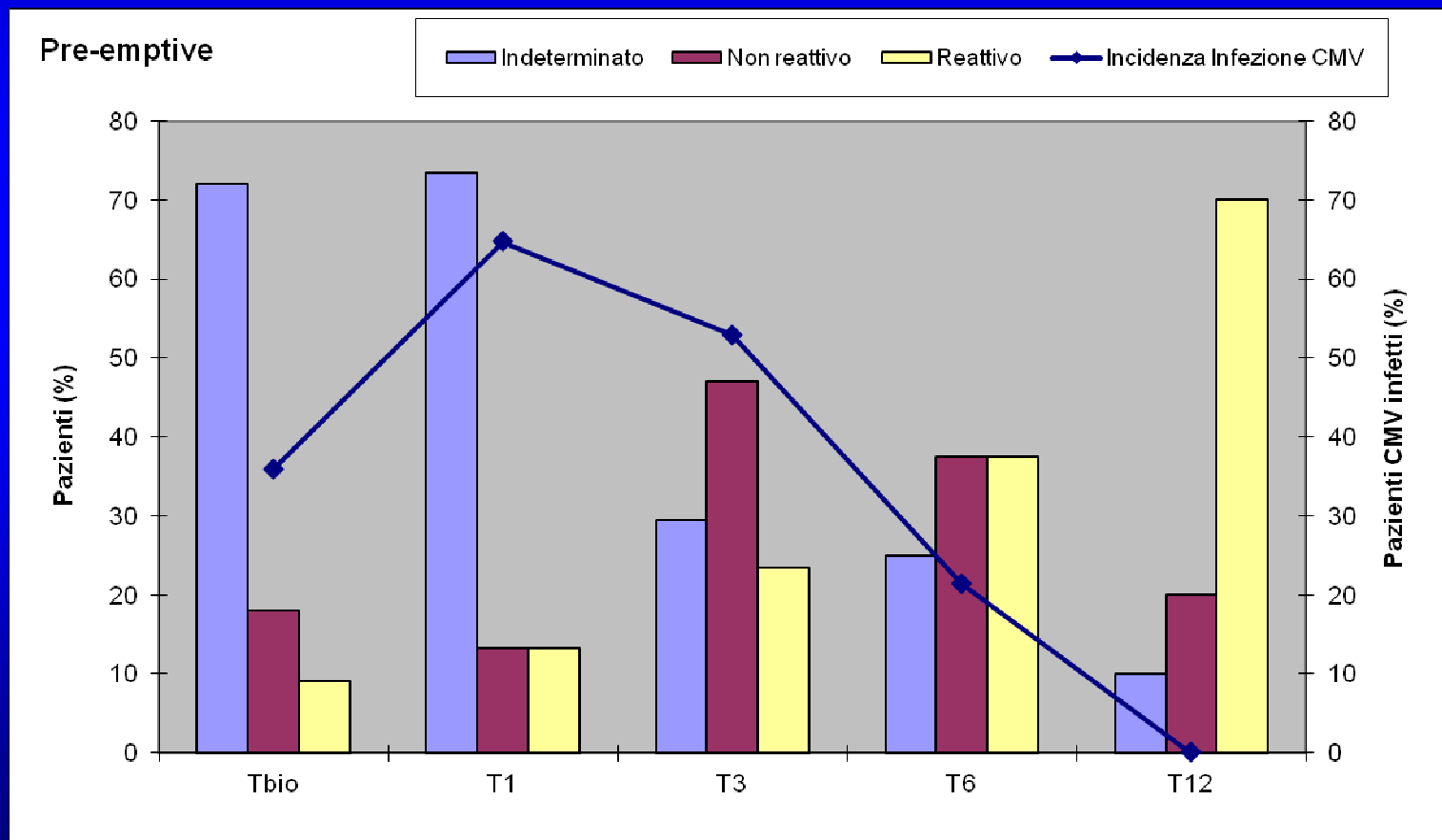
CORRELAZIONE TRA RISPOSTA CELLULO T-MEDIATA CMV-SPECIFICA e INCIDENZA DELL'INFEZIONE DA CMV

GRUPPO PROFILASSI

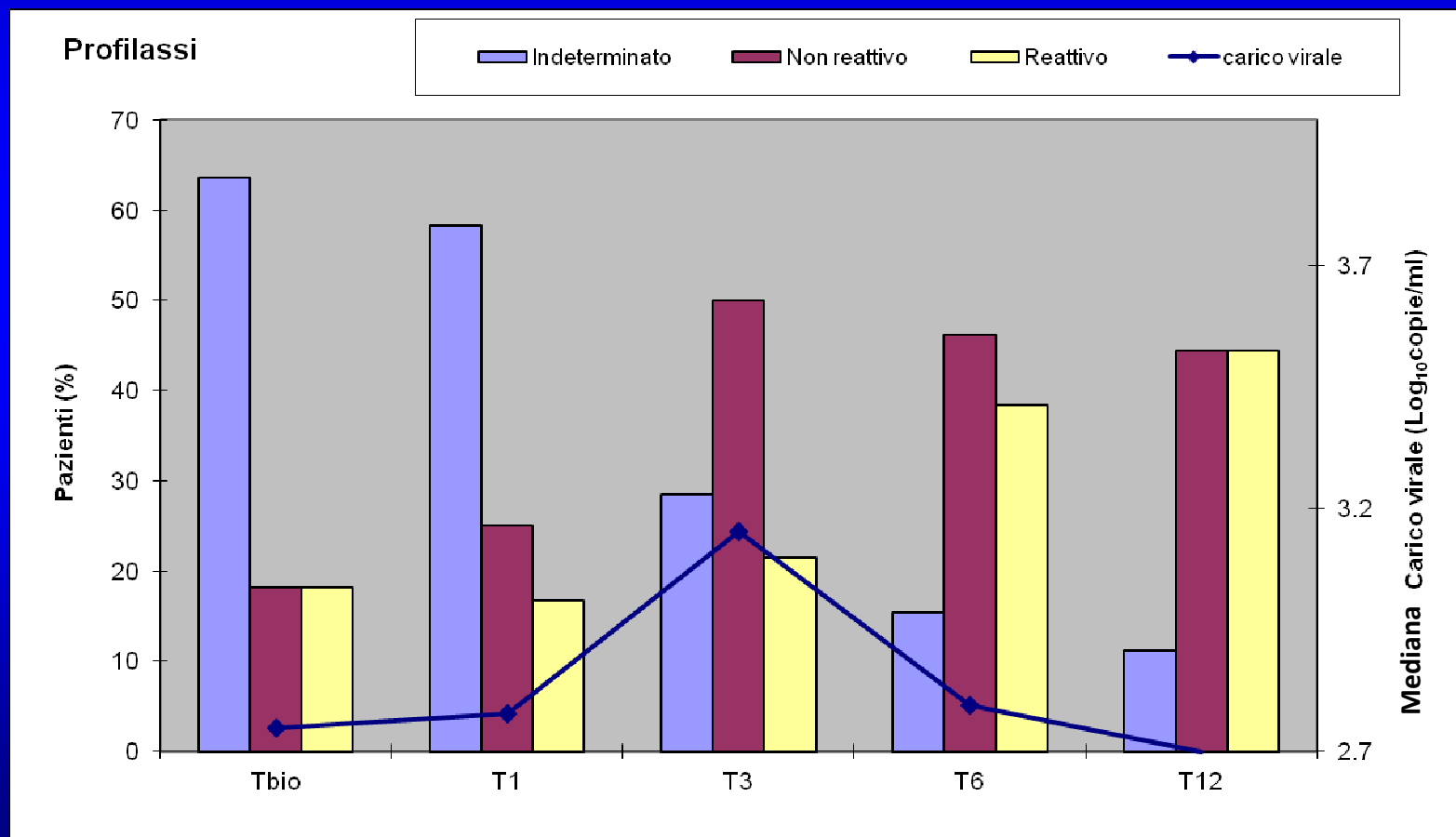


CORRELAZIONE TRA RISPOSTA CELLULO T-MEDIATA CMV-SPECIFICA e INCIDENZA DELL'INFEZIONE DA CMV

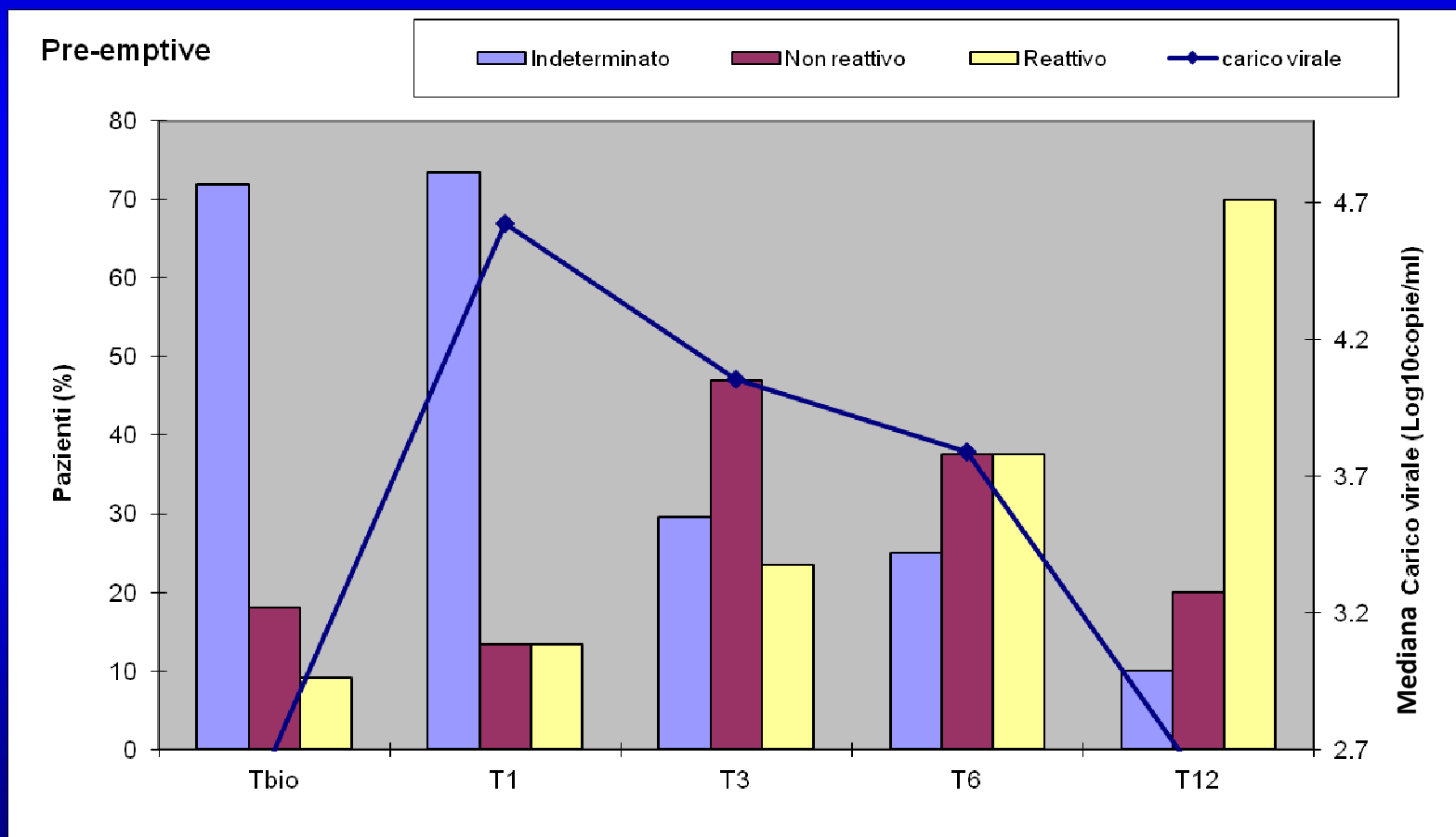
GRUPPO PRE-EMPTIVE



CORRELAZIONE TRA RISPOSTA CELLULO T-MEDIATA CMV-SPECIFICA e CARICO VIRALE GRUPPO PROFILASSI



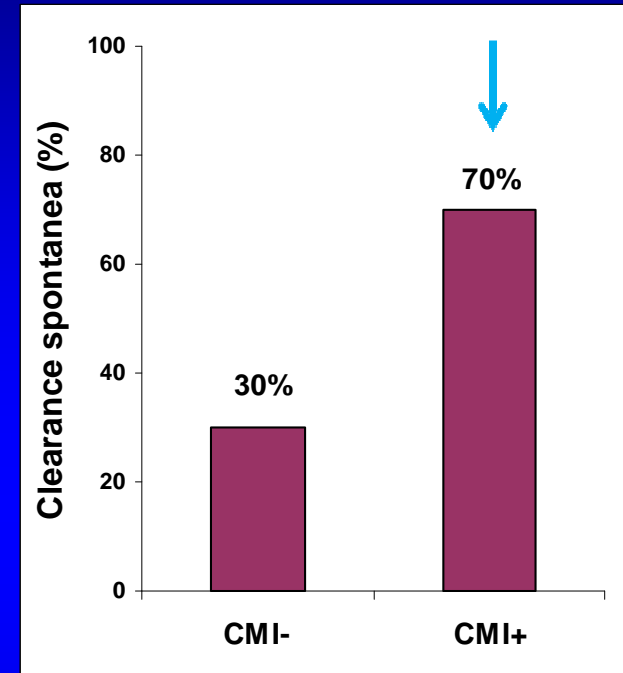
CORRELAZIONE TRA RISPOSTA CELLULO T-MEDIATA CMV-SPECIFICA e CARICO VIRALE GRUPPO PRE-EMPTIVE



PAZIENTI INFETTI - GRUPPO PROFILASSI (n = 11/15)

Risultato QUANTIFERON®-CMV ottenuto in corrispondenza del primo risultato positivo di DNAemia

RISULTATO QuanFT®-CMV	TERAPIA ANTIVIRALE		TOTALE
	SI n = 1	NO n = 10	
INDETERMINATO	1	3	4
NON REATTIVO	0	4	4
REATTIVO	0	3	3



Insorgenza dell'infezione giorni post-TX (Mediana) :

- terapia antivirale: 173
- clearance spontanea: 130

infezione sintomatica
da CMV

Clearance spontanea:

- 70% (7/10) pazienti presentavano una risposta immunitaria cellulo-mediata globale (CMI+) → 3/7 presentavano una risposta immunitaria cellulo-mediata CMV specifica

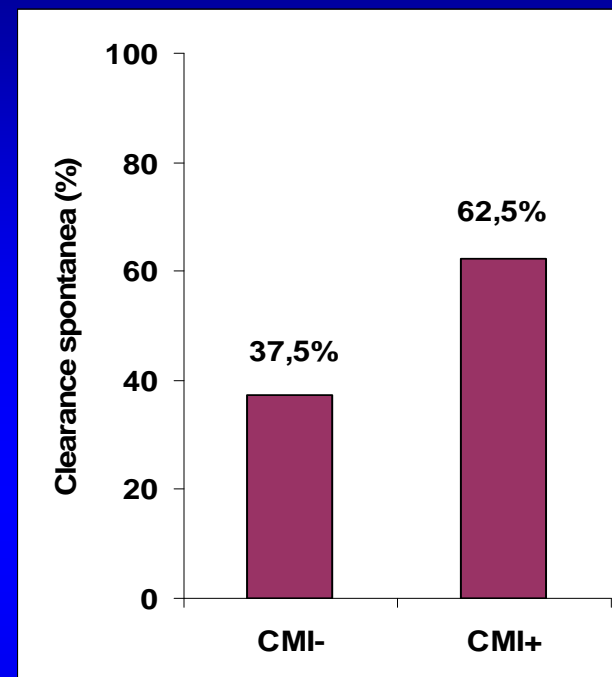
4 CASI PAZIENTI INFETTI - GRUPPO PROFILASSI

CASO	TERAPIA	RISULTATO QUANTIFERON-CMV	SINTOMI	TEMPO primo risultato positivo post-Tx (giorni)	DNAemia copie/ml	ESITO
n.16 D+/R+	NO	T3 REATTIVO	NO	79	Min P < 570 Max 2.100	GUARITO
n.22 D+/R+	NO	T6 REATTIVO	NO	152	Min P < 590 Max 4.510	GUARITO
n.21 D-/R+	NO	T6 REATTIVO	NO	107	Min 860 Max 2.300	GUARITO
n. 10 D+/R+	SI	T12 NON REATTIVO	SI febbre leucopenia	198	Min P<500 Max 16.995	GUARITO

PAZIENTI INFETTI - GRUPPO PRE-EMPTIVE (n =15/17)

Risultato QuantiFERON®-CMV ottenuto in corrispondenza del primo risultato positivo di DNAemia

RISULTATO QFT®-CMV	TERAPIA ANTIVIRALE		TOTALE
	SI n = 7	NO n = 8	
INDETERMINATO	6	3	9
NON REATTIVO	1	3	4
REATTIVO	0	2	2



Insorgenza dell'infezione giorni post-TX (Mediana):

- terapia antivirale: **35**
- clearance del virus: **94**

1 paziente
infezione sintomatica
da CMV

Clearance spontanea del virus:

- 62.5% (5/8) pazienti presentavano una risposta immunitaria cellulo-mediata globale (CMI+) → 2/5 presentavano una risposta immunitaria cellulo-mediata CMV specifica

4 CASI PAZIENTI INFETTI - GRUPPO PRE-EMPTIVE

CASO	TERAPIA	RISULTATO QUANTIFERON-CMV	SINTOMI	TEMPO primo risultato positivo post-Tx (giorni)	DNAemia copie/ml	ESITO
n.23 D+/R+	NO	T1 REATTIVO	NO	20	Min P < 500 Max 4726	GUARITO
n.27 D+/R+	SI	T6 REATTIVO	NO	24	Min P < 500 Max 48.879	GUARITO
n.29 D-/R+	SI	T6 REATTIVO	NO	27	Min 600 Max 12.630	GUARITO
n. 32 D+/R+	SI	T12 NON REATTIVO	SI POLMONITE	31	Min P<500 Max 251.000	GUARITO

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA CELLULO-MEDIATA GLOBALE E SPECIFICA AL TERZO MESE POST-TRAPIANTO (T3)

GRUPPO PRE-EMPTIVE

QuantiFERON®-CMV	T3
INDETERMINATO	4/17
NON REATTIVO	8/17
REATTIVO	5/17

- 1/4 trattamento antivirale
- 1/4 infezione sintomatica da CMV
- 2 clearance spontanea

13/17 → risposta cellulo-mediata globale



11/13 pazienti

- carico virale ematico basso
- no infezione da CMV dopo il T3

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA CELLULO-MEDIATA GLOBALE E SPECIFICA AL TERZO MESE POST-TRAPIANTO (T3)

GRUPPO PROFILASSI

QuantiFERON[®]-CMV	T3
INDETERMINATO	4/15
NON REATTIVO	7/15
REATTIVO	4/15

1/4 infezione sintomatica da CMV

no infezione da CMV dopo il T3

...IN CONCLUSIONE

PAZIENTI TRAPIANTATI DI CUORE Gruppo PROFILASSI e Gruppo PRE-EMPTIVE

- ❖ Entro il primo mese dal trapianto (T1):
60-70% → QFN®-CMV indeterminati
- ❖ Entro il terzo mese post-trapianto (T3):
30% → QuantiFERON®-CMV indeterminato
40% → QuantiFERON®-CMV non reattivo
30% → QuantiFERON®-CMV reattivo
- ❖ Pazienti con risultato QuantiFERON-CMV INDETERMINATO al T3 → carichi virali ematici più elevati e necessità di trattamento antivirale; infezioni sintomatiche da CMV
- ❖ Pazienti con risultato QuantiFERON-CMV REATTIVO al T3 → controllo dell'infezione da CMV, clearance spontanea

La valutazione della risposta cellulo-mediata effettuata al terzo mese post-trapianto (T3) si è rivelata informativa per entrambi i gruppi

...IN CONCLUSIONE

CLINICAMENTE il test QuantiFERON®-CMV potrebbe fornire informazioni utili per:

- ❖ identificare i pazienti in grado di controllare l'infezione da CMV
- ❖ identificare i pazienti ad alto rischio per infezione da CMV → monitoraggio virologico più stretto
- ❖ guidare la scelta delle opzioni terapeutiche
 - ✓ modulazione degli interventi terapeutici immunosoppressivi per il controllo dell'infezione
 - ✓ terapia antivirale
 - ✓ durata della profilassi

... NECESSITA' DI ULTERIORI STUDI