

Frar 2018

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Fuljett ta' Tagħrif fil-Pakkett



It-test li jkejjel ir-rispons ta' IFN- γ f'demm sħiħ għal antigeni ta' peptidi ta' Ċitomegalovirus Uman.

IVD Għal użu dijanjostiku in vitro



REF 0350-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, L-ISTATI UNITI +1-800-426-8157

EC **REP** QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
IL-ĠERMANJA

1075110MT Rev. 05



www.QuantiFERON.com



Werrej

Użu maħsub	5
Sommarju u Spjegazzjoni.....	5
Prinċipju tal-Proċdura.....	6
Żmien meħtieġ biex isir l-assaġġ.....	7
Materjali Pprovduti	8
Kontenut tal-kitt.....	8
Materjali Meħtieġa iżda Mhux Ipprovduti	9
Twissijiet u Prekawzjonijiet.....	9
Informazzjoni dwar is-sigurtà	11
Tażna u Mmaniġġjar tar-Reaġent	12
Ġbir ta' Kampjuni u Ġestjoni.....	13
Proċedura	16
Stadju 1: Inkubazzjoni tad-demem u tħsad tal-plażma	16
Stadju 2: QuantiFERON CMV ELISA għal IFN- γ Uman.....	17
Kalkoli u Interpretazzjoni tat-Test	22
Ġenerazzjoni tal-Kurva Standard (jekk ma jintużax is-Softwer tal-Analizi QF-CMV) ..	22
Il-Kontroll tal-Kwalità tat-Test.....	23
Interpretazzjoni tar-Riżultati	24
Limitazzjonijiet	25
Valuri Mistennija	25
Karatteristiċi tal-Prestazzjoni.....	28
Prestazzjoni klinika.....	28

Limitu tal-assaġġ.....	29
Studji Kliniċi	29
Speċifiċità.....	29
Sensittività	30
Studji li jenfasiszaw l utilità klinika	30
Linji gwida ta' kunsens internazzjonali dwar il-ġestjoni ta' ċitomegalovirus fi trapjanti ta' organi solidi.....	35
Karatteristiċi ta' Prestazzjoni tal-Assaġġ	36
Informazzjoni Teknika	38
Riżultati indeterminati	38
Kampjuni tal-plażma bl-emboli.....	38
Gwida għal Individwazzjoni ta' Soluzzjoni	39
Referenzi	41
Simboli.....	43
Informazzjoni ta' Kuntatt.....	44
Proċedura tat-Test ta' ELISA fil-Qosor	45
Stadju 1: Inkubazzjoni tad-demm	45
Stadju 2: IFN- γ ELISA	45
Storja ta' Reviżjoni tal-Manwal	48

Użu maħsub

QuantIFERON-CMV ELISA (QF CMV) huwa assaġġ in vitro li juża taħlita ta' peptidi li jimitaw il-proteini ta' ċitomegalovirus uman (cytomegalovirus, CMV) biex jistimulaw ċelluli f'demm sħiħ eparinizzati. L-identifikazzjoni ta' interferon-gamma (interferon-gamma, IFN- γ) b'assaġġ immunosorbenti marbut mal-enzimi (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) tintuża biex tikkwantifika r-rispons in vitro għal dawn l-antiġeni peptidi li huma assoċjati ma' kontroll immuni ta' infezzjoni ta' CMV. It-telf ta' din il funzjoni immuni jista' jiġi assoċjat mal-iżvilupp ta' mard ta' CMV. L-użu maħsub ta' QF CMV hu li jimmonitorja livell ta' immunità tal-pazjent kontra CMV.

QF-CMV mhuwiex test biex jiddetermina infezzjoni b'CMV u m'għandux jintuża biex jeskludi infezzjoni b'CMV.

Sommarju u Spjegazzjoni

CMV huwa virus tal-erpete li jinfetta bejn 50–85 % ta' adulti fil-popolazzjoni. Huwa komplikazzjoni li sseħħ ta' spiss ta' immunosoppressjoni, partikolarment wara trapjant, u jista' jikkontribwixxi b'mod konsiderevoli għal morbidità u mortalità f'riċevituri ta' trapjanti. Terapiji immunosoppressivi attwali li jintużaw biex jipprevjenu r-rifjut ta' organu ttrapjantat għandhom effetti detrimental fuq il-linfoċiti T u r-rispons immuni medjat miċ-ċelluli (cell-mediated immune, CMI), li jirriżultaw f'suxxetibilità miżjuda għal infezzjonijiet virali ta' wara t-trapjant. L-importanza tal-funzjoni taċ-ċelluli T fis-soppressjoni tar-replikazzjoni ta' CMV huwa wkoll innotat mill-fatt li limfoċiti T ċitotossici (cytotoxic T-lymphocytes, CTLs) CD8⁺ speċifiċi għal CMV jistgħu jiproteġu f'patogeneżi assoċjata mal-virus. L-enumerazzjoni ta' CTLs CD8⁺ speċifiċi għal CMV f'pazjenti immunosoppressati u l-produzzjoni ta' IFN- γ jistgħu jkunu ta' prewiżjoni dwar ir-riskju li jiżviluppa mard ta' CMV. Il-produzzjoni ta' IFN- γ tista' tkun surrogat funzjonali għall-identifikazzjoni ta' CTLs speċifiċi għal CMV.

QF CMV huwa assaġġ għar-rispons ta' CMI għal antiġeni ta' peptidi li jimitaw il-proteini ta' CMV. Il-peptidi ta' CMV huma mfassla biex jimmiraw ċelluli T CD8⁺, li jinkludu A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 and Cw6 (A30, B13) ħaplotipi HLA ta' Klassi I li jkopru > 98% tal-popolazzjoni tal-bniedem. Individwi infettati b'CMV ġeneralment ikollhom linfoċiti CD8⁺ fid-demm tagħhom li jirrikonoxxu dawn l-antiġeni. Dan il-proċess ta' rikonoxximent jinvolti l-ġenerazzjoni u s-sekrezzjoni ta' ċitokina, IFN- γ . L-identifikazzjoni u l-kwantifikazzjoni sussegwenti tal-IFN- γ tiffirma parti mill-bażi ta' dan it-test.

Prinċipju tal-Proċdura

It-test QF-CMV isir f'żewġ stadji. L-ewwel, jinġabar demm sñiħ f'kull wieħed mit-tubi ta' ġbir tad-demm għal QF-CMV, li jinkludu tubu ta' Kontroll Nil, tubu ta' Antiġen ta' CMV, u tubu ta' Mitoġenu.

It-tubu ta' Mitoġenu jintuża fit-test ta' QF-CMV bħala kontroll pożittiv. Dan jista' jkun iġġustifikat speċjalment meta jkun hemm dubju dwar l-istat immuni tal-individwu. It-tubu ta' Mitoġenu jista' jservi wkoll bħala kontroll għall-immuniġġjar u l-inkubazzjoni korretti tad-demm.

It-tubi għandhom jiġu inkubati f'temperatura ta' 37°C malajr kemm jista' jkun, u fi żmien 16-il siegħa minn meta jinġabru. Wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' bejn 16–24 siegħa, it-tubi jiġu ċentrifugati, il-plażma titneħħa u l-ammont ta' IFN- γ (IU/ml) jitkejjel bi QF-CMV ELISA.

L-ammont ta' IFN- γ f'kampjuni ta' plażma minn tubi ta' CMV Antiġen u Mitoġenu spiss jistgħu jkunu 'l fuq mil-limiti ta' fuq ta' ħafna mir-readers ta' ELISA, anke meta l-individwi jiġu immunosoppressati moderatament. Għal riżultati kwalitattivi, uża l-valuri kkalkulati għal plażma mhux dilwita. Għal riżultati kwantitattivi, fejn huma meħtieġa valuri attwali ta' IU/ml, għandhom jiġu dilwiti kampjuni ta' plażma 1/10 f'Green Diluent u assaġġati fl ELISA flimkien ma' plażma mhux dilwita.

Nota: Għal kampjuni li jaqgħu fi ħdan il-medda tal-QF-CMV ELISA (jiġifieri, sa 10 IU/ml), għandhom jintużaw ir-riżultati miksuba bil-plażma mhux dilwita. Għal konċentrazzjonijiet ta' IFN- γ bħal dawn, il-valuri miksuba permezz tad-dilwizzjoni ta' 1/10 tal-kampjuni tal-plażma jistgħu ma jkunux eżatti.

Test jiġi kkunsidrat reattiv għar-rispons ta' IFN- γ meta t-tubu ta' CMV Antigen ikun jaqra 'l fuq b'mod sinifikanti mill-valur ta' Nil IFN- γ IU/ml. Il-kampjun tal-plażma stimulat minn Mitoġenu jservi bħala kontroll pożittiv ta' IFN- γ għal kull kampjun ittestjat. Rispons baxx għal Mitoġenu jindika riżultat inkonklużiv meta kampjun tad-demem ikollu wkoll rispons mhux reattiv għall-antigeni ta' CMV. Din it-tendenza tista' ssejtni b'limfoċiti insuffiċjenti, attività limfoċitika mnaqqsa minħabba ġestjoni mhux xierqa tal-kampjun, mili/taħlit mhux korrett tat-tubu Mitoġenu, jew l-inkapaċità tal-limfoċiti tal-pazjent li jiġġeneraw IFN- γ – bħal f'każijiet ta' pazjenti bi trapjant riċenti. Il-kampjun Nil jaqgħu għal IFN- γ fl-isfond jew mhux speċifiku f'kampjuni tad-demem. Il-livell ta' IFN- γ fit-tubu Nil jiġi mnaqqas mil-livell ta' IFN- γ għat-tubu ta' CMV Antigen u t-tubu Mitoġenu (ara "Interpretazzjoni tar-Riżultati" f'paġna 24 ta' dan il-Fuljett ta' Tagħrif fil-Pakkett għal gabra fil-qosor dwar kif ir-riżultati ta' QF-CMV jiġu interpretati).

Żmien meħtieġ biex isir l-assaġġ

Iż-żmien meħtieġ biex isir l-assaġġ ta' QF-CMV huwa stmat hawn taħt; iż-żmien għall-ittestjar ta' kampjuni multipli meta miġbura f'lott huwa indikat ukoll:

Inkubazzjoni f'37°C tat-tubi tad-demem:	16–24 siegħa
ELISA:	Madwar 3 sigħat għal plejt wieħed ta' ELISA Inqas minn siegħa xogħol Żid 10 sa 15-il minuta għal kull plejt żejjed

Materjali Pprovduti

Kontenut tal-kitt

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
Nru tal-katalgu	0192-0301
Numru ta' preparazzjonijiet	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON Kontroll Nil) (tapp griz)	tubu 1
QuantiFERON CMV Antigen (QuantiFERON Antigen ta' CMV) (tapp blu)	tubu 1
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON Kontroll Mitoġenu) (tapp vjola)	tubu 1
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Fuljett ta' Tagħrif fil-Pakkett tat-Tubi tal-Gbir tad-Demm QF CMV)	1

QuantiFERON-CMV ELISA	Kitt ta' ELISA b'2 Platti
Nru tal-katalgu	0350-0201
Strippi tal-mikropjastra (12 x 8 toqob) miksija b'antikorp monoklonali IFN- γ antiuman	2 settijiet ta' strippi tal-mikropjastra b'toqob 12 x 8
Human IFN- Standard, lyophilized (IFN-fih γ Uman, Standard, Lijofilizzat) (fih IFN- γ umana rikombinanti, kaseina bovina, 0.01 % w/v Thimerosal)	1 x vial (8 IU/ml meta jkun rikostitwit)
Green Diluent (Dilwent Aħdar) (fih kaseina bovina, seru normali tal-ġurdien, 0.01 % w/v Thimerosal)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (Konjugat 100x Konċentrat, Ijofilizzat) (IFN- γ HRP anti-umana murin , fih 0.01 % w/v Thimerosal)	1 x 0.3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (Wash Buffer 20x Konċentrat) (pH 7.2, fih 0.05 % v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Soluzzjoni ta' Substrat tal-Enzima) (fiha H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' Tetramethylbenzidine)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Soluzzjoni li Twaqqaf l-Enzima) (fiha 0.5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (QF CMV ELISA Fuljett ta' Tagħrif fil-Pakkett)	1

* Fih aċidu sulfuriku. Ara paġna 9 għall-prekawzjonijiet.

Materjali Meħtieġa iżda Mhux Ipprovduti

Meta taħdem bis-sustanzi kimiċi, dejjem ilbes ġagaga tal-laboratorju xierqa, ingwanti li jintremew, u gogils protettiv. Għal aktar informazzjoni, ikkonsulta l-iskedi ta' data ta' sigurtà (safety data sheets, SDSs) xierqa, disponibbli mill-fornitur tal-prodott.

- Inkubatur ta' 37°C; CO₂ mhux meħtieġ
- Pipetti kkalibrati ta' volum varjabbli għall-għoti ta' 10–1000 µl b'ponot li jintremew
- Pipetti kkalibrati b'aktar minn kanal wieħed li kapaċi jipprovdu 50 u 100 µl bi truf li jintremew
- Xejker għall-mikropjastra
- Ilma dejjonizzat jew distillat, 2 litri
- Washer għall-mikropjastra (washer awtomatizzat rakkomandat)
- Reader tal-mikropjastra mgħammar b'filtru ta' 450 nm u filtru ta' referenza ta' 620 nm sa 650 nm

Twissijiet u Prekawzjonijiet

Għal użu dijanjostiku in vitro

Meta taħdem bis-sustanzi kimiċi, dejjem ilbes ġagaga tal-laboratorju xierqa, ingwanti li jintremew, u gogils protettiv. Għal aktar informazzjoni, jekk jogħġbok ikkonsulta l-iskedi ta' data ta' sigurtà (SDSs) xierqa. Dawn huma disponibbli online f'format PDF konvenjenti u kompatt fuq www.qiagen.com/safety fejn tista' ssib, tara u tipprinjta l-SDS għal kull kitt u komponent tal-kitt QIAGEN®.

KAWTELA



Immaniġġja d-demm tal-bniedem daqslikieku kien potenzjalment infezzjuż.
Osserva linji gwida rilevanti dwar l-immaniġġjar tad-demm.

Id-dikjarazzjonijiet ta' periklu u ta' prekawzjoni li ġejjin japplikaw għall-komponenti tal-QuantifERON-CMV ELISA.

QuantifERON Enzyme Stopping Solution



Fih: aċidu sulfuriku. Twissija! Jista' jkun korrużiv għall-metalli.
Jagħmel irritazzjoni tal-ġilda. Jagħmel irritazzjoni serja lill-għajnejn.
Ilbes ingwanti protettivi/ ilbies protettiv/ protezzjoni għall-għajnejn/
protezzjoni għall-wiċċ.

QuantifERON Enzyme Substrate Solution

Twissija! Jagħmel irritazzjoni ħafifa tal-ġilda. Ilbes ingwanti protettivi/
ilbies protettiv/ protezzjoni għall-għajnejn/ protezzjoni għall-wiċċ.

QuantifERON Green Diluent



Fih: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo)pyrazole-3-carboxylate. Fih: tartrazine. Twissija!
Jista' jikkawża reazzjoni allergjika tal-ġilda. Ilbes ingwanti protettivi/
ilbies protettiv/ protezzjoni għall-għajnejn/ protezzjoni għall-wiċċ.

QuantifERON Wash Buffer 20x Concentrate

Fih: ProClin 300. Jagħmel ħsara lill-organizmi akwatiċi b'mod li jħalli
effetti dejjiema. Evita r-rilaxx fl-ambjent.

Informazzjoni dwar is-sigurtà

Aktar informazzjoni

- Devjazzjonijiet mill-Fuljett ta' Tagħrif fil-Pakkett ta' QF-CMV jistgħu jipproduċu riżultati mhux korretti. Jekk jogħġbok aqra l-istruzzjonijiet b'attenzjoni qabel l-użu.
- Tużax il-kitt jekk xi flixxkun ta' reaġent juri sinjali ta' ħsara jew tnexxija qabel l-użu.
- **Importanti:** Spezzjona l-kunjetti qabel l-użu. Tużax il-kunjetti Conjugate jew IFN- γ Standard li juru sinjali ta' ħsara jew jekk is-siġill tal-lasktu jkun ġie kompromess. Tużax kunjetti mkissrin. Hu l-prekawzjonijiet ta' sigurtà xierqa sabiex tarmi l-kunjetti b'mod sigur.

Rakkomandazzjoni: Uża de-crimper tal-kunjett biex tiftaħ il-kunjetti Conjugate jew IFN- γ Standard sabiex timminimizza r-riskju ta' korriment mill-kappa tal-mettall li titgeżwer mal-flixxkun.

- Thallatx jew tużax l-Istrixxi tal-Mikropjastra, IFN- γ Uman Standard, Dilwent Aħdar jew Konjugat 100x Konċentrat minn lottijiet differenti tal-kitt ta' QF-CMV. Reaġenti oħra (Wash Buffer 20x Konċentrat, Soluzzjoni ta' Substrat tal-Enzima, u Soluzzjoni li Twaqqaf l-Enzima) jistgħu jintużaw minflok xulxin bejn il-kitts, diment li r-reaġenti jkunu fi żmien il-perjodi ta' skadenza tagħhom u li jitniżżlu d-dettalji tal-lott.
- Armi reaġenti u kampjuni bijoloġiċi li ma jintużawx skont ir-regolamenti Lokali, tal-Istat u Federali.
- Tużax it-Tubi tal-Ġbir tad-Demm ta' QF-CMV jew il-kitts ta' QF-CMV ELISA wara d-data ta' skadenza.
- Żgura li tagħmir tal-laboratorju bħal washers tal-platti u readers ikunu ġew ikkalibrati/ivvalidati qabel l-użu.

Ħażna u Mmaniġġjar tar-Reaġent

Tubi tal-ġbir tad-demmm

- Aħżen it-Tubi tal-Ġbir tad-Demm ta' QF-CMV f'temperatura bejn 4–25°C.
- It-Tubi tal-Ġbir tad-Demm ta' QF-CMV għandhom ikunu bejn 17–25°C meta jimtlew bid-demmm.
- Iż-żmien kemm idumu tajbin it-Tubi tal-Ġbir tad-Demm ta' QF-CMV huwa massimu ta' 15-il xahar mid-data ta' manifattura, meta jinħażnu f'temperatura bejn 4–25°C.

Reaġenti tal-kitt ta' ELISA

- Aħżen il-kitt f'temperatura bejn 2–8°C.
- Dejjem iproteġi s-Soluzzjoni ta' Substrat tal-Enzima minn xemx diretta.

Reaġenti mhux rikostitwiti u li ma ntużawx

Għall-istruzzjonijiet dwar kif għandek tirrikostitwixxi r-reaġenti, jekk jogħġbok ara l-“Stadju 2: QuantiFERON CMV ELISA għal IFN- γ Uman” (passi 3 u 5 f'paġni 17 u 19).

- L-IFN- γ Uman Standard rikostitwit jista' jinżamm sa 3 xhur jekk jinħażen f'temperatura bejn 2–8°C.
Innota d-data li fih ġie rikostitwit l-IFN- γ Uman Standard.
- Ladarba jiġi rikostitwit, Konjugat 100x Konċentrat mhux użat għandu jinħażen mill-ġdid f'2–8°C u għandu jintuża fi żmien 3 xhur.
Innota d-data li fiha l-konjugat ġie rikostitwit.
- Il-konjugat ta' qawwa li bih ser taħdem għandu jintuża fi żmien 6 sigħat minn xhin ikun ġie preparat.
- Il-konjugat ta' qawwa tal-Wash Buffer jista' jinħażen f'temperatura ambjentali (22 C \pm 5°C) sa ġimagħtejn.

Ġbir ta' Kampjuni u Ġestjoni

QF CMV juża t-tubi tal-ġbir tad-demm li ġejjin:

- Nil Control (Kontroll Nil) (tapp griż)
- CMV Antigen (Antigen ta' CMV) (tapp blu)
- Mitogen Control (Kontroll Mitogen) (tapp vjola)

L-antigeni jkunu mnixxa fuq il-ġnub ta' ġewwa tat-tubi tal-ġbir tad-demm, għalhekk huwa essenzjali li l-kontenut tat-tubi jithallat sew mad-demm. It-tubi għandhom jiġu trasferiti f'inkubatur ta' 37°C malajr kemm jista' jkun u fi żmien 16-il siegħa mill-ġbir.

Il-proċeduri li ġejjin għandhom jiġu segwiti għall-aħjar riżultati:

1. Għal kull individwu, iġbor 1 ml ta' demm mit-tiqib fil-vina direttament f'kull wieħed mit-Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV. Din il-proċedura għandha titwettaq minn flebotomista mħarreg.

It-Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF CMV jistgħu jintużaw sa altitudni ta' 810 metri (2650 pied).

Jekk tuża Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV f'altitudni ogħla minn 810 metri, jew jekk ikun hemm volum baxx ta' ġbid tad-demm, id-demm jista' jingabar permezz ta' siringa, u 1 ml jiġi trasferit immedjatament f'kull wieħed mit-3 tubi. Għal raġunijiet ta' sigurtà, dan l-aħjar li jsir billi titneħħa l labra tas-siringa, jiġu żgurati proċeduri ta' sigurtà xierqa, jitneħħew it-tappijiet tat-tliet Tubi tal-Ġbir tad-Demm ta' QF CMV u jiġi miżjud 1 ml ta' demm f'kull wieħed minnhom (sal-marka s-sewda fuq in-naħa tat-tikketta tat-tubu). Issostitwixxi t-tappijiet tat-tubi b'mod sikur u ħallat kif deskritt hawn isfel. Peress li t-tubi ta' 1 ml jiġbdu d-demm relattivament bil-mod, żomm it-tubu fil-labra għal 2–3 sekondi għaladarba t-tubi jidhru li ma baqgħux jimtlew aktar, sabiex jiġi żgurat li jkun ingibed il-volum korrett.

Il marka s-sewda fuq in-naħa tat-tubi tindika safejn hu meħtieġ li jimtela għall-volum ta' 1 ml. It-Tubi tal-Ġbir tad-Demm ta' QF-CMV ġew ivvalidati għal volumi li jvarjaw minn 0.8 ml sa 1.2 ml. Jekk il livell tad-demm fi kwalunkwe tubu ma jkunx qrib il-linja ta' indikazzjoni, huwa rrakkomandat li jinkiseb kampjun tad-demm ieħor.

Jekk qed tintuża butterfly needle biex jingabar id-demm, tubu "tat-tindif" għandu jintuża sabiex jiġi żgurati li l-pajp jimtela bid-demm qabel ma jintużaw it-Tubi tal-Ġbir tad-Demm ta' QF-CMV.

Inkella, id-demm jista' jingabar f'tubu ġeneriku wieħed tal-ġbir tad-demm li jkun fih eparina tal-litju bħala l-antikoagulant u mbagħad jiġi trasferit f'Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV. Uża biss eparina tal-litju bħala antikoagulant tad-demm peress li antikoagulanti oħrajn jinterferixxu mal-assaġġ. Imla tubu tal-ġbir tad-demm (volum minimu 5 ml) u ħallat bil-mod billi taqleb it-tubu diversi drabi rasu 'l isfel biex tinħall l-eparina. Din il-proċedura għandha titwettaq minn flebotomista mħarregġ. Id-demm għandu jinżamm f'temperatura ambjentali ($22\text{ C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) qabel jiġi trasferit fit-Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV għall-inkubazzjoni, li għandha tinbeda fi żmien 16-il siegħa mill-ġbir tad-demm.

2. Minnufih wara li jimtlew it-Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV, ħallathom għal 10 darbiet biżżejjed biex tiżgura li l-wiċċ kollu ta' ġewwa tat-tubu jinkesa bid-demm, sabiex l-antigeni li jinsabu mal-wiċċ tat-tubu jinħallu.

It-tubi għandhom jinżammu f'temperatura ta' bejn 17°C – 25°C fil-ħin li jkun qad jimtlew bid-demm.

It-taħlit bis-saħħa jista' jikkaguna sfaxxar tal-ġell u jista' jwassel għal riżultati strambi.

Jekk id-demm ikun ingabar fit-tubu tal-eparina tal-litju, il-kampjuni għandhom jithalltu indaqs qabel ma jitqiegħdu f'Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV. Kun żgur li d-demm jithallat sew billi taqleb it-tubu rasu 'l isfel bil-mod immedjatament qabel tiddistribwih. Ferra' alikwoti ta' 1 ml (wieħed għal kull Tubu tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV) f'tubu Nil, tubu ta' Antigen tas-CMV, u tubu tal-Mitoġenu skont kif xieraq. Dan għandu jsir b'mod asettiku, billi jiġu żgurati proċeduri ta' sigurtà xierqa, bit-tneħħija tat-tappijiet mit-tliet Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV u biż-żieda ta' 1 ml demm f'kull wieħed (sal-marka

s-sewda fuq il-ġenb tat-tikketta tat-tubu). Aghlaq it-tappijiet tat tubi sew u fawwadhom kif deskritt hawn fuq.

3. Immarka t-tubi b'mod xieraq.

Kun żgur li kull tubu (Nil, Antiġen tas-CMV, tal-Mitoġenu) jkun jista' jiġi identifikat mit-tikketta tiegħu jew permezz ta' mezzi oħra.

4. Wara li jimtlew, jiġu mħawdin u ttikkettati, it-tubi għandhom jiġu ttrasferiti f'inkubatur ta' $37\text{ C} \pm 1^\circ\text{C}$ malajr kemm jista' jkun, u fi żmien 16-il siegħa mill-ġbir. Qabel l-inkubazzjoni, żomm it tubi f'temperatura ambjentali ($22\text{ C} \pm 5^\circ\text{C}$). Tagħmilx il-kampjuni fil-friġġ jew fil-friza.

Proċedura

Stadju 1: Inkubazzjoni tad-demem u ħsad tal-plażma

1. Inkuba t-tubi WEQFIN f'37°C ± 1°C għal 16–24 siegħa. L-inkubatur ma jeħtieġx CO₂ jew umidifikazzjoni.

Importanti: Jekk id-demem ma jkunx inkubat immedjatement wara l-ġbir, it-tubi għandhom jithalltu mill-ġdid billi taqlibhom rashom 'l isfel 10 darbiet qabel l-inkubazzjoni.

Wara l-inkubazzjoni, it-tubi tal-ġbir tad-demem jistgħu jinżammu f'4–27°C sa 3 ijiem qabel iċ-ċentrifugazzjoni.

2. Wara l-inkubazzjoni tat-tubi f'37°C, il-ġbir tal-plażma jiġi ffaċilitat minn ċentrifugazzjoni tat-tubi għal 15-il minuta fuq 2000 sa 3000 RCF (g). Il plagg tal-ġell ser jissepara ċ-ċelluli mill-plażma. Jekk dan ma jseħħx, it-tubi għandhom jerġgħu jġu ċentrifugati. Huwa possibbli li l-plażma tinħasad mingħajr ċentrifugazzjoni, iżda hemm bżonn ta' attenzjoni addizzjonali sabiex il-plażma titneħħa mingħajr ma tiddisturba ċ-ċelluli.
3. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, evita li tippipetta 'l fuq jew 'l isfel jew li tħallat il-plażma b'xi mod ieħor qabel il-ħsad. Fi kwalunkwe ħin, oqgħod attent li ma tiddisturbax materjal fuq il-wiċċ tal-ġell.

Importanti: Kampjuni tal-plażma għandhom jinħasdu biss permezz ta' pipetta.

Kampjuni ta' plażma jistgħu jiġu kkargati minn tubi tal-ġbir tad-demem ċentrifugat għal ġol-plejt tal-QF-CMV ELISA, li jinkludi meta jintużaw stazzjonijiet tax-xogħol awtomatizzati ta' ELISA.

Il-kampjuni tal-plażma jistgħu jinħasdu f'Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV ċentrifugati għal sa 28 jum f'2–8°C jew, jekk jinħasdu, jew taħt –20°C (imma preferibbilment inqas minn –70°C) għal perjodi estiżi.

Għal kampjuni adegwati tat-test, iġbor mill-inqas 150 µl tal-plażma.

Stadju 2: QuantiFERON CMV ELISA għal IFN- γ Uman

Irreferi għall-”Kontenut tal-kitt”, paġna 8 u “Materjali Meħtieġa iżda Mhux Ipprovduti”, paġna 9, għall-materjali meħtieġa biex twettaq ELISA.

1. Il kampjuni kollha tal-plażma u r-reagenti, minbarra Konjugat 100 \times Konċentrat, għandhom jinġiebu f'temperatura ambjentali (22 C \pm 5°C) qabel jintużaw. F'alli mill-inqas 60 minuta għall-ekwilibrazzjoni.
2. Neħhi l-istrixxi li mhumiex meħtieġa mill-qafas, issiġilla mill-ġdid il-pawċ tal-fojl, u poġġi lura fil frigġ għal hażna sakemm jerga' jkun meħtieġ.

F'alli tal-anqas strippa waħda għall-Istandards ta' ELISA għal QF-CMV u biżżejjed strixxi għall-għadd ta' pazjenti li qed jiġu ttestjati. Wara l-użu, żomm il-frejg u l-għatu biex tużahom mal-istrixxi li fadal.

3. Irrikostitwixxi l-Istandard tal-IFN- γ Uman imnixxef u ffrizāt bil-volum ta' ilma dejonizzat jew distillat indikat fuq it-tikketta tal-Kunjett standard.. F'hallat bil-mod sabiex timminimizza r-ragħwa u aċċerta li jkun hemm risolubilizazzjoni kompluta. Ir rikostituzzjoni l-Istandard tal-IFN- γ għall-volum iddikjarat se tipproduċi soluzzjoni b'konċentrazzjoni ta' 8.0 IU/ml.

Nota: Il-volum ta' rikostituzzjoni tal-Istandard tal-IFN- γ Uman (kitt standard) ser ikun differenti bejn il lottijiet.

Uża l-kitt standard rikostitwit biex tipprepara serje ta' dilwizzjoni ta' 4 konċentrazzjonijiet IFN- γ f'Dilwent Aħdar (Green Diluent, GD) (Figura 1, il-paġna li jmiss). S1 (Standard 1) fih 4.0 IU/ml, S2 (Standard 2) fih 1.0 IU/ml, S3 (Standard 3) fih 0.25 IU/ml, u S4 (Standard 4) fih 0 IU/ml (GD waħdu). L-standards għandhom jiġu assaġġati mill-inqas f'dupplikat. Ipprepara dilwizzjonijiet friski tal-kitt standard g' al kull sessjoni ta' ELISA.

Eżempju ta' proċedura għal standards duplikati

Eżempju ta' proċedura għal standards duplikati	
A	Immarka erba' tubi: S1, S2, S3, S4
B	Żid 150 µl ta' GD ma' S1, S2, S3, S4
C	Żid 150 µl tal-kitt standard ma' S1 u ħallat sew
D	Ittrasferixxi 50 µl minn S1 għal S2 u ħallat sew
E	Ittrasferixxi 50 µl minn S2 għal S3 u ħallat sew
F	GD waħdu jservi bħala l-istandard żero (S4)

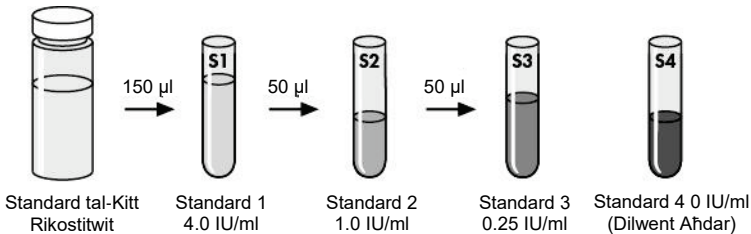


Figura 1. Preparazzjoni tal-kurva standard permezz ta' dilwizzjoni serjali.

4. Irrikostitwixxi Konjugat 100x Konċentrat li jofilizzat b'0.3 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat. Ħallat bil-mod biex timminimizza l-formazzjoni ta' ragħwa u żgura solubilizzazzjoni totali tal-konjugat.

Il-konjugat tal-qawwa li ser jintuża jiġi preparat billi jiġi dilwit l-ammont meħtieġ ta' Konjugat 100 xKonċentrat rikostitwit f'Dilwent Aħdar (ara Tabella 1, il-paġna li jmiss).

Ħallat sew imma bil-mod sabiex tevita l-formazzjoni ta' ragħwa.

Irritorna kull Konjugat 100x Konċentrat li ma jkunx intuża lura għal 2–8°C immedjatament wara l użu.

Uża biss Dilwent Aħdar.

Tabella 1. Preparazzjoni tal-konjugat tal-qawwa li ser jintuża

Għadd ta' strixxi	Volum tal-Konjugat 100x Konċentrat	Volum tad-Dilwent Aħdar
2	10 µl	1.0 ml
3	15 µl	1.5 ml
4	20 µl	2.0 ml
5	25 µl	2.5 ml
6	30 µl	3.0 ml
7	35 µl	3.5 ml
8	40 µl	4.0 ml
9	45 µl	4.5 ml
10	50 µl	5.0 ml
11	55 µl	5.5 ml
12	60 µl	6.0 ml

5. Għal kampjuni tal-plażma miġbura minn tubi tal-ġbir tad-demmi u sussegwentement iffriżati jew maħżuna għal aktar minn 24 siegħa qabel l-assaġġ, ħawwad sew qabel ma żżidhom mat-toqba ta' ELISA.

Importanti: Jekk il-kampjuni tal-plażma għandhom jiġu miżudini direttament mit-Tubi tal-Ġbir tad-Demm QF-CMV ċentrifugati, kwalunkwe taħlit tal-plażma għandu jiġi evitat. Dejjem oqgħod attent li ma tiddisturbax materjal fuq il-wiċċ tal-ġell.

6. Iddilwixxi wkoll il-plażmi ta' CMV u tal-Mitoġenu 1/10 f'Dilwent Aħdar (10 µl plażma + 90 µl GD) jekk ikunu meħtieġa riżultati kwantitattivi. Il-plażma Nil m'għandux jiġi dilwit.

Huwa rakkomandat li l-kampjuni li ġejjin jiġu ttestjati b'mod parallel:

Nil, Antiġen ta' CMV, Mitoġenu, Antiġen ta' CMV (1/10), Mitoġenu (1/10)

Madanakollu, l-għażliet għal kampjuni tal-pazjent li ġejjin jiġu wkoll sostnuti bil-QuantIFERON-CMV Analysis Software:

Nil, Antiġen ta' CMV, Mitoġenu

Nil, Antiġen ta' CMV (1/10), Mitoġenu (1/10)

Nil, Antiġen ta' CMV, Mitoġenu, Antiġen ta' CMV (1/10)

Nil, Antiġen ta' CMV (1/10), Mitoġenu

7. Żid 50 µl ta' konjugat ta' qawwa li ser taħdem biha li jkun għadu kif ġie preparat għal ġot-toqob ta' ELISA meħtieġa b'pipetta b'aktar minn kanal wieħed.
8. Żid 50 µl ta' kampjuni ta' plazma tat-test għal ġot-toqob xierqa. Finalment, żid 50 µl ta' kull wieħed mill-Istandards 1 sa 4 fit-toqob xierqa. L-standards għandhom jiġu assaġġjati b'tal-inqas mod duplikat.
9. Għatti l-platt ta' ELISA u ħallat il-kampjuni/l-standards tal-konjugat u tal-plażma sew billi tuża shaker għal microplate għal minuta b'500 sa 1000 rpm. Evita li ttajjar.
10. Għatti kull l-plejt ta' ELISA b'għatu u inkuba f'temperatura ambjentali ta' ($22\text{ C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) għal 120 ± 5 minuti.

Il-plejts m'għandhomx jiġu esposti għal xemx diretta waqt l-inkubazzjoni. Devjazzjoni mit-temperatura speċifikata tista' twassal għal riżultati żbaljati.

11. Waqt l-inkubazzjoni, ipprepara wash buffer ta' qawwa li ser taħdem biha. Iddilwixxi parti waħda Wash Buffer 20x Konċentrat ma' 19-il parti ta' ilma deijonizzat jew distillat u ħallat sew. Ġie pprovdut biżżejjed Wash Buffer 20x Konċentrat biex jithejjew 2 litri ta' wash buffer ta' qawwa biex taħdem bih.
12. Meta l-inkubazzjoni tal-plejt ta' ELISA tkun lesta, aħsel it-toqob b'400 µl ta' qawwa li ser taħdem biha ta' wash buffer għal tal-inqas sitt ċikli. Huwa rakkomandat li tuża plate washer awtomatizzat.

Importanti: Hasil sew huwa importanti ħafna għall-prestazzjoni tal-assaġġ. Żgura li kull toqba tkun mimlija kompletament bil-wash buffer sal-quċċata tat-toqba għal kull ċiklu tal-ħasil. Huwa rakkomandat perjodu ta' tlaħliħ ta' mill-anqas 5 sekondi bejn kull ċiklu.

Għandu jiżdied diżinfettant standard tal-laboratorju mar-reċipjent tal-effluent, u għandhom jiġu segwiti proċeduri stabbiliti għad-dekontaminazzjoni ta' materjal potenzjalment infettiv.

13. Taptap il-plejts wiċċhom 'l isfel fuq xugaman assorbenti ħieles mit-tnietex biex tneħħi l-wash buffer li jkun fadal. Żid 100 µl Soluzzjoni tas-Substrat tal-Enzima f'kull toqba, għatti l-plejt b'għatu u ħallat sew billi tuża microplate shaker għal minuta b'500 sa 1000 rpm billi tuża shaker għal microplate.

-
14. Għatti kull plejt b'għatu u inkuba f'temperatura ambjentali ($22\text{ C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) għal 30 minuta. Il-plejts m'għandhomx jiġu esposti għal xemx diretta waqt l-inkubazzjoni.
15. Wara inkubazzjoni ta' 30 minuta, żid $50\ \mu\text{l}$ ta' Soluzzjoni li Twaqqaf ir-Reazzjoni tal-Enzima f'kull toqba fl-istess ordni li biha żdied is-substrat u ħallat sew b'500 sa 1000 rpm billi tuża shaker għal microplate.
16. Kejjel id-Densità Ottika (Optical Density, OD) ta' kull toqba fi żmien 5 minuti wara li tkun waqqaft ir-reazzjoni permezz tal-microplate reader mgħammar b'filtru ta' 450 nm u b'filtru ta' referenza ta' 620 nm sa 650 nm. Il-valuri OD jintużaw biex jiġu kkalkulati r-riżultati.

Kalkoli u Interpretazzjoni tat-Test

QuantiFERON-CMV Analysis Software, għall-analiżi ta' data mhux maħduma u l-kalkolu tar-riżultati, huwa disponibbli mingħand QIAGEN fuq www.QuantiFERON.com. Żgura li tintuża l-aktar verżjoni kurrenti tal-QF-CMV Analysis Software.

Is-softwer iwettaq valutazzjoni ta' Kontroll tal-Kwalità tal-assaġġ, jiġġenera kurva standard, u jagħti riżultat tat-test għal kull individwu, kif mogħti fid-dettall f'"Interpretazzjoni tar-Riżultati" fuq paġna 24. Is-softwer tal-analiżi jirrapporta d-dilwizzjoni l-aktar baxxa li tiġġenera riżultat fil-medda tal-QF-CMV ELISA, filwaqt li jieħu inkunsiderazzjoni l-fattur ta' dilwizzjoni.

Bħala alternattiva għall-użu tal-QF-CMV Analysis Software, ir-riżultati jistgħu jiġu stabbiliti skont il-metodu li ġej.

Ġenerazzjoni tal-Kurva Standard (jekk ma jintużax is-Softwer tal-Analiżi QF-CMV)

Iddetermina l-valuri medji OD tar-repliki tal-Kitt Standard fuq kull plejt.

Fassal kurva standard $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ billi tipplottja $\log_{(e)}$ tal-OD medji (assi y) kontra $\log_{(e)}$ tal-koncentrazzjoni IFN- γ tal-istandards f'IU/ml (assi x), u ħalli barra l-istandard żero minn dawn il-kalkoli. Ikkalkula l linja li toqgħod l-aħjar għall-kurva standard permezz tal-analiżi tar-rigressjoni.

Uża l-kurva standard biex tiddetermina l-koncentrazzjoni tal-IFN- γ (IU/ml) għal kull kampjun tal-plażma tat test, billi tuża l-valur OD ta' kull kampjun.

Dawn il-kalkoli jistgħu jitwettqu permezz tal-pakketti ta' softwer disponibbli mal-microplate readers, u software standard tal-ispreadsheets jew statistiku (bħal Microsoft® Excel®). Huwa rrakkomandat li dawn il pakketti jintużaw biex tikkalkula l-analiżi tar-rigressjoni, il-koeffiċjent tal-varjazzjoni (coefficient of variation, %CV) għall-istandards, u l-koeffiċjent ta' korrelazzjoni (r) tal-kurva standard.

Ir-riżultat irrapportat għandu jittieħda mid-dilwizzjoni l-aktar baxxa li tiġġenera riżultat fil-medda tal-QF-CMV ELISA, u għandu jiġi żgurat li jitqies il-fattur ta' dilwizzjoni fejn dan ikun applikabbli.

II-Kontroll tal-Kwalità tat-Test

Il-precizjoni tar-riżultati tat-test hija dipendenti fuq il-ġenerazzjoni ta' kurva standard preciza. Għalhekk, ir-riżultati dderivati mill-istandards għandhom jiġu eżaminati qabel ma riżultati tal-kampjuni tat-test jkunu jistgħu jiġu interpretati.

Sabiex ELISA tkun valida:

- Il-valur medju OD għal Standard 1 għandu jkun ≥ 0.600 .
- Il-%CV għall-valuri OD replikati ta' Standard 1 u Standard 2 għandu jkun $< 15\%$.
- Valuri ta' OD replikati għal Standard 3 u 4 m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 0.040 ta' unitajiet ta' densità ottika mill-medja tagħhom.
- Il-koeffiċjent ta' korrelazzjoni (r) ikkalkulat mill-valuri ta' assorbenza medji tal-istandards għandu jkun ≥ 0.98 .

II-QF-CMV Analysis Software jikkalkula u jirrapporta dawn il-parametri ta' kontroll tal-kwalità. Jekk il-kriterji msemmija hawn fuq ma jintlaħqux, it-test ma jkunx validu u għandu jiġi ripetut.

Il-valur medju OD għall-Istandard Żero (Dilwent Aħdar) għandu jkun ≤ 0.150 . Jekk il-valur OD medju huwa > 0.150 , il-proċedura ta' hasil tal-plejt għandha tiġi investigata.

Interpretazzjoni tar-Riżultati

Ir-riżultati ta' QuantiFERON-CMV huma interpretati permezz tal-kriterji f'Tabella 2.

Tabella 2. Interpretazzjoni tar-riżultati ta' QuantiFERON-CMV

Nil (IU/ml)	CMV nieqes Nil (IU/ml)	Mitoġenu nieqes Nil (IU/ml)*	Riżultat tal-QF-CMV	Rapport/Interpretazzjoni
≤8.0	≥0.20 u ≥25% ta' Nil	Kwalunkwe	Reattiv†	Immunità kontra CMV identifikata
	<0.20 JEW ≥0.20 u <25% ta' Nil	≥0.5	Mhux reattiv	Immunità kontra CMV MHUX identifikata
		<0.5	Indeterminat‡	Ir-riżultati huma indeterminati għal rispons għal CMV
>8.0§	Kwalunkwe	Kwalunkwe	Indeterminat‡	Ir-riżultati huma indeterminati għal rispons għal CMV

* Ir-risponsi għall-kontrolli pożittivi ta' Mitoġenu (u xi drabi antigens ta' CMV) jistgħu komunement ikunu 'l barra mill-medda tal microplate reader. Dan m'għandu l-ebda impatt fuq ir-riżultati kwalitattivi.

† Fejn tiġi ssuspettata infezzjoni b'citomegalovirus, riżultati ta' reattiv inizjalment jistgħu jiġu kkonfermati billi l-kampjuni tal-plażma oriġinali jerġgħu jiġu ttestjati f'duplikat fil-QF-CMV ELISA. Jekk ittestjar ripetut ta' wiehed jew iż-żewġ replikati jkun pożittiv, l-individwu għandu jitqies reattiv għat-test.

‡ Irreferi għal "Gwida għal Individwazzjoni ta' Soluzzjoni" (paġna 39) għal kawżi possibbli.

FI-istudji kliniċi (1), riżultat indeterminat fost pazjenti bi trapjant ta' organu solidu, fejn donatur ikun reattiv għal CMV iżda l-kontroll tal-Mitoġenu kien taħt 0.5 IU/ml, intwera li kien klinikament rilevanti. Pazjenti bħal dawn għandhom l-ogħla riskju li jiżviluppaw CMV.

§ FI-istudji kliniċi, inqas minn 0.25% tal-individwi kellhom livelli ta' IFN- γ levels ta' >8.0 IU/ml għall-valur Nil.

Nota: Il-livell imkejjel ta' IFN- γ għandu jintuża flimkien ma' preżentazzjoni klinika, storja medika u evalwazzjonijiet dijanjostiċi oħra meta jiġi stabbilit ir-rispons immuni għal antigens ta' CMV. QF-CMV mhuwiex test biex jiddetermina infezzjoni b'CMV u m'għandux jintuża biex jeskludi infezzjoni b'CMV.

Limitazzjonijiet

Ir-riżultati tat-testijiet ta' QuantiFERON-CMV għandhom jintużaw flimkien mal-istorja epidemjoloġika, l-istat mediku attwali, u evalwazzjonijiet dijanjostiċi oħra tal-individwu.

Riżultati mhux affidabbli jew inkonklussivi jistgħu jsejtnu minħabba:

- Devjazzjonijiet mill-proċedura deskritta fil-Fuljett ta' Tagħrif fil-Pakkett QuantiFERON-CMV ELISA
- Livelli eċċessivi ta' IFN- γ fit-tubu ta' kontroll
- Aktar minn 16-il siegħa bejn it-teħid tal-kampjun tad-demem u l-inkubazzjoni f'37°C.

Valuri Mistennija

Il-valuri IFN- γ mistennija bl-użu ta' QuantiFERON-CMV kienu miksuba mill-ittejtjar ta' 591 kampjun minn individwi b'saħħithom. 343 kampjun ittejtjaw seropożittivi u 248 kampjun ittejtjaw seronegattivi għal CMV IgG. L-istat tas-seroloġija tas-CMV ma kienx magħruf fiż-żmien meta sar l-ittejtjar tal-QF-CMV. Fil-248 kampjun mill-individwi seronegattivi għal CMV, 100% (248/248) tal-kampjuni ttejtjati ma wrew l-ebda reazzjoni mill-QF-CMV ELISA u pproduċew risponsi ta' IFN- γ ta' < 0.2 IU/ml għat-tubu ta' Antiġen ta' CMV (bin-Nil imnaqqas). Id-distribuzzjoni tar-risponsi ta' IFN- γ għat-tubu ta' Antiġen ta' CMV (bin-Nil imnaqqas) għal 343 individwu seropożittivi għal CMV hija murija (Figura 2).

Għadd ta' kampjuni

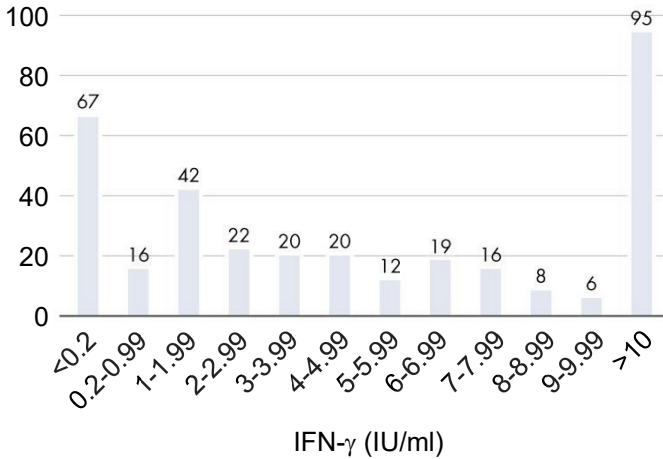


Figura 2. Distribuzzjoni ta' risponsi ta' IFN- γ għal QF-CMV (bin-Nil imnaqqas) f'individwi seropożittivi b'saħħithom (n = 343).

Id-distribuzzjoni ta' risponsi ta' IFN- γ għal Mitoġenu (bin-Nil imnaqqas) kienet iddeterminata bl-użu ta' 733 kampjun minn individwi adulti b'saħħithom bl-użu tal-QF-CMV ELISA, irrispettivament mis-seroloġija CMV IgG (Figura 3). Riżultat tal-Mitoġenu (bin-Nil imnaqqas) ta' inqas minn 0.5 IU/ml jindika jew li t-test falla jew li l-individwu huwa fi stat immunokompromess. F'popolazzjoni b'saħħitha kienu bis 2/733 li waqgħu f'din il-kategorija.

Għadd ta' kampjuni

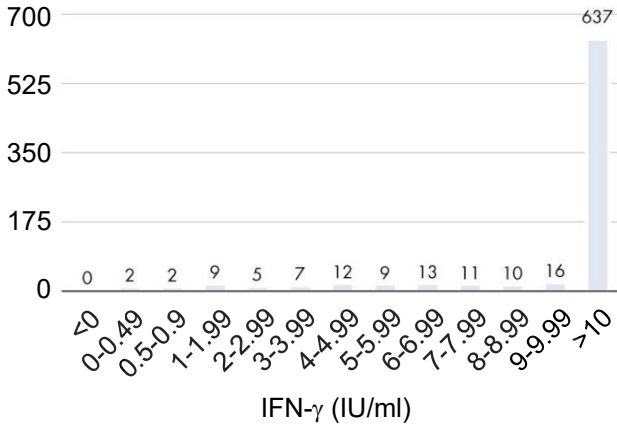


Figura 3. Distribuzzjoni tar-risponsi ta' IFN- γ ta' Mitoġenu (bin-Nil imnaqqas) f'individwi b'saħħithom (n = 733).

Id-distribuzzjoni ta' risponsi ta' IFN- γ għat-tubi Nil kienet iddeterminata bl-użu ta' 1020 kampjun tal-plażma minn individwi b'saħħithom bl-użu tal-QF CMV ELISA, irrispettivament mis-seroloġija CMV IgG (Figura 4).

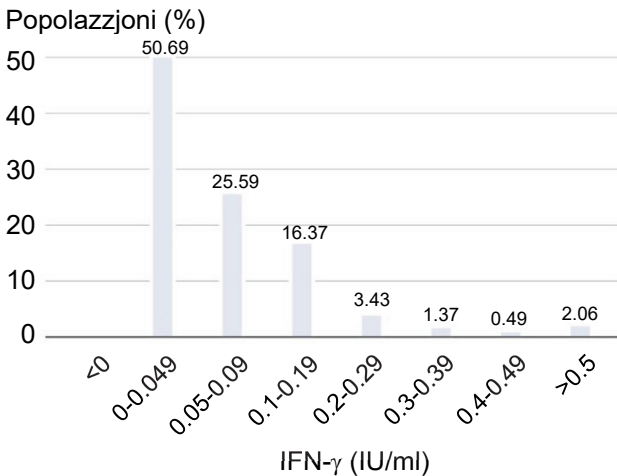


Figura 4. Distribuzzjoni tar-risponsi ta' IFN- γ ta' Nil f'individwi b'saħħithom (n = 1020) espressi bħala percentwal tal-popolazzjoni.

Karatteristiċi tal-Prestazzjoni

Prestazzjoni klinika

Referenza tat-test għad-detezzjoni ta' qabel l-esponiment għal CMV bl-użu ta' QF CMV kienet stabbilita wara l-analiżi tar-riżultati minn grupp ta' individwi b'saħħithom (n = 223) fejn ir-riżultati ta' QF CMV tqabblu mar-riżultati seroloġiċi ta' CMV IgG. Analizi ROC stabbilixxiet li referenza għat-test ta' 0.04 IU/ml (wara tnaqqis ta' nil) ipprovdiet l-aħjar valuri pożittivi u negattivi ta' previżjoni għal QF-CMV (erja taħt il kurva = 0.9679 [95%CI: 0.9442–0.9915, p < 0.0001]), u għalhekk irrapreżenta r-referenza li biha dan l-assaġġ wettaq l-użu maħsub għalih b'mod effettiv f'popolazzjoni ta' persuni b'saħħithom.

Il-prestazzjoni tal-assaġġ QF-CMV kienet imqabbla mat-test seroloġiku ta' SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). L-assaġġ QF CMV wera 95% (294/310 individwu) qbil mat-test seroloġiku ta' CMV IgG f'individwi b'saħħithom, bl-ebda wieħed mill-149 donatur seronegattiv ma juri xi reattività bi QFCMV. 145 minn 161 donatur seropożittiv juru rispons reattiv għal QF-CMV. Il-qbil globali pożittiv kien 90% b'valur ta' qbil negattiv ta' 100%. Il-livell ta' qbil f'individwi b'saħħithom bejn ir-risponsi QF-CMV u l-istat seroloġiku CMV IgG huwa muri f'Tabella 3.

Tabella 3. Qbil bejn QuantiFERON-CMV u t-test seroloġiku ta' CMV IgG f'individwi b'saħħithom

		Seroloġija ta' CMV		Total
		Pożittiv	Negattiv	
QuantiFERON-CMV	Reattiv	145	0	145 (46.8%)
	Mhux reattiv	16	149	165 (53.2%)
	Total	161 (51.9%)	149 (48.1%)	310 (100%)

Limitu tal-assaġġ

Il-limitu rakkomandat għat-test kliniku għal dan l-assaġġ huwa ta' 0.2 IU/ml fit-tubu ta' Antigen ta' CMV (bin-Nil imnaqqas), għalkemm jistgħu jiġu validati limiti differenti għal kontrolli kliniċi differenti.

Studji Kliniċi

Peress li m'hemmx standard definittiv biex tiġi kkonfermata jew ikkonfuta d-dijanjosi ta' infezzjoni b'citomegalovirus, stima ta' sensitività u speċifità ta' QF-CMV ma tistax tiġi evalwata b'mod prattiku. L-ispeċifità u s-sensittività ta' QF-CMV kienu approssimati bl-evalwazzjoni tal-livell ta' qbil bejn ir-risponsi QF-CMV u l-istat seroloġiku CMV IgG ta' individwi b'saħħithom.

L-ispeċifità ta' QF CMV kienet approssimata billi ġew evalwati r-rati pożittivi-foloz (rispons reattiv ta' QF CMV) f'kampjuni ta' donaturi b'saħħithom mingħajr ebda evidenza ta' esponiment minn qabel għal CMV (individwi seronegattivi għal CMV IgG). Is-sensittività ġiet approssimata billi ġew evalwati r-risponsi QF-CMV f'kampjuni ta' donaturi b'saħħithom mingħajr ebda evidenza ta' esponiment minn qabel għal CMV (individwi seronegattivi għal CMV IgG). QF-CMV juża numru kbir ta' epitopi speċifiċi għal CMV minn proteini CMV differenti, u għalhekk jagħti kopertura usa' tal-popolazzjoni b'haplotipi ta' HLA differenti tal-Klassi I (madwar 98% tal-popolazzjoni). Peress li l-haplotipi ta' HLA ta' individwi ttestjati kontra s-seroloġija ta' CMV ma kinux magħrufa, perċentwal żgħir ta' individwi seroloġikament pożittivi kienu mistennija li ma jirrispondux għat-Tubi tal-Ġbir tad-Demm ta' QF CMV.

Speċifità

Fi studju ta' 591 kampjun minn individwi b'saħħithom, ma ġie identifikat l-ebda riżultat ta' QF-CMV falz-pożittiv f'individwi li ttestjaw seronegattivi għal CMV IgG b'248/248 kampjun li ttestjaw mhux reattivi minn QF-CMV ELISA u negattivi minn test tas-seroloġija ta' CMV IgG. Għalhekk, ir-riżultati miskuba permezz ta' QF-CMV u tat-test ta' seroloġija ta' CMV IgG urew konformità ta' 100%.

Fl-evalwazzjonijiet tal-ispecificità l-oħrajn kollha li saru f'riċevituri ta' trapjanti ta' organu solidu (1-8), f'riċevituri ta' trapjanti ta' ċelluli staminali ematopejtiċi (9,10) u f'pazjenti infettati bl-HIV (11), il-qbil bejn QF-CMV u seroloġija CMV IgG intwera wkoll li kien 100%.

Sensittività

Fi studju mwettaq fi 343 kampjun minn individwi b'saħħithom li rriżultaw seropożittivi għal CMV IgG, il-livell ta' qbil bejn ir-risponsi QF-CMV u r-riżultati seroloġiċi CMV IgG kien ta' 80.5% b'276/343 kampjun li kienu reattivi għal QF-CMV u pożittivi għat-test seroloġiku CMV IgG. In-nuqqas ta' qbil osservat jista' jkun minħabba s-seroloġija CMV falza-pożittiva, jew in-nuqqas ta' tipi HLA risponsivi fl-individwi ttestjati.

Il-livelli ta' qbil fl-evalwazzjonijiet tas-sensittività mwettqa f'riċevituri ta' trapjanti ta' organi solidi (1–8), ir-riċevituri ta' trapjanti ta' ċelloli staminali ematopojetiči (9, 10) u pazjenti infettati bl-HIV (11), intwerew li huma aktar baxxi u jistgħu jkunu minħabba s-seroloġija CMV falza-pożittivi, in-nuqqas ta' tipi HLA risponsivi fl-individwi ttestjati, jew in-nuqqas ta' ċelloli T reattivi f'dawn il-pazjenti minħabba l-immunosuppressjoni tagħhom.

Studji li jenfasizzaw l'utilità klinika

Kemm is-seroloġija CMV IgG kif ukoll il-QF-CMV jiddeskrivu l-użu maħsub tagħhom bħala li jippermettu l-individwazzjoni ta' immunità għal CMV. F'każ ta' trapjanti, is-seroloġija ta' CMV tintuża b'mod komuni sabiex jiġi stabbilit ir-riskju ta' kumplikazzjonijiet ta' CMV li jseħħu fir-riċipjent wara t-trapjant, imma għandu valur limitat hu stess wara t-trapjant. Inkella, QF-CMV jista' jintuża f'reċipjenti ta' trapjant sabiex jiġi stmat il livell ta' immunità għal CMV f'dawk il-pazjenti li jinsabu f'riskju li jiżviluppaw infezzjoni sintomatika u/jew mard minħabba immunosoppressjoni (12-15).

Għadd ta' studji kliniċi ppubblikati f'diversi koorti tat-trapjant urew l-utilità ta' QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

Fi studju kbir ta' 108 riċevituri ta' trapjanti ta' organi solidi (4), pazjenti b'riżultat ta' QF-CMV reattiv fi tmiem il profilassi ta' anti-CMV kellhom rata aktar baxxa b'mod sinifikanti ta' mard CMV sussegwenti (3.3% jew 1/30; bl-użu ta' referenza ta' 0.2 IU/ml) meta mqabbla ma' pazjenti b'riżultat ta' QF-CMV mhux reattiv (21.8% jew 17/78, $p = 0.044$) (Figura 5).

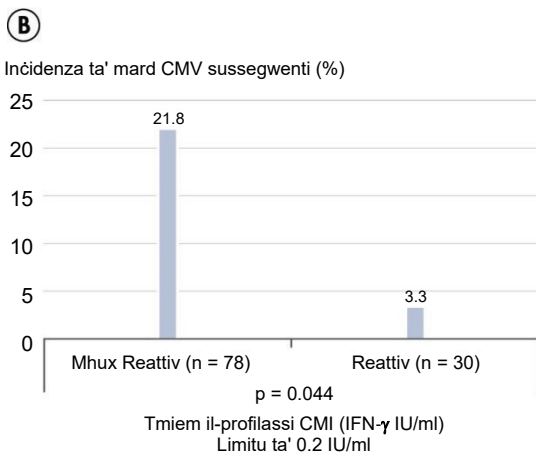
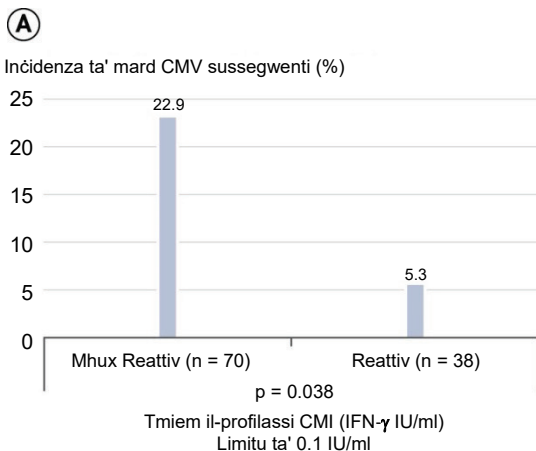


Figura 5. Rati ta' bidu tard tal-marda ta' CMV f'pazjenti b'riżultat ta' QuantiFERON-CMV Reactive kontra riżultat ta' QuantiFERON Mhux reattiv fi tmiem il-profilassi. Tagħrif riprodott minn Kumar et al. (4).

Barra minn hekk, riċevituri ta' trapjant seronegattivi għal CMV li jirċievu organu minn donatur pożittiv għal CMV (D+R-) b'riżultat reattiv ta' QF-CMV mat-tlestija tal-profilassi baqgħu ħielsa mill-mard ta' CMV aktar ta' spiss, u għal tul ta' żmien itwal, li jindika li QF-CMV jista' jintuża biex jidentifika dawk li jinsabu f'riskju li l marda tagħhom ta' CMV tiffaċċa tard.

Dan l-istudju enfasizza wkoll li f'din il-koorti ta' pazjenti li fuqhom sar trapjant fl-ogħla riskju li jiżviluppaw il mard ta' CMV (D+/R-), riżultat reattiv fi kwalunkwe ħin wara l-profilassi kien assoċjat ma' probabbiltà ogħla li jibqgħu ħielsa minn mard ta' CMV.

Fi studju fuq 37 pazjent li fuqhom sar trapjant ta' organu solidu (6) l-istima ta' risponsi speċifiċi għal CMV minn ċelluli-T CD8⁺ bi QF CMV għen fil-previżjoni ta' tneħħija virali spontanea meta mqabbel mal-progressjoni tal-marda ta' CMV, wara elevazzjonijiet minn viremja ta' CMV. F'dan l-istudju, 24/26 pazjent (92.3%) b'riżultat ta' QF CMV reattiv (bl-użu ta' referenza tat-test ta' ≥ 0.2 IU/ml IFN- γ), spontanjament neħħew il-virus ta' CMV filwaqt li 5/11 biss (45.5%) ta' pazjenti b'riżultat ta' QF-CMV mhux reattiv kellhom l istess eżitu.

Studju ta' 67 riċevitur ta' trapjant tal-pulmun li fih ġew ivvalutati episodji ta' viremja ta' CMV wara t trapjant (7), wera li 18/25 (72%) ta' episodji ta' viremja ta' CMV kienu preċeduti minn riżultat ta' QF-CMV mhux reattiv, kontra 4/16 (25%) ta' episodji li kienu preċeduti minn rispons ta' QF-CMV reattiv (test eżatt ta' Fischer, $p = 0.0046$, Figura 6).

% ta' episodji ta' DNAemija ta' HCMV
b'tagħbija virali ta' > 1000 kopja/ml

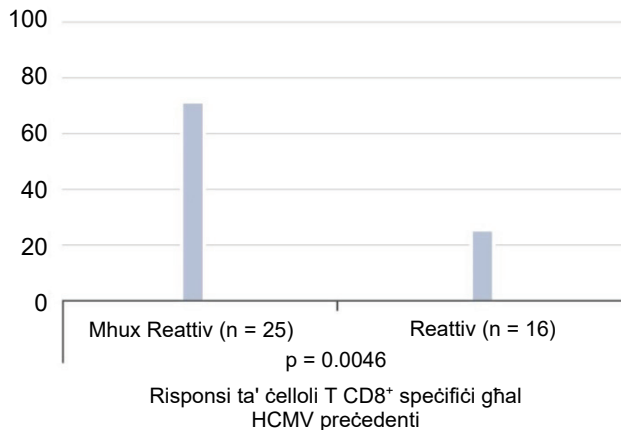


Figura 6. Analiżi statistika ta' risponsi speċifiċi minn ċelluli T CD8⁺ speċifiċi għal CMV kif intraċċati minn QuantiFERON-CMV u l-iżvilupp ta' viremja ta' CMV (test eżatt ta' Fischer, p = 0.0046). Tagħrif riprodott minn Weseslindner et al (7).

Fi studju multicentriku prospettiv kbir b'127 riċevitur seronegattiv għal CMV li rċewew trapjant ta' organu solidu minn donatur seropożittiv għal CMV (8), li lkoll kemm huma rċewew profilassi antivirali, intwera li pazjenti b'riżultat ta' QF CMV reattiv (permezz ta' referenza ta' test ta' 0.1 IU/ml) fi kwalunkwe punt ta' żmien wara t-tlestija ta' profilassi ta' anti-CMV kellhom rata aktar baxxa b'mod sinifikanti ta' bidu tard tal-mard ta' sa 12-il xahar wara t-trapjant (6.4%), meta mqabbla ma' dawk li ħadu riżultat ta' QF-CMV mhux reattiv (22.2%) u riżultat inkonklusiv (58.3%, $p < 0.001$). Meta riżultati inkonklusivi jiġu kklasifikati wkoll bħala "mhux reattivi", l-inċidenza ta' mard sussegwenti ta' CMV kien ta' 6.4% kontra 26.8%, $p = 0.024$. Il-valuri ta' previżjoni pożittivi u negattivi ta' QF-CMV għall-protezzjoni minn mard ta' CMV kienu rapportati li kienu 0.90 (95% CI 0.74–0.98) u 0.27 (95% CI 0.18–0.37) rispettivament. Dan l-istudju wera li QF-CMV jista' jkun utli biex jipprevedi jekk pazjent hux f'riskju baxx, intermedju, jew għoli li jiżviluppa mard sussegwenti ta' CMV wara l-profilassi.

Fi studju prospettiv b'55 riċevitur ta' trapjant ta' organu solidu (8) fejn ir-relazzjoni bejn ir-riżultati ta' QF-CMV ta' qabel it-trapjant u episodju ta' replikazzjoni ta' CMV ta' wara t-trapjant ġiet analizzata, instab li kien hemm inċidenza oġhla ta' replikazzjoni ta' CMV ta' wara t-trapjant f'riċevituri seropożittivi għal CMV b'riżultat ta' qabel it-trapjant ta' QF-CMV (bl-użu ta' referenza tat-test ta' 0.2 IU/ml) mhux reattiv (7/14 jew 50%), meta mqabbla ma' dawk ta' riċevituri seropożittivi għal CMV b'riżultat ta' qabel it-trapjant ta' QF CMV reattiv (4/30 jew 13.3%, $p = 0.021$).

Dan l-istudju sab li riċevituri b'rispons ta' qabel it-trapjant ta' QF-CMV mhux reattiv li rċevew organu minn donatur seropożittiv għal CMV kellhom riskju għaxar darbiet ikbar li jerġa' jkollhom CMV mqabbla ma' dawk ir-riċevituri b'rispons ta' qabel it-trapjant ta' QF-CMV reattiv (OR aġġustat 10.49, 95% CI 1.88–58.46). Għalhekk, assaġġ ta' qabel it-trapjant ta' QF-CMV jista' jgħin fil-previżjoni tar-riskju li terġa' tfeġġ CMV wara t-trapjant u jippermetti li jiġi identifikat kif tista' tiġi ġestita infezzjoni ta' CMV wara trapjant ta' organu solidu.

Għadd ta' studji oħra li stħarrġu ir-rispons ta' ċelluli T CD8⁺ speċifiki għal CMV bi QF-CMV f'koorti ta' reċipjenti ta' trapjant tlestew (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) jew attwalment jinsabu għadejjin madwar id-dinja kollha.

Linji gwida ta' kunsens internazzjonali dwar il-ġestjoni ta' ċitomegalovirus fi trapjanti ta' organi solidi

L-importanza ta' monitoraġġ immuni speċifiku għal CMV ġie rikonoxxut u ppubblikat fil-*Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Linji Gwida ta' Kunsens Internazzjonali Aġġornati dwar il-Ġestjoni ta' Ċitomegalovirus fi Trapjanti ta' Organi Solidi) (12). Dawn il-linji gwida internazzjonali, żviluppata minn bord ta' esperti fuq CMV u trapjanti ta' organi solidi, intlaqgħu mit-Taqsima tal-Mard Infezzjuż tas-Socjetà tat-Trapjanti, jirrapreżentaw kunsens dwar linji gwida bażata fuq evidenza u fehma esperta fil-ġestjoni ta' CMV li jinkludi: dijanjostika, immunoloġija, prevenzjoni, u trattament.

Dawn il-linji gwida kkonkludew li “Monitoraġġ immuni ta' risponsi taċ-ċelluli T speċifiċi għal CMV jistgħu jipprevedu individwi li jkunu friskju ta' mard ta' CMV wara t-trapjant u jistgħu jkunu utli fil-gwida ta' profilassi u terapiji preventivi” (12).

Barra minn hekk, il-linji gwida pprovdew ukoll rakkomandazzjonijiet dwar l-attribwiti tal-assaġġ għal monitoraġġ ideali, li kien jinkludi:

- Il-kapaċità li tiġi assessjata l-kwantità u l-funzjoni ta' ċelluli T CD4⁺ u CD8⁺ ta' reċipjent ta' trapjant.
- Il-kapaċità li titkejjel IFN- γ
- Faċli biex jithaddem, kost-effikaċi, u riproducibbli
- Għandu żmien ta' rotazzjoni rapidu
- Jippermetti li l-kampjuni jiġu trasportati faċilment lejn laboratorji ta' riferiment speċjalizzati

QF CMV jissodisfa kważi l-kriterji kollha speċifikati minn dawn il-linji gwida, u jirrapreżenta l-uniku assaġġ immuni, standardizzat, li kapaċi jintraċċa IFN- γ , speċifiku għal CMV.

Karatteristiċi ta' Prestazzjoni tal-Assaġġ

Il-QF CMV ELISA juża standard ta' IFN- γ uman rikombinati, li jista' jkun assaġġjat kontra preparazzjoni ta' IFN- γ ta' referenza (Ref NIH: Gxg01-902-535). Ir-riżultati għall-kampjuni tat-test huma rrapportati f'Unitajiet Internazzjonali (International Units, IU) relatati ma' kurva standard ippreparata bl-ittestjar tad-dilwizzjoni tal-istandard sekondarju pprovdut mal-kitt.

Antikorpi eterofili (eż., kontra l-ġrieden tal-bniedem) fis-serum jew il-plażma ta' ċerti individwi huma magħrufin li jikkawżaw interferenza mal-immunoassaġġi. L-effett tal-antikorpi eterofili fil-QF-CMV ELISA jitnaqqas billi jiżdied serum normali tal-ġrieden mad-Dilwent Añdar u bl-użu ta' frammenti ta' antikorpi monoklonali F(ab')₂ bħala l-antikorp li jaqbad l-IFN- γ li jiksu r-reċipjenti tal-mikropjastri.

Il-limitu tad-detezzjoni tal-QF CMV ELISA huwa ta' 0.065 IU/ml, u m'hemm ebda evidenza ta' effett ganċ minħabba doża għolja (prozone) b'konċentrazzjonijiet ta' IFN- γ sa 10,000 IU/ml. L-antikorpi tal-QF-CMV ELISA wrew li ma għandhomx reazzjoni inkroċjata ma' kwalunkwe wieħed miċ-ċitokini ttestjati, li jinkludu IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10, u IL12.

Il-QF CMV ELISA ntweriet li hija lineari billi tqiegħed 5 replikati ta' 11 il kollezzjoni ta' plazma ta' konċentrazzjonijiet magħrufa ta' IFN- γ b'mod każwali fuq il-plejt tal-ELISA. Il-linja ta' rigressjoni lineari għandha inklinazzjoni ta' 1.002 ± 0.011 u koeffiċjent ta' korelazzjoni ta' 0.99 (Figura 7).

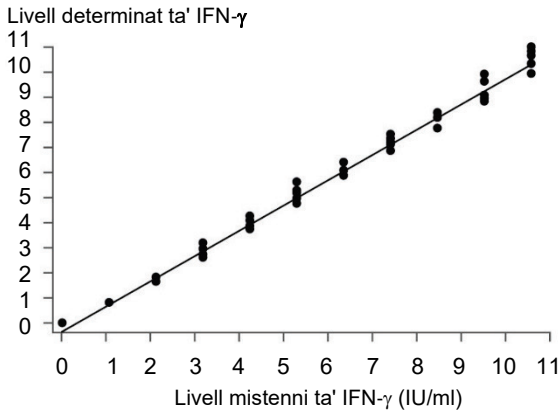


Figura 7. Profil ta' linearità ta' QF CMV ELISA li sar billi ġew testjati 5 replikati ta' 11 il kollezzjoni ta' plazma ta' konċentrazzjonijiet magħrufa ta' IFN- γ .

Ir-riproduċibbiltà tal-QF-CMV ELISA ġiet stmata billi ġew ittestjati 20 kampjun tal-plażma b'konċentrazzjonijiet tal-IFN- γ li varjaw f'replikati ta' tlieta, fi tliet laboratorji, fi tlett ijiem mhux konsekuttivi, minn tliet operatori. Għalhekk kull kampjun kien ittestjat 27 darba, f'9 ċikli ta' analiżi indipendenti. Kampjun wieħed kien kontrol Nil u kellu konċentrazzjoni kkalkulata ta' IFN- γ ta' 0.08 (95% CI 0.07–0.09) IU/ml. Mid-19-il kampjun ta' plazma li fadal, il-firxa ta' konċentrazzjonijiet kienet minn 0.33 (95% CI 0.31–0.34) sa 7.7 IU/ml (95% CI 7.48–7.92).

Impreċiżjoni fi ħdan ċiklu jew fi ħdan assaġġ kienet stmata billi ttieħdet il-medja tal-%CV għal kull plazma tat test li kien fih IFN- γ minn kull ċiklu tal-platt ($n = 9$) u kienet tvarja minn 4.1 sa 9.1%CV. Il-medja fi ħdan ċiklu ta' %CV ($\pm 95\%$ CI) kienet $6.6 \pm 0.6\%$. L-IFN- γ fil-plażma żero kellha medja ta' 14.1%CV.

L impreċiżjoni totali jew bejn assaġġ u ieħor kienet stabbilita billi ġew mqabbla s 27 konċentrazzjoni kkalkulata ta' IFN- γ għal kull kampjun ta' plazma u kienet mifruxa bejn 6.6 sa 12.3%CV. Il-medja globali ta' %CV ($\pm 95\%$ CI) kienet ta' $8.7 \pm 0.7\%$. L-IFN- γ fil-plażma

żero kellha medja ta' 26.1%CV. Dan il-livell ta' varjazzjoni għandu jkun mistenni minhabba li l-koncentrazzjoni kkalkulata ta' IFN- γ hija baxxa u l-varjazzjoni madwar stima baxxa ta' koncentrazzjoni tkun akbar minn dik għal koncentrazzjonijiet oġhla.

Informazzjoni Teknika

Riżultati indeterminati

Riżultati indeterminati jistgħu jkunu marbuta mal-istat immuni tal-individwu li qed jiġi ttestjat, imma jistgħu jkunu relatati ma għadd ta' fatturi tekniċi:

- Aktar minn 16-il siegħa minn meta ngħibed il-kampjun tad-demem għal 37°C
- Fżin tad-demem barra mill-medda tat-temperatura rakkomandata (22 C \pm 5°C)
- Taħlit insuffiċjenti tat-tubi tal-ġbir tad-demem
- Hasil mhux komput tal-plejt ta' ELISA

Jekk jiġu suspettati kwistjonijiet tekniċi bil-ġbir jew il-ġestjoni ta' kampjuni ta' demem, irrepeti t-test kollu ta' QF CMV, b'kampjuni tad-demem ġodda. Ir-repetizzjoni tat-test ta' ELISA ta' plażma stimulat jista' jsir jekk ikun suspettat li jkun hemm devjazzjoni proċedurali bit-test ta' ELISA. Riżultati indeterminati (minn valuri baxxi ta' Mitogenu) mhux mistennija li jinbidlu malli jiġu ripetuti għajr meta jkun hemm errur bl-ittestjar ta' ELISA.

Kampjuni tal-plażma bl-emboli

Jekk isefñu emboli tal-fibrina mal-ħżin fit-tul tal-kampjuni tal-plażma, iċcentrifuga l-kampjuni sabiex twaqqa' l-emboli u tiffaċilita l-ippipettar tal-plażma.

Gwida għal Individwazzjoni ta' Soluzzjoni

Din il-gwida ta' individwazzjoni ta' soluzzjoni tista' tkun utli biex issolvi kwalunkwe problema li tista' tinħoloq. Għal aktar tagħrif, ara wkoll l-Infurmazzjoni Teknika pprovduta fuq www.QuantiFERON.com. Għal infurmazzjoni ta' kuntatt tas-servizz tekniku, ara l-qoxra ta' wara.

Kummenti u suġġerimenti

Qari ta' densità ottika baxxa għall-istandards

- | | |
|---|---|
| a) Żball fid-dilwizzjoni standard | Żgura li d-dilwizzjonijiet tal-Kitt Standard jithejjew b'mod korrett skont il-QF-CMV ELISA Fuljett ta' Tagħrif fil-Pakkett. |
| b) Żball fil-pipetta | Żgura li l-pipetti jkunu kkalibrati u jintużaw skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur. |
| c) It-temperatura tal-inkubazzjoni baxxa wisq | L-inkubazzjoni ta' ELISA għandha ssir f'temperatura ambjentali ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). |
| d) Iż-żmien tal-inkubazzjoni qasir wisq | L-inkubazzjoni tal-plejt mal-konjugat, mal-istandards u mal-kampjuni għandha ssir għal 120 ± 5 minuti. Is-Soluzzjoni ta' Substrat tal-Enzima hija inkubata fuq il-plejt għal 30 minuta. |
| e) Intuża filtru tar-reader tal-plejt mhux tajjeb | Il-plejt għandu jaqra f'450 nm b'filtru ta' referenza bejn 620 u 650 nm. |
| f) Ir-reagenti keshin wisq | Ir-reagenti kollha, ħlief il-Konjugat 100x Konċentrat, għandhom joqogħdu għal temperatura ambjentali qabel il-bidu tal-assaġġ. Dan jiehū madwar siegħa. |
| g) Il-kitt/komponenti skada/ew | Żgura li l-kitt jintuża qabel id-data ta' skadenza. Żgura li l-Istandards u Konjugat 100x Konċentrat rikostitwiti jintużaw fi żmien 3 xhur mid-data ta' rikostituzzjoni. |

Żvilupp ta' kulur mhux speċifiku

- | | |
|---|--|
| a) Hasil mhux komplut tal-plejt | Aħsel il-plejt tal-anqas sitt darbiet b'400 μl /toqba ta' wash buffer. Jistgħu jkunu meħtieġa aktar minn sitt ċikli ta' tlaħħil skont il-washer li jkun qed jintuża. Għandu jintuża perjodu ta' tlaħħil ta' mill-inqas 5 sekondi bejn kull ċiklu. |
| b) Kontaminazzjoni kroċjata tat-toqob ta' ELISA | Oqgħod attent meta tippipetta u thallat il-kampjun sabiex tnaqqas ir-riskji. |
| c) Il-kitt/komponenti skadew | Żgura li l-kitt jintuża qabel id-data ta' skadenza. Żgura li l-Istandards u Konjugat 100x Konċentrat rikostitwiti jintużaw fi żmien 3 xhur mid-data ta' rikostituzzjoni. |

Kummenti u suġġerimenti

- | | |
|---|--|
| d) Is-Soluzzjoni tas-Substrat tal-Enzima hija kkontaminata | Armi s-substrat jekk ikun hemm kulurament blu. Żgura li jintużaw reċipjenti tar-reaġenti nodfa. |
| e) Taħlit ta' plażma fit-tubi taċ-ċentrufugar qabel il-ħsad | Żgura li l-kampjuni ta' plażma jinħażnu b'attenzjoni 'l fuq mill-ġell mingħajr pipettar 'il fuq u 'l isfel, billi tingħata attenzjoni biex ma jiġix disturbat il-materjal li jinsab fil-wiċċ tal-ġell. |

Sfond għoli

- | | |
|--|--|
| a) Fasil mhux komplut tal-plejt | Aħsel il-plejt tal-anqas sitt darbiet b'400 µl/toqba ta' wash buffer. Jistgħu jkunu meħtieġa aktar minn sitt ċikli ta' tlaħlil skont il-washer li jkun qed jintuża. Għandu jintuża perjodu ta' tlaħlil ta' mill-inqas 5 sekondi bejn kull ċiklu. |
| b) Temperatura tal-inkubazzjoni għolja wisq | L-inkubazzjoni ta' ELISA għandha titwettaq f'temperatura ambjentali (22 C ± 5°C). |
| c) Il-kitt/komponenti skadew | Żgura li l-kitt jintuża qabel id-data ta' skadenza. Żgura li l-Istandards u Konjugat 100x Konċentrat rikostitwit jintużaw fi żmien 3 xhur mid-data ta' rikostituzzjoni. |
| d) Is-Soluzzjoni tas-Substrat tal-Enzima hija kkontaminata | Armi s-substrat jekk ikun hemm kulurament blu. Żgura li jintużaw reċipjenti tar-reaġenti nodfa. |

Kurva standard mhux lineari u varjabilità fid-duplikati

- | | |
|---|--|
| a) Fasil mhux komplut tal-plejt | Aħsel il-plejt tal-anqas sitt darbiet b'400 µl/toqba ta' wash buffer. Jistgħu jkunu meħtieġa aktar minn sitt ċikli ta' tlaħlil skont il-washer li jkun qed jintuża. Għandu jintuża perjodu ta' tlaħlil ta' mill-inqas 5 sekondi bejn kull ċiklu. |
| b) Żball fid-dilwizzjoni tal-istandard | Żgura li d-dilwizzjonijiet tal-kit standard ikunu ppreparati korrettament skont dan il Fuljett ta' Tagħrif fil-Pakkett. |
| c) Taħlit mhux tajjeb | Fallat ir-reaġenti sew billi taqlibhom rashom 'l isfel jew b'movimenti qosra rotatorji qabel ma żżidhom mal-plejt. |
| d) Teknika ta' pipettar inkonsistenti jew interruzzjoni matul il-preparazzjoni tal-assaġġ | Iż-żieda tal-kampjuni u tal-istandard għandha titwettaq f'mod kontinwu. Ir-reaġenti kollha għandhom jithejjew qabel jibda l-assaġġ. |

Informazzjoni dwar il-prodott u linji gwida tekniċi huma disponibbli bla ħlas minn QIAGEN, mid-distributur tiegħek, jew billi żżur www.QuantiFERON.com.














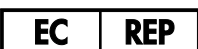
Referenzi

1. Manuel, O., et al. (2013) Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 56, 817.
2. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* 9, 165.
3. Westall, G.P., et al. (2008) Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8⁺ T cell immunity. *Am. J. Transplant.* 8, 1749.
4. Kumar, D., et al. (2009) Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transpl.* 9, 1214.
5. Lachmanova, A.I., et al. (2010) QuantiFERON-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* 42, 3574.
6. Lisboa, L.F., et al. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplant.* 93, 195.
7. Weseslindtner, L., et al. (2012) Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8⁺ T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 12, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8⁺ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 738.
9. Fleming, T., et al. (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish Hospital. *J. Med. Virol.* 82, 433.
10. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific interferon-producing CD8⁺ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 791.

-
11. Singh, K.P., et al. (2007) Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4⁺ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* 124, 200.
 12. Kotton, C.N., et al. (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant.* 96, 333.
 13. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 711.
 14. Torre-Cisneros, J., et al. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 735.
 15. Giulieri, S., Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 11, 17.
 16. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76.

Simboli

Jistgħu jidhru s-simboli li ġejjin fuq l-imballaġġ jew it-tikkettar:

Simbolu	Definizzjoni tas-simbolu
	Fih reaġenti biżżejjed għal reazzjonijiet għal <N>
	Uża sa
	Marka CE
	Apparat mediku dijanjostiku in vitro
	Numru tal-katalogu
	Numru tal-lott
	Numru tal-materjal
	Numru tal-Ogġett tal-Kummerċ Globali
	Limitazzjoni tat-temperatura
	Tergax tuża'
	Żomm 'il bogħod mid-dawl tax-xemx
	Ikkonsulta l-istruzzjonijiet għall-użu
	Manifattur
	Rappreżentant awtorizzat fil-Komunità Ewropea

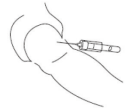
Informazzjoni ta' Kuntatt

Għal assistenza teknika u aktar informazzjoni, jekk jogħġbok ara ċ-Ċentru tal-Appoġġ Tekniku tagħna fuq www.qiagen.com/Support, ċempel 00800-22-44-6000, jew ikkuntattja lil wieħed mid-Dipartimenti tas-Servizz Tekniku ta' QIAGEN jew id-distributuri lokali (ara l-qoxra ta' wara jew żur www.qiagen.com).

Proċedura tat-Test ta' ELISA fil-Qosor

Stadju 1: Inkubazzjoni tad-demm

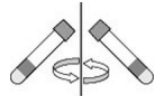
1. Iġbor id-demm tal-pazjent f'tubi tal-ġbir tad-demm u ħallat billi tħawwadhom għal għaxar (10) darbiet iżda b'saħħa biżżejjed li tiżgura li l-wiċċ sfiħ ta' ġewwa tat tubu jkun miksi bid-demm, sabiex jinħallu l-antigeni fuq il-ħitan tat-tubu.



2. Inkuba t-tubi weqfin f $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ għal 16 sa 24 siegħa.



3. Wara l-inkubazzjoni, iċċentrifuga t tubi għal madwar 15-il minuta f'2000–3000 RCF (g) sabiex tissepara l-plażma u ċ-ċelluli ħomor.



4. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, evita li tippipetta 'l fuq jew 'l isfel jew tħallat il-plażma b'xi mod ieħor qabel il-ħsad. Fi kwalunkwe ħin, oqgħod attent li ma tiddisturbax materjal fuq il-wiċċ tal-ġell.



Stadju 2: IFN- γ ELISA

1. Ekwilibra l-komponenti ta' ELISA, minbarra l-Konjugat 100x Konċentrat, f'temperatura ambjentali għal mill-inqas 60 minuta.

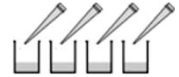


2. Irrikostitwixxi mill-ġdid l-Kitt Standard għal 8.0 IU/ml b'ilma distillat jew dejonizzat. Ipprepara erba' (4) dilwizzjonijiet standard.



3. Irrikostitwixxi l-Konjugat 100x Konċentrat lijoġfllizzat b'ilma distillat jew dejonizzat.

4. Ipprepara l-konjugat b'qawwa li s soltu taħdem biha fid-Dilwent Aħdar u žid 50 μ l fit-toqob kollha.



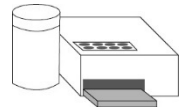
5. Žid 50 μ l ta' kampjuni ta' plazma tat-test u standards ta' 50 μ l lit-toqob xierqa. Ħallat bix-shaker.



6. Inkuba għal 120 minuta f'temperatura tal-kamra.



7. Aħsel il-plejt tal-anqas 6 darbiet b'400 μ l/toqba tal-wash buffer.



8. Žid 100 μ l Soluzzjoni ta' Substrat tal-Enzimi ġot-toqob. Ħallat bix-shaker.



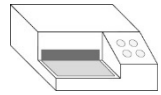
9. Inkuba għal 30 minuta f'temperatura ambjentali.



10. Žid 50 μ l Soluzzjoni li Twaqqaf l-Enzima fit-toqob kollha. Ħallat bix-shaker.



11. Aqra r-riżultati f'450 nm b'filtru ta' referenza ta' bejn 620 u 650 nm



12. Analizza r-riżultati.



Storja ta' Revizjoni tal-Manwal

Dokument	Tibdil	Data
L1075110-R5	Žieda ta' informazzjoni dwar is-sigurtà fir-rigward ta' kunjetti miksurin Aġġornamenti f' Tabella 2, Intepretazzjoni ta' riżultati ta' QF-CMV, paġna 24.	Frar 2018
L1075110-R5	Informazzjoni dwar GHS aġġornata, paġna 10.	Frar 2018

Din il-paġna thalliet vojta apposta

Din il-paġna thalliet vojta apposta

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); Excel®, Microsoft® (Microsoft); ProClin® (Rohm and Haas Co.); SeraQuest™ (Quest International, Inc.).

Ftehim għall-Fruġ ta' Liċenzji Limitati għal QuantiFERON-CMV ELISA

L-użu ta' dan il-prodott ifisser li kwalunkwe xerrej jew utent tal-prodott jaqbel mat-termini li ġejjin:

1. Il-prodott jista' jintuża biss skont il-protokollu pprovduti mal-prodott u dan il-manwal u għall-użu mal-komponenti li jinsabu fil-panell biss. QIAGEN ma tagħti l-ebda liċenzja, taht l-ebda proprjetà intellettuali tagħha, biex wiehed juża jew jinkorpora l-komponenti f'dan il-panell ma' kwalunkwe komponent li ma jkunx inkluż f'dan il-panell, hlief kif deskritt fil-protokollu pprovduti mal-prodott, f'dan il-manwal, u fi protokollu addizzjonali disponibbli fuq www.qiagen.com. Uhud minn dawn il-protokollu addizzjonali ġew ipprovduti mill-utenti ta' QIAGEN għall-utenti ta' QIAGEN. Dawn il-protokollu ma gewx ittestjati jew ottimizzati bir-reqqa minn QIAGEN. QIAGEN la tiggarrantixxihom u lanqas ma titlob li dawn ma jksrux id-drittijiet ta' partijiet terzi.
2. Għajr il-liċenzji ddkjarati espressament, QIAGEN ma titlobx li dan il-panell u/jew l-użu(i) tiegħu ma jksrux id-drittijiet ta' partijiet terzi.
3. Dan il-panell u l-komponenti tiegħu huma liċenzjati għal użu ta' darba u ma jstgħux jergġħu jintużaw, jinbidlu jew jergġħu jinbigħu.
4. QIAGEN speċifikament tirrinunzja kwalunkwe liċenzja oħra, espressa jew implicita għajr dawk iddikjarati espressament.
5. Ix-xerrej u l-utent tal-panell jaqblu li ma jiddux jew ma jhallu lil hadd jieħu xi pass li jista' jwassal għal jew jiffaċilita kwalunkwe att ipprobit hawn fuq, QIAGEN tista' tinforza l-projbizzjonijiet ta' dan il-Ftehim għall-Fruġ ta' Liċenzji Limitati fi kwalunkwe Qorti, u għandha tkopri l-ispejjeż investigattivi u tal-Qorti kollha tagħha, inklużi t-tariffi tal-avukat, fi kwalunkwe azzjoni biex jiġi inforzat dan il-Ftehim għall-Fruġ ta' Liċenzji Limitati jew kwalunkwe wiehed mid-drittijiet ta' proprjetà intellettuali tagħha li jirrelata mal-panell u/jew mal-komponenti tiegħu.

Għal termini tal-liċenzja aġġornati, ara www.qiagen.com.

Frar-18 © 2018 QIAGEN, kull dritt huwa riżervat.

Ordnijet www.qiagen.com/shop | Appoġġ Tekniku support.qiagen.com | Sit web www.qiagen.com