

Ottubru 2019

Fuljett ta' Tagħrif ta' QuantiFERON[®]-CMV ELISA



It-test tal-IFN- γ tad-demmm sħiħ li jkejjel ir-risponsi għall-antigeni tal-peptidi taċ-Ċitomegalovirus Uman



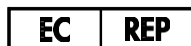
Għal użu dijanjostiku in vitro



0350-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, I-Istati Uniti +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
IL-ĠERMANJA

1075110 Rev. 06



www.QuantiFERON.com

Kontenut

Użu Maħsub	5
Sommarju u Spjegazzjoni.....	5
Prinċipju tal-Proċedura	6
Il-ħin meħtieġ biex jitwettaq l-assaġġ	7
Materjali l-provduti	8
Kontenut tal-kitt	8
Materjali Meħtieġa iżda Mhux l-provduti	9
Twissijiet u Prekawzjonijiet	9
Informazzjoni dwar is-sigurtà.....	11
Hażna u Ġestjoni tar-Reaġenti	12
Ġbir u Ġestjoni tal-Kampjuni.....	13
Proċedura.....	16
Stadju 1: Inkubazzjoni tad-demm u ġbir tal-plażma.....	16
Stadju 2: QuantiFERON-CMV ELISA għall-IFN- γ uman.....	17
Kalkoli u Interpretazzjoni tat-Test	22
Ġenerazzjoni ta' kurva standard (jekk ma jintużax il-QF-CMV Analysis Software).....	22
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
Speċificità	29
Sensittività	30
Studji li jenfazzjaw l-utilità klinika	30
Linji gwida ta' kunsens internazzjonali dwar il-ġestjoni taċ-ċitomegalovirus fit-trapjant ta' organi solidi	35
Karatteristiċi tal-Prestazzjoni tal-Assaġġ	36
Informazzjoni Teknika.....	38
Riżultati indeterminati	38
Kampjuni tal-plażma magħquda.....	38
Gwida għas-Soluzzjoni tal-Problemi.....	39
Referenzi	41
Simboli.....	43
Informazzjoni ta' Kuntatt	44
Proċedura Mqassra tat-Test ELISA	45
Stadju 1: Inkubazzjoni tad-demmm	45
Stadju 2: IFN- γ ELISA	45
Kronoloġija tar-Revizjonijiet tal-Manwal.....	48

Użu Maħsub

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) huwa assaġġ in vitro li juża taħlita ta' peptidi li tissimula l-proteini ta' ċitomegalovirus uman (CMV) biex tistimula ċ-ċelloli fid-demm sħiħ eparinizzati. L-iskoperta ta' interferon-gamma (IFN- γ) permezz ta' assaġġ immunosorbenti marbut ma' enzimi (ELISA) tintuża biex tikkwantifika r-risponsi in vitro għal dawn l-antiġeni peptidiċi assoċjati mal-kontroll immuni tal-infezzjoni tas-CMV. It-telf ta' din il-funzjoni immuni jista' jkun assoċjat mal-iżvilupp tal-marda tas-CMV. L-użu maħsub tal-QF-CMV huwa li jimmonitorja l-livell ta' immunità kontra s-CMV ta' pazjent.

Il-QF-CMV mhuwiex test biex tiġi ddeterminata l-infezzjoni tas-CMV u m'għandux jintuża biex tiġi eskluża l-infezzjoni tas-CMV.

Sommarju u Spjegazzjoni

Is-CMV huwa virus tal-herpes li jinfetta bejn 50–85% tal-popolazzjoni adulta. Hija kumplikazzjoni tal-immunosoppressjoni li sseħħ ta' spiss, partikolarment wara trapjant, u tista' tikkontribwixxi b'mod sinifikanti għall-morbidità u l-mortalità fir-riċevituri ta' trapjant. It-terapija immunosoppressivi attwali użati biex jipprevjenu r-rifjut ta' organu trapjantat għandhom effetti detrimentali fuq il-limfoċiti T u r-risponsi immuni medjati miċ-ċelloli (CMI), li jirriżultaw f'suxxettibilità akbar għal infezzjonijiet virali wara t-trapjant. L-importanza tal-funzjoni ta' ċelluli T fis-soppressjoni tar-replikazzjoni tas-CMV hija enfasizzata wkoll mill-fatt li l-limfoċiti T ċitotossiċi (CTLs) speċifiċi għas-CMV CD8+ jistgħu jiproteġu kontra l-patoġenesi assoċjata mal-virus. L-enumerazzjoni tas-CTLs speċifiċi għas-CD8⁺ CMV f'pazjenti immunosoppressi u l-produzzjoni tal-IFN- γ jistgħu jkun ta' tbassir għar-riskju li tiżviluppa l-marda tas-CMV. Il-produzzjoni tal-IFN- γ tista' tkun surrogat funzjonali għall-identifikazzjoni ta' CTLs speċifiċi għas-CMV.

Il-QF-CMV huwa assaġġ għar-risponsi tas-CMI għall-antiġeni tal-peptidi li jissimulaw il-proteini tas-CMV. Il-peptidi tas-CMV huma ddisinjati biex jimmiraw lejn iċ-ċelloli T CD8+, inklużi l-aplotipi A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 u Cw6 (A30, B13) HLA ta' Klassi I li jkopru >98% tal-popolazzjoni umana. Indivdwi infettati bis-CMV ġeneralment ikollhom limfoċiti CD8⁺ fid-demm tagħhom li jagħrfu dawn l-antiġeni. Dan il-proċess ta' rikonoxximent jinvolve l-ġenerazzjoni u s-sekrezzjoni taċ-ċitokina, l-IFN- γ . L-iskoperta u l-kwantifikazzjoni sussegwenti tal-IFN- γ tiffirma l-bażi ta' dan it-test.

Prinċipju tal-Proċedura

It-test tal-QF-CMV jitwettaq f'żewġ stadji. Qabelxejn, id-demm sħiħ jingabar f'kull wiehied mit-tubi tal-ġbir tad-demm tal-QF-CMV, li jinkludu tubu ta' Kontroll Nil, tubu tal-Antiġene tas-CMV u tubu tal-Mitoġenu.

It-tubu tal-Mitoġenu jintuża fit-test tal-QF-CMV bħala kontroll pożittiv. Dan jista' jkun speċjalment ġustifikat fejn ikun hemm dubju dwar l-istatus immuni tal-individwu. It-tubu tal-Mitoġenu jista' jservi wkoll bħala kontroll għall-ġestjoni u l-inkubazzjoni korretti tad-demm.

It-tubi għandhom jiġu inkubati f'temperatura ta' 37°C mill-aktar fis possibbli, u fi żmien 16-il siegħa minn xhin jingabru. Wara perjodu ta' inkubazzjoni ta' 16–24 siegħa, it-tubi jiġu oċcentrifugati, il-plażma titneħħa u l-ammont tal-IFN- γ (IU/ml) imkejjel mill-QF-CMV ELISA.

L-ammont tal-IFN- γ fil-kampjuni tal-plażma mit-tubi tal-Antiġene u l-Mitoġenu tas-CMV ta' spiss jistgħu jkunu f' fuq mil-limiti massimi tal-maġġoranza tal-qarrejja tal-ELISA, anke meta l-individwi jkunu moderatament immunosoppressi. Għal riżultati kwalitattivi, uża l-valuri kkalkulati għall-plażma pura. Għal riżultati kwantitattivi, fejn huma meħtieġa valuri attwali ta' IU/ml, il-kampjuni tal-plażma għandhom jiġu dilwiti 1/10 f'Dilwent Aħdar u analizzati fl-ELISA flimkien mal-plażma pura.

Nota: Għall-kampjuni li jinsabu fil-medda tal-QF-CMV ELISA (jiġifieri, sa 10 IU/ml), għandu jintuża r-riżultat miksub bil-kampjun tal-plażma pura. Għal tali konċentrazzjonijiet tal-IFN- γ , il-valuri miksuba bl-użu tad-dilwizzjoni ta' 1/10 tal-kampjuni tal-plażma jistgħu ma jkunux eżatti.

Test jitqies bħala reattiv għal rispons ta' IFN- γ meta t-tubu tal-Antigene tas-CMV jirreġistra oġġla b'mod sinifikanti mill-valur Nil tal-IFN- γ IU/ml. Il-kampjun tal-plażma stimulat bil-Mitoġenu jservi bħala kontroll pożittiv tal-IFN γ għal kull kampjun ittestjat. Rispons baxx għall-Mitoġenu jindika riżultat indeterminat meta kampjun tad-demm ikollu wkoll rispons mhux reattiv għall-antigeni tas-CMV. Din ix-xejra tista' ssejtni b'limfoċiti insuffiċjenti, attività mnaqqsa tal-limfoċiti minhabba ġestjoni mhux xierqa tal-kampjun, mili/taħlit mhux korrett tat-tubu tal-Mitoġenu jew l-inkapaċità li l-limfoċiti tal-pazjent jiġġeneraw l-IFN- γ – bħal fil-każ ta' pazjenti li jkunu għamli trapjanti reċenti. Il-kampjun Nil jaġġusta għall-isfond jew l-IFN- γ mhux speċifiku fil-kampjuni tad-demm. Il-livell tal-IFN- γ tat-tubu Nil jitnaqqas mil-livell tal-IFN- γ għat-tubu tal-Antigene tas-CMV u t-tubu tal-Mitoġenu (ara "Interpretazzjoni tar-Riżultati" f'paġna 24 ta' dan il-Fuljett ta' Tagħrif għal deskrizzjoni fil-qosor ta' kif jiġu interpretati r-riżultati tal-QF-CMV).

Il-ħin meħtieġ biex jitwettagħ l-assaġġ

Il-ħin meħtieġ biex jitwettagħ l-assaġġ tas-QF-CMV huwa stmat hawn taħt; il-ħin tal-ittestjar ta' diversi kampjuni meta jkunu flottijiet huwa indikat ukoll:

Inkubazzjoni tat-tubi tad-demm

f'temperatura ta' 37°C:

16–24 siegħa

ELISA:

Madwar 3 sigħat għal pjastra tal-ELISA waħda

Inqas minn siegħa xogħol

Żid 10–15-il minuta għal kull pjastra addizzjonali

Materjali Ipprovduti

Kontenut tal-kitt

Tubi għall-Ġbir tad-Demm (Pakkett għal Pazjent Uniku)	
Nru tal-katalogu	0192-0301
Numru ta' preparazzjonijiet	1
QuantIFERON Nil Control (tapp griż)	Tubu 1
QuantIFERON CMV Antigen (tapp blu)	Tubu 1
QuantIFERON Mitogen Control (tapp vjola)	Tubu 1
Fuljett ta' Tagħrif tal-QF-CMV Blood Collection Tubes	1

QuantIFERON-CMV ELISA	Kitt ta' 2 Pjastri ELISA
Nru tal-katalogu	0350-0201
Strippi tal-mikropjastri (12 x 8 bwieri) miksija b'antikorp monoklonali murina kontra I-IFN- γ uman	2 settijiet ta' strippi ta' mikropjastri ta' 12 x 8 bwieri
L-Istandard tal-IFN- γ Uman, lijoġilizzat (fih IFN- γ uman rikombinanti, kaseina bovina, 0.01% w/v Thimerosal)	1 x kunjett (8 IU/ml meta rikostitwit)
Dilwent Aħdar (fih kaseina bovina, sero normali tal-ġrieden, 0.01% w/v Thimerosal)	1 x 30 ml
Konjugat 100x Konċentrat, lijoġilizzat (IFN- γ -HRP anti-uman murin, fih 0.01% w/v Thimerosal)	1 x 0.3 ml
Konċentrat 20x tal-Buffer tal-Hasil (pH 7.2, fih 0.05% v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml
Soluzzjoni tas-Sottostrat tal-Enzima (fiha H ₂ O ₂ , 3,3',5,5'-Tetrametilbenzindina)	1 x 30 ml
Soluzzjoni li Twaqqaf l-Enzimi (fiha 0.5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
Fuljett ta' Tagħrif ta' QF-CMV ELISA	1

* Fih l-aċidu sulfuriku. Ara paġna 9 għall-prekawzzjonijiet.

Materjali Meħtieġa iżda Mhux Ipprovduti

Meta taħdem bil-kimiki, dejjem ilbes ġagaga tal-laboratorju adattata, ingwanti mhux riutilizzabbli, u nuċċalijiet protettivi. Għal aktar informazzjoni, ikkonsulta l-iskedi tad-dejta tas-sigurtà (SDSs) xierqa, disponibbli mingħand il-fornitur tal-prodott.

- Inkubatur ta' 37°C; CO₂ mhux meħtieġ
- Pipetti kalibrati b'volum varjabbli għall-konsenja ta' 10–1000 µl b'ponot mhux riutilizzabbli wara l-użu
- Pipetta kkalibrata b'diversi kanali li hija kapaċi twassal 50 u 100 µl b'ponot mhux riutilizzabbli wara l-użu
- Apparat tat-taħlit tal-mikropjastri
- Ilma dejonizzat jew distillat, 2 litri
- Apparat tal-ħasil tal-mikropjastri (apparat tal-ħasil awtomatiku rakkomandat)
- Qarrej tal-mikropjastri mgħammar b'filtru ta' 450 nm u filtru ta' referenza ta' 620 nm sa 650 nm
- Għata tal-pjastra

Twissijiet u Prekawzjonijiet

Għal użu dijanjostiku in vitro

Meta taħdem bil-kimiki, dejjem ilbes ġagaga tal-laboratorju adattata, ingwanti mhux riutilizzabbli, u nuċċalijiet protettivi. Għal aktar informazzjoni, jekk jogħġbok ikkonsulta l-iskedi tad-dejta tas-sigurtà (SDSs) xierqa. Dawn huma disponibbli online f'format PDF konvenjenti u kompatt fuq **www.qiagen.com/safety** fejn tista' ssib, tara, u tipprintja l-SDS għal kull kitt QIAGEN® u komponent tal-kitt.

ATTENZJONI



Immaniġġja d-demm uman daqslikieku huwa potenzjalment infettiv. Osserva l-linji gwida rilevanti dwar l-immaniġġjar tad-demm.

Id-dikjarazzjonijiet ta' perikli u prekawzjonijiet li ġejjin japplikaw għall-komponenti tal-QuantIFERON-CMV ELISA.

QuantIFERON Enzyme Stopping Solution



Fih: aċidu sulfuriku. Twissija! Jista' jkun korrużiv għall-metalli. Jikkawża irritazzjoni tal-ġilda. Jikkawża irritazzjoni serja fl-għajnejn. Ilbes ingwanti protettivi/ ħwejjeġ protettivi/ protezzjoni għall-għajnejn/ protezzjoni għall-wiċċ.

QuantIFERON Enzyme Substrate Solution

Twissija! Jikkawża irritazzjoni ħafifa tal-ġilda. Ilbes ingwanti protettivi/ ħwejjeġ protettivi/ protezzjoni għall-għajnejn/ protezzjoni għall-wiċċ.

QuantIFERON Green Diluent



Fih: trisodju 5-idrossi-1-(4-sulfofenil)-4-(4-sulfofenilazo)pirazol-3-karbossilat. Fih: tartrażina. Twissija! Jista' jikkawża reazzjoni allergika tal-ġilda. Ilbes ingwanti protettivi/ ħwejjeġ protettivi/ protezzjoni għall-għajnejn/ protezzjoni għall-wiċċ.

QuantIFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Fih: ProClin 300. Jagħmel ħsara lill-ħajja akkwatika b'effetti fit-tul. Evita r-rilaxx fl-ambjent.

Informazzjoni dwar is-sigurtà

Informazzjoni addizzjonali

- Id-devjazzjonijiet mill-Fuljett ta' Tagħrif tal-QF-CMV jistgħu jagħtu riżultati żbaljati. Jekk jogħġbok aqra l-istruzzjonijiet bir-reqqa qabel l-użu.
- Tużax il-kitt jekk xi flixxun tar-reagent juri sinjali ta' ħsara jew tnixxija qabel l-użu.
- **Importanti:** Spezzjona l-kunjetti qabel ma tużahom. Tużax kunjetti tal-Konjugat jew tal-IFN- γ Standard li juru sinjali ta' ħsara jew jekk is-sigill tal-lastku jkun ġie kompromess. Timmaniġġjax kunjetti mkissrin. Flu l-prekawzjonijiet tas-sigurtà xierqa biex tarmi l-kunjetti b'mod sigur.

Rakkomandazzjoni: Uża apprat li jneħhi l-ikkrimpjar tal-kunjetti biex tiftaħ il-kunjetti tal-Konjugat jew tal-IFN- γ Standard biex timminimizza r-riskju ta' korrimment mill-ġhata tal-metall tal-ikkrimpjar.

- Thallax u tużax l-Istrippi tal-Mikropjastri, l-IFN- γ Standard Uman, id-Dilwent Aħdar, jew Konjugat b'Konċentrat ta' 100x minn lottijiet differenti tal-kitt tal-QF-CMV. Reagenti oħra (Buffer tal-Hasil b'Konċentrat ta' 20x, Soluzzjoni tas-Sottostrat tal-Enzimi, u Soluzzjoni li Twaqqaf l-Enzimi) jistgħu jiġu skambjati bejn il-kitts, sakemm ir-reagenti jkunu fil-perjodi ta' skadenza tagħhom u jiġu rreġistrati d-dettalji tal-lott.
- Armi r-reagenti u l-kampjuni bijoloġiċi mhux użati skont ir-regolamenti Lokali, Statali u Federali.
- Tużax il-QF-CMV Blood Collection Tubes jew il-kitts QF-CMV ELISA wara d-data ta' skadenza.
- Żgura li t-tagħmir tal-laboratorju bħall-apparati tal-hasil u tal-qari tal-pjastri li jkunu ġew ikkalibrati/ivvalidati għall-użu.

Hażna u Ġestjoni tar-Reaġenti

Tubi għall-ġbir tad-demm

- Aħżen il-QF-CMV Blood Collection Tubes f'temperatura ta' bejn 4–25°C.
- Il-QF-CMV Blood Collection Tubes għandhom ikunu bejn 17–25°C fil-ħin meta jimtela d-demm.
- Il-ħajja fuq l-ixkaffa tal-QF-CMV Blood Collection Tubes hija ta' massimu ta' 15-il xahar mid-data tal-manifattura, meta tinħażen f'temperatura ta' 4–25°C.

Reaġenti tal-kitt ELISA

- Aħżen il-kitt f'temperatura bejn 2–8°C.
- Dejjem ipproteġi s-Soluzzjoni tas-Sottostrat tal-Enzimi mid-dawl dirett tax-xemx.

Reaġenti rikostitwiti u mhux użati

Għal istruzzjonijiet dwar kif tirrikostitwixxi r-reagenti, jekk jogħġbok ara “Stadju 2: QuantiFERON-CMV ELISA għall-IFN- γ uman” (passi 3 u 5 f'paġni 17 u 19).

- L-Istandard tal-IFN- γ Uman rikostitwit jista' jinżamm sa 3 xhur jekk jinħażen f'temperatura ta' bejn 2–8°C. Innota d-data li fiha ġie rikostitwit l-Istandard tal-IFN- γ Uman.
- Ladarba jiġi rikostitwit, il-Konjugat b'Konċentrat ta' 100x mhux użat għandu jitpoġġa lura fil-ħażna f'temperatura ta' bejn 2–8°C u għandu jintuża fi żmien 3 xhur.
Innota d-data li fiha l-konjugat ġie rikostitwit.
- Il-konjugat tas-saħħa operattiva għandu jintuża fi żmien 6 sigħat mill-preparazzjoni.
- Il-Buffer tal-Hasil tas-saħħa tax-xogħol jista' jinħażen f'temperatura tal-kamra (22°C $\pm$ 5°C) sa ġimagħtejn.

Ġbir u Ġestjoni tal-Kampjuni

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

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

L-antigeni jitnixxfu fuq il-ħajt ta' ġewwa tat-tubi tal-ġbir tad-demmi, għalhekk huwa essenzjali li l-kontenut tat-tubi jithallat sew mad-demmi. It-tubi għandhom jiġu ttrasferiti f'inkubatur ta' 37°C mill-aktar fis possibbli u fi żmien 16-il siegħa mill-ħin tal-ġbir.

Għal riżultati ottimali għandhom jiġu segwiti l-proċeduri li ġejjin:

1. Minn kull suġġett, iġbor 1 ml ta' demm permezz ta' venipuntura direttament f'kull wieħed mill-QF-CMV Blood Collection Tubes. Din il-proċedura għandha titwettaq minn flebotomista mħarregġ.

II-QF-CMV Blood Collection Tubes jistgħu jintużaw sa altitudni ta' 810 metru (2650 pied).

Jekk qed tuża QF-CMV Blood Collection Tubes f'altitudni oġġla minn 810 metru, jew jekk iseħħ volum baxx ta' ġbid tad-demmi, id-demmi jista' jingabar permezz ta' siringa, u 1 ml jiġi ttrasferit immedjatament għal kull wieħed mit-tliet tubi. Għal raġunijiet ta' sigurtà, dan isir l-aħjar billi tneħhi l-labra tas-siringa, tiżgura proċeduri tas-sigurtà xierqa, tneħhi t-tappijiet mit-tliet QF-CMV Blood Collection Tubes u żżid 1 ml ta' demm ma' kull wieħed minnhom (sal-marka s-sewda fil-ġenb tat-tikketta tat-tubu). Erga' poġġi t-tappijiet tat-tubi sew u ħallat kif deskritt hawn taħt. Billi t-tubi ta' 1 ml jiġbdu d-demmi relattivament bil-mod, żomm it-tubu fuq il-labra għal 2–3 sekondi ladarba jkun jidher li t-tubu mtela kompletament, biex tiżgura li jiġibed il-volum korrett.

Il-marka s-sewda fil-ġenb tat-tubi tindika l-volum tal-mili ta' 1 ml. Il-QF-CMV Blood Collection Tubes ġew invalidati għal volumi li jvarjaw minn 0.8 sa 1.2 ml Jekk il-livell tad-demmm f'xi tubu ma jkunx qrib il-marka indikatriċi, għandu jittiehed kampjun tad-demmm ġdid.

Jekk qed tintuża butterfly needle biex jinġabar id-demmm, għandu jintuża tubu ta' "tbattil totali" biex jiġi żgurat li t-tubu jmtela bid-demmm qabel ma jintużaw il-QF-CMV Blood Collection Tubes.

Inkella, id-demmm jista' jinġabar f'tubu ġeneriku wieħed tal-ġbir tad-demmm li fih l-eparina tal-litju bħala l-antikoagulant u mbagħad jiġi ttrasferit għall-QF-CMV Blood Collection Tubes. Uża l-eparina tal-litju biss bħala antikoagulant tad-demmm għaliex antikoagulanti oħra jinterferixxu mal-assaġġ. Imla tubu tal-ġbir tad-demmm (volum minimu ta' 5 ml) u ħallat bil-galbu billi taqleb it-tubu diversi drabi biex tħoll l-eparina. Din il-proċedura għandha titwettaq minn flebotomista mħarreġ. Id-demmm għandu jinżamm fit-temperatura tal-kamra ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) qabel ma jiġi ttrasferit fil-QF-CMV Blood Collection Tubes għall-inkubazzjoni, li trid tinbeda fi żmien 16-il siegħa minn xhin jinġabar id-demmm.

2. Immedjatament wara li timla l-QF-CMV Blood Collection Tubes, ħawwad it-tubi 10 darbiet tajjeb biżżejjed biex tiżgura li l-wiċċ ta' ġewwa tat-tubu jkun miksi kollu bid-demmm, biex jinħallu l-antiġeni fuq il-ħitan tat-tubi.

It-tubi għandhom jinżammu bejn 17°C – 25°C fil-ħin tal-mili tad-demmm.

Taħlit vigoruż iżżejjed jista' jikkawża diżintegrazzjoni tal-ġell u jista' jwassal għal riżultati aberranti.

Jekk id-demmm ikun inġabar f'tubu tal-eparina tal-litju, il-kampjuni għandhom jithalltu b'mod uniformi qabel ma jitqassmu fil-QF-CMV Blood Collection Tubes. Żgura li id-demmm ikun imħallat sew billi tħallat bil-mod immedjatament qabel ma tiddispensah. Qassam l-alikwoti ta' 1 ml (waħda għal kull Tubu tal-Ġbir tad-Demm tas-QF-CMV) f'tubu xieraq tan-Nil, tal-Antiġene tas-CMV, u tal-Mitoġenu. Dan għandu jsir b'mod asettiku, filwaqt li jiġi żgurati l-proċeduri tas-sigurtà x-xierqa, billi jitneħħew it-tappijiet mit-tliet QF-CMV Blood Collection Tubes u jiżdied 1 ml ta' demmm ma' kull wieħed minnhom (sal-marka s-sewda fil-ġenb tat-tikketta tat-tubu). Erga' poġġi t-tappijiet tat-tubi sew u ħallat kif deskritt hawn fuq.

3. Ittiketta t-tubi kif suppost.

Žgura li kull tubu (Nil, Antigene tas-CMV, Mitoġenu) ikun identifikabbli bit-tikketta tiegħu jew b'mezzi oħra.

4. Wara l-mili, it-taħlit, u t-tikkettar, it-tubi għandhom jiġu ttrasferiti f'inkubatur ta' $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ mill-aktar fis possibbli, u fi żmien 16-il siegħa mill-ġbir. Qabel l-inkubazzjoni, żomm it-tubi fit-temperatura tal-kamra ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Tpoġġix il-kampjuni tad-demmi fil-frigġ jew fil-friża.

Proċedura

Stadju 1: Inkubazzjoni tad-demm u ġbir tal-plażma

1. Inkuba t-tubi WEQFIN f'temperatura ta' $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ għal 16–24 siegħa. L-inkubatur ma jeħtieġx CO_2 jew umidifikazzjoni.

Importanti: Jekk id-demm ma jiġix inkubat immedjatament wara li jinġabar, hallat it-tubi mill-ġdid billi taqlibhom ta' taħt fuq 10 darbiet qabel l-inkubazzjoni.

Wara l-inkubazzjoni, it-tubi tal-ġbir tad-demm jistgħu jinżammu f'temperatura ta' bejn $4\text{--}27^{\circ}\text{C}$ sa 3 ijiem qabel iċ-ċentrifugazzjoni.

2. Wara l-inkubazzjoni tat-tubi f'temperatura ta' 37°C , il-ġbir tal-plażma jiġi ffaċilitat billi t-tubi jiġu ċentrifugati għal 15-il minuta f'RCF ta' 2000–3000 (g). Il-plagg tal-gell se jissepara ċ-ċelloli mill-plażma. Jekk dan ma jseħħ, it-tubi għandhom jiġu ċentrifugati mill-ġdid.

Huwa possibbli li l-plażma tingabar mingħajr iċ-ċentrifugazzjoni, iżda hija meħtieġa attenzjoni addizzjonali biex titneħħa l-plażma mingħajr ma jiġu ddisturbati ċ-ċelloli.

3. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, evita li tuża l-pipetta 'l fuq u 'l isfel jew li tħallat il-plażma bi kwalunkwe mezz qabel il-ġbir. Oqgħod dejjem attent/a li ma tiddisturbax il-materjal fuq il-wiċċ tal-gell.

Importanti: Il-kampjuni tal-plażma għandhom jinġabru biss permezz ta' pipetta.

Il-kampjuni tal-plażma jistgħu jitgħabbew direttament minn tubi ċentrifugati għall-ġbir tad-demm fil-pjastra QF-CMV ELISA, inkluż meta jintużaw l-istazzjonijiet tax-xogħol ELISA awtomatizzati.

Il-kampjuni tal-plażma jistgħu jinħażnu fi QF-CMV Blood Collection Tubes ċentrifugati sa 28 jum f'temperatura ta' $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ jew, jekk jinġabru, taħt -20°C (preferibbilment inqas minn -70°C) għal perjodi twal.

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

Stadju 2: QuantiFERON-CMV ELISA għall-IFN- γ uman

Irreferi għal "Kontenut tal-kitt", paġna 8 u "Materjali Meħtieġa iżda Mhux Ipprovduti", paġna 9, għall-materjali meħtieġa biex titwettaq l-ELISA.

1. Il-kampjuni u r-reagenti kollha tal-plażma, ħlief għall-Kongugat b'Konċentrat ta' 100x, iridu jingiebu għat-temperatura tal-kamra ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) qabel ma jintużaw. Halli mill-inqas 60 minuta għall-ekwilibrizzjoni.
2. Neħni l-istrixxi tal-pjastri ELISA li mhumix meħtieġa mill-qafas, erga' ssiġillahom fil-borża tal-fojl u erga' poġġihom fil-frigġ sabiex jinħażnu sakemm ikunu meħtieġa. Halli mill-inqas strippla waħda għall-Istandards QF-CMV ELISA u biżżejjed strippli għan-numru ta' pazjenti li qed jiġu ttestjati. Wara l-użu, żomm il-qafas u l-għatu biex tużahom mal-istrixxi li jifdal.
3. Irrikostitwixxi l-Istandard tal-IFN- γ Uman bil-volum tal-ilma dejonizzat jew distillat indikat fuq it-tikketta tal-kunjett. Hallat bil-mod biex tnaqqas ir-ragħwa u tiżgura s-solubilizzazzjoni mill-ġdid sħiħa. Ir-rikostituzzjoni tal-Istandard IFN- γ għall-volum korrett se tipproduci soluzzjoni b'konċentrazzjoni ta' 8.0 IU/ml.

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

Permezz tal-istandard rikostitwit, ipprepara serje ta' dilwizzjoni ta' erba' konċentrazzjonijiet tal-IFN- γ f'Dilwent Aħdar (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-istandards għandhom jsirilhom assaġġ għall-inqas f'duplikat. Ipprepara dilwizzjonijiet friski tal-istandard tal-kitt għal kull sessjoni ELISA.

Eżempju ta' proċedura għall-istandards duplikati

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

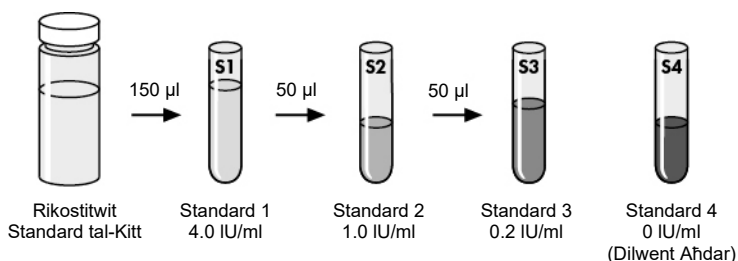


Figura 1. Thejjija tal-kurva standard permezz ta' dilwizzjoni serjali.

- Irrikostitwixxi l-Konjugat lijoġenizzat b'Konċentrat ta' 100x b'0.3 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat. Ħallat bil-mod biex tnaqqas ir-ragħwa u tiżgura s-solubilizzazzjoni sħiħa tal-konjugat.

Il-konjugat tas-saħħa tax-xogħol jiġi ppreparat billi jiġi dilwit l-ammont meħtieġ ta' Konjugat b'Konċentrat ta' 100x rikostitwit f'Dilwent Aħdar (ara Tabella 1, il-paġna li jmiss).

Ħallat sew iżda bil-mod, biex tevita li tipproduci r-ragħwa.

Irritorna kwalunkwe Konċentrat b'Konjugat ta' 100x mhux użat għal 2–8°C immedjatament wara l-użu.

Uża biss id-Dilwent Aħdar.

Tabella 1. Preparazzjoni tal-konjugat tas-saħħa tax-xogħol

Numru ta' strippi	Volum ta' Konjugat b'Konċentrat ta' 100x	Volum ta' 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 mit-tubi tal-ġbir tad-dem u li sussegwentement jiġu ffrizati jew maħżuna għal aktar minn 24 siegħa qabel l-analiżi, ħallathom sew qabel ma żżidhom mal-bwejra tal-ELISA.

Importanti: Jekk il-kampjuni tal-plażma għandhom jiżdiedu direttament mill-QF-CMV Blood Collection Tubes ċentrifugati, għandu jiġi evitat kwalunkwe taħlit tal-plażma. Dejjem oqgħod attent/a li ma tiddisturbax il-materjal fuq il-wiċċ tal-ġell.

6. Jekk ikunu meħtieġa riżultati kwantitattivi, iddilwixxi l-plażmi tas-CMV u tal-Mitoġenu 1/10 fid-Dilwent Aħdar (10 µl plażma + 90 µl GD). Il-plażma Nil m'għandhiex tiġi dilwita.

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

Nil, Antiġene tas-CMV, Mitoġenu, Antiġene tas-CMV (1/10), Mitoġenu (1/10)

Madankollu, l-għażliet li ġejjin tal-kampjuni tal-pazjent huma wkoll appoġġjati mill-QuantiFERON-CMV Analysis Software:

Nil, Antiġene tas-CMV, Mitoġenu

Nil, Antiġene tas-CMV (1/10), Mitoġenu (1/10)

Nil, Antiġene tas-CMV, Mitoġenu, Antiġene tas-CMV (1/10)

Nil, Antiġene tas-CMV (1/10), Mitoġenu

7. Żid 50 µl ta' konjugat tas-saħħa tax-xogħol ippreparat frisk mal-bwieri tal-ELISA meħtieġa billi tuża pipetta b'diversi kanali.
8. Żid 50 µl kampjuni tal-plażma tat-test fil-bwieri x-xierqa. Fl-aħħar nett, żid 50 µl minn kull wieħed mill-Istandards 1 sa 4 fil-bwieri xierqa. L-standards għandhom jiġu analizzati mill-inqas duplikatament.
9. Għatti l-pjastra ELISA u ħallat il-konjugat u l-kampjuni/standards tal-plażma sewwa billi tuża apparat tat-taħlit tal-mikropjastru għal minuta b'500 sa 1000 rpm. Evita t-titjir.
10. Għatti l-pjastra ELISA u inkubaha fit-temperatura tal-kamra ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) għal 120 ± 5 minuti.
Il-pjastru m'għandhomx ikunu esposti għad-dawl dirett tax-xemx waqt l-inkubazzjoni. Id-devjazzjoni mill-medda tat-temperatura speċifikata tista' twassal għal riżultati żbaljati.
11. Waqt l-inkubazzjoni, ipprepara buffer tal-ħasil b'saħħa tax-xogħol. Iddilwixxi parti waħda tal-Buffer tal-ħasil b'Konċentrat ta' 20x ma' 19-il parti ilma dejonizzat jew distillat u ħawwad sew.
Gie pprovdut biżżejjed -Buffer tal-ħasil b'Konċentrat ta' 20x biex jiġu ppreparati 2 litri ta' buffer tal-ħasil b'saħħa tax-xogħol.
12. Meta l-inkubazzjoni tal-pjastra ELISA tkun kompluta, aħsel il-bwieri b'buffer tal-ħasil b'saħħa tax-xogħol ta' 400 µl għal mill-inqas sitt ċikli. Huwa rakkomandat li tuża apparat tal-ħasil tal-pjastru awtomatizzat.
Importanti: Il-ħasil bir-reqqa huwa importanti ħafna għall-prestazzjoni tal-assaġġ. Żgura li kull bwejra tkun mimlija kompletament bil-buffer tal-ħasil sal-parti ta' fuq tal-bwejra għal kull ċiklu tal-ħasil. Huwa rakkomandat perjodu ta' tixrib ta' mill-inqas 5 sekondi bejn kull ċiklu.
Għandu jiġi miżjud diżinfettant standard tal-laboratorju mar-reċipjent tal-effluwent, u għandhom jiġu segwiti l-proċeduri stabbiliti għad-dekontaminazzjoni ta' materjal potenzjalment infettiv.
13. Tektek il-pjastru wiċċhom 'l isfel fuq xugaman assorbenti u mingħajr tnietex biex tneħħi l-buffer tal-ħasil residwu. Żid 100 µl ta' Soluzzjoni tas-Sottostrat tal-Enżima ma' kull bwejra, għatti l-pjastra u ħawwad sew billi tuża apparat tat-taħlit tal-mikropjastru għal minuta b'500 sa 1000 rpm billi tuża apparat tat-taħlit tal-mikropjastru.
14. Għatti kull pjastra u inkubaha fit-temperatura tal-kamra ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) għal 30 minuta.
Il-pjastru m'għandhomx ikunu esposti għad-dawl dirett tax-xemx waqt l-inkubazzjoni.

-
15. Wara l-inkubazzjoni ta' 30 minuta, žid 50 μ l ta' Soluzzjoni li Twaqqaf l-Enzimi ma' kull bwejra fl-istess ordni li židt is-sottostrat u ħawwad sew b'500 sa 1000 rpm billi tuża apparat tat-taħlit tal-mikropjastri.
 16. Kejjel id-Densità Ottika (OD) ta' kull bwejra fi żmien 5 minuti minn meta twaqqaf ir-reazzjoni billi tuża qarrej tal-mikropjastri mgħammar b'filtru ta' 450 nm u b'filtru ta' referenza ta' 620 nm sa 650 nm. Il-valuri tal-OD jintużaw biex jiġu kkalkulati r-riżultati.

Kalkoli u Interpretazzjoni tat-Test

Il-QuantIFERON-CMV Analysis Software, għall-analiżi tad-dejta mhux ipproċessata u l-kalkolu tar-riżultati, huwa disponibbli mingħand QIAGEN fuq www.QuantiFERON.com. Żgura li tintuża l-aktar verżjoni aġġornata tal-QF-CMV Analysis Software.

Is-software iwettaq valutazzjoni tal-Kontroll tal-Kwalità tal-assaġġ, jiġġenera kurva standard u jipprovdi riżultat tat-test għal kull suġġett, kif iddettaljat f'“Interpretazzjoni tar-Riżultati” fuq paġna 24. Is-software jirrapporta l-inqas dilwizzjoni li tiġġenera riżultat fil-medda tal-QF-CMV ELISA, filwaqt li jqis il-fattur tad-dilwizzjoni.

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

Ġenerazzjoni ta' kurva standard (jekk ma jintużax il-QF-CMV Analysis Software)

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

Ibni kurva standard $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ billi tipplottja $-\log_{(e)}$ tal-OD medja (assi y) kontra $-\log_{(e)}$ tal-konċentrazzjoni IFN- γ tal-istandards f'IU/ml (assi x), filwaqt li tħalli barra l-istandard żero minn dawn il-kalkoli. Ikkalkula l-linja tal-aħjar adattament għall-kurva standard permezz ta' analiżi ta' rigressjoni.

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

Dawn il-kalkoli jistgħu jsiru bl-użu ta' pakketti tas-software disponibbli mal-qarrejja tal-mikropjastri, u spreadsheets standard jew software tal-istatistika (bħal Microsoft® Excel®). Huwa rakkomandat li dawn il-pakketti jintużaw biex jiġu kkalkulati l-analiżi tar-rigressjoni, il-koeffiċjent tal-varjazzjoni (%CV) għall-istandards, u l-koeffiċjent tal-korrelazzjoni (r) tal-kurva standard.

Ir-riżultat irrappurtat għandu jittieħed mill-aktar dilwizzjoni baxxa li tiġġenera riżultat fil-medda tal-QF-CMV ELISA. Żgura li l-fattur tad-dilwizzjoni jitqies fejn ikun applikabbli.

Kontroll tal-kwalità tat-test

L-eżattezza tar-riżultati tat-test tiddependi fuq il-ġenerazzjoni ta' kurva standard preċiża. Għalhekk, ir-riżultati derivati mill-istandards iridu jiġu eżaminati qabel ma jkunu jistgħu jiġu interpretati r-riżultati tal-kampjun tat-test.

Biex l-ELISA tkun valida:

- Il-valur medju tal-OD għall-Istandard 1 irid ikun ≥ 0.600 .
- Is-%CV għall-valuri OD replikati tal-Istandard 1 u l-Istandard 2 irid ikun $< 15\%$.
- Il-valuri replikati tal-OD għall-Istandards 3 u 4 m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn unità ta' densità ottika ta' 0.040 mill-medja tagħhom.
- Il-koeffiċjent tal-korrelazzjoni (r) ikkalkulat mill-valuri medji tal-assorbanza tal-istandards irid ikun ≥ 0.98 .

Il-QF-CMV Analysis Software jikkalkula u jirrapporta dawn il-parametri tal-kontroll tal-kwalità. Jekk il-kriterji t'hawn fuq ma jintlaħqux, it-tħaddim ma jkunx validu u jrid isir mill-ġdid.

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

Interpretazzjoni tar-Riżultati

Ir-riżultati tal-QuantIFERON-CMV huma interpretati permezz tal-kriterji f"Tabella 2.

Tabella 2. Interpretazzjoni tar-riżultati tal-QuantIFERON-CMV

Nil (IU/ml)	CMV mingħajr in-Nil (IU/ml)	Mitoġenu mingħajr in-Nil (IU/ml)*	Riżultat tal-QF-CMV	Rapport/Interpretazzjoni
≤8.0	≥0.20 u ≥25% tan-Nil	Kwalunkwe	Reattivi†	Immunità anti-CMV skoperta
	<0.20 JEW ≥0.20 u <25% tan-Nil	≥0.5	Mhux reattivi	Immunità anti-CMV MHUX skoperta
		<0.5	Mhux determinati‡	Ir-riżultati mhumix determinati għar-rispons tas-CMV
>8.0§	Kwalunkwe	Kwalunkwe	Mhux determinati‡	Ir-riżultati mhumix determinati għar-rispons tas-CMV

* Ir-risponsi għall-kontroll pożittiv tal-Mitoġenu (u xi kultant tal-antiġeni tas-CMV) huma komuni li jistgħu jkunu barra mill-firxa tal-qarrej tal-mikropjastri. Din m'għandha l-ebda impatt fuq ir-riżultati tat-test.

† Fejn ma tkunx suspettata infezzjoni taċ-ċitomegalovirus, ir-riżultati inizjalment reattivi jistgħu jiġu kkonfermati billi jerġgħu jiġu ttestjati l-kampjuni oriġinali tal-plażma f'mod duplikat fil-QF-CMV ELISA. Jekk l-ttestjar ripetut ta' replika waħda jew tat-tnejn li huma jkun pożittiv, l-individwu għandu jitqies bħala reattiv għat-test.

‡ Irreferi għall- "Gwida għas-Soluzzjoni tal-Problemi" (paġna 39) għall-kawżi possibbli.

Fi studji kliniċi (1), intwera li riżultat indeterminat fost il-pazjenti bi trapjant ta' organi solidi, fejn donatur ikun reattiv għas-CMV iżda l-kontroll tal-Mitoġenu kien taħt 0.5 IU/ml, huwa klinikament rilevanti. Pazjenti bħal dawn għandhom l-ogħla riskju li jiżviluppaw is-CMV.

§ Fi studji kliniċi, inqas minn 0.25% tas-suġġetti kellhom livelli tal-IFN-γ ta' >8.0 IU/ml għall-valur Nil.

Nota: Il-livell imkejjel tal-IFN-γ għandu jintuża flimkien mal-preżentazzjoni klinika, l-istorja medika u evalwazzjonijiet dijanjostiċi oħra meta jiġi stabbilit ir-rispons immuni għall-antiġeni tas-CMV. Il-QF-CMV mhuwix test biex tiġi ddeterminata l-infezzjoni tas-CMV u m'għandux jintuża biex tiġi eskluża l-infezzjoni tas-CMV.

Limitazzjonijiet

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

Jistgħu jsejnhu riżultati mhuxaffidabbli jew indeterminati għal:

- Devjazzjoni mill-proċedura deskritta fil-Fuljett ta' Tagħrif tal-QuantiFERON-CMV ELISA
- Livelli eċċessivi ta' IFN- γ fit-tubu tal-kontroll
- Iktar minn 16-il siegħa bejn il-ġbid tal-kampjun tad-demmu u l-inkubazzjoni f'temperatura ta' 37°C.

Valuri Mistennija

Il-valuri mistennija tal-IFN- γ permezz tal-QuantiFERON-CMV inkisbu minn testijiet ta' 591 kampjun minn suġġetti b'saħħithom. 343 kampjun irriżulta seropożittiv u 248 kampjun irriżulta seronegattiv għas-CMV IgG. L-istatus tas-seroloġija tas-CMV ma kienx magħruf fil-hin tat-testijiet tal-QF-CMV. Fil-248 kampjun minn suġġetti seronegattivi għas-CMV, 100% (248/248) tal-kampjuni ttestjati ma kinux reattivi permezz ta' QF-CMV ELISA u pproduċew risponsi ta' IFN- γ ta' <0.2 IU/ml għat-tubu tal-Antigene tas-CMV (Nil imnaqqas). Id-distribuzzjoni tar-risponsi tal-IFN- γ għat-tubu tal-Antigene tas-CMV (Nil imnaqqas) għat-343 suġġett seropożittiv bis-CMV hija murija (Figura 2).

Numru ta' kampjuni

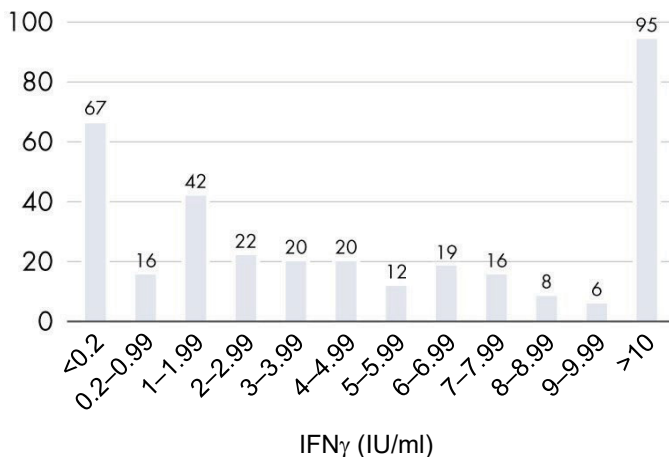


Figura 2. Distribuzzjoni tar-risponsi tal-QF-CMV IFN- γ (Nil imnaqqas) f'suġġetti b'saħħithom li huma seropożittivi (n = 343).

Id-distribuzzjoni tar-risponsi tal-IFN- γ għall-Mitogenu (Nil imnaqqas) ġiet determinata bl-użu ta' 733 kampjun minn suġġetti adulti b'saħħithom bl-użu tal-QF-CMV ELISA, irrISPettivament mis-seroloġija tas-CMV IgG (Figura 3). Riżultat tal-Mitogenu (Nil imnaqqas) ta' inqas minn 0.5 IU/ml jindika jew falliment tat-test jew li s-suġġett jinsab fi stat immunokompromess. F'popolazzjoni b'saħħitha, 2/733 riżultat biss waqgħu f'din il-kategorija

Numru ta' kampjuni

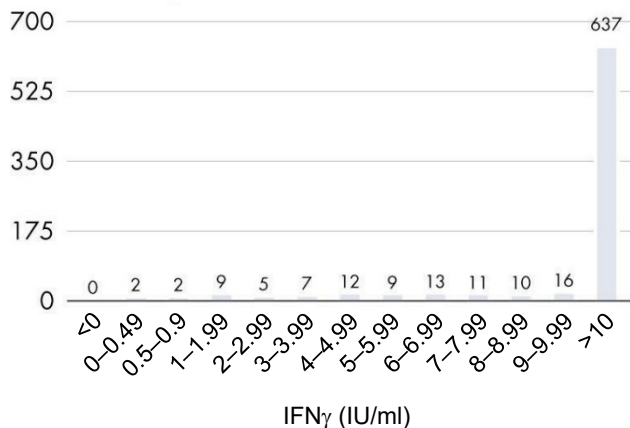


Figura 3. Distribuzzjoni tar-risponsi ta' Mitogenu-IFN- γ (Nil imnaqqas) f'suġġetti b'saħħithom (n = 733).

Id-distribuzzjoni tar-risponsi tal-IFN- γ għal tubi Nil ġiet determinata bl-użu ta' 1020 kampjun tal-plażma minn suġġetti b'saħħithom bl-użu tal-QF-CMV ELISA, irrISPettivament mis-seroloġija tal-IgG tas-CMV (Figura 4).

Popolazzjoni (%)

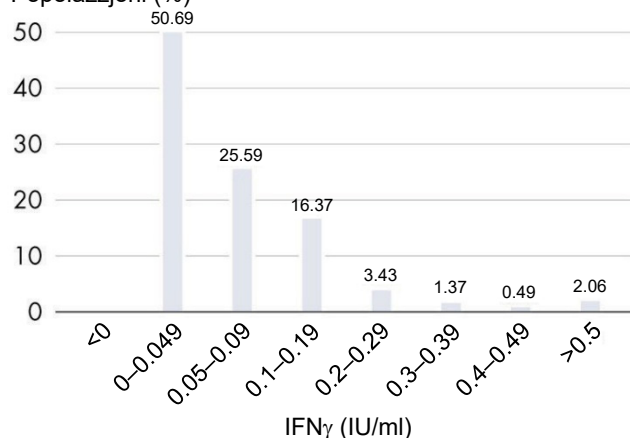


Figura 4. Distribuzzjoni tar-risponsi Nil tal-IFN- γ f'suġġetti b'saħħithom (n = 1020) espressa bħala perċentwal tal-popolazzjoni.

Karatteristiċi tal-Prestazzjoni

Prestazzjoni klinika

Għe stabbilit limitu ta' test għall-iskoperta ta' esponiment preċedenti għas-CMV bl-użu tal-QF-CMV wara l-analiżi tar-riżultati minn grupp ta' suġġetti b'saħħithom (n = 223) fejn ir-riżultati tal-QF-CMV tqabblu mar-riżultati seroloġiċi tas-CMV IgG. Analizi ROC iddeterminat li limitu ta' test ta' 0.04 IU/ml (wara t-tnaqqis ta' Nil) ipprovdha valuri predittivi pożittivi u negattivi ottimali għall-QF-CMV (żona taħt il-kurva = 0.9679 [95%CI: 0.9442–0.9915, $p<0.0001$]), u b'hekk irrappreżenta l-limitu li fih dan l-assaġġ wettaq l-użu maḥsub tiegħu bl-aktar mod effettiv f'popolazzjoni b'saħħitha.

Il-prestazzjoni tal-assaġġ tal-QF-CMV għet imqabbla mat-test tas-seroloġija SeraQuest™ tas-CMV IgG (Quest International). L-assaġġ tal-QF-CMV wera qbil ta' 95% (294/310 individwi) mat-test tas-seroloġija tas-CMV IgG f'suġġetti b'saħħithom, bl-ebda wieħed mill-149 donatur seronegattiv ma juri reattività mill-QF-CMV. 145 minn 161 donatur seropożittiv wera rispons reattiv għall-QF-CMV. Il-qbil pożittiv ġenerali kien ta' 90% b'valur ta' qbil negattiv ta' 100%. Il-livell ta' qbil f'suġġetti b'saħħithom bejn ir-risponsi tal-QF-CMV u l-istatus tas-seroloġija tal-IgG tas-CMV jidher f'Tabella 3.

Tabella 3. Qbil bejn il-QuantIFERON-CMV u t-test tas-seroloġija tas-CMV IgG f'suġġetti b'saħħithom

		Seroloġija tas-CMV		Total
		Pożittivi	Negattivi	
QuantIFERON-CMV	Reattivi	145	0	145 (46.8%)
	Mhux reattivi	16	149	165 (53.2%)
	Total	161 (51.9%)	149 (48.1%)	310 (100%)

Limitu tal-assaġġ

Il-limitu rakkomandat tat-test kliniku għal dan l-assaġġ huwa ta' 0.2 IU/ml fit-tubu tal-Antiġene tas-CMV (Nil imnaqqas), għalkemm limiti differenti jistgħu jiġu vvalidati għal ambjenti kliniċi differenti.

Studji Kliniċi

Peress li m'hemm l-ebda standard definittiv biex tiġi kkonfermata jew eskluża d-dijanjożi ta' infezzjoni taċ-ċitomegalovirus, ma tistax tiġi evalwata b'mod prattiku stima tas-sensittività u l-ispeċifità għall-QF-CMV. L-ispeċifità u s-sensittività tal-QF-CMV ġew approssimati billi ġie evalwat il-livell ta' qbil bejn ir-risponsi tal-QF-CMV u l-istatus tas-seroloġija tal-IgG tas-CMV ta' suġġetti b'saħħithom.

L-ispeċifità tal-QF-CMV ġiet approssimata billi ġew evalwati r-rati pożittivi-foloz (rispons reattiv tal-QF-CMV) f'kampjuni ta' donaturi b'saħħithom mingħajr evidenza ta' esponiment preċedenti għas-CMV (individwi seronegattivi għas-CMV IgG). Is-sensittività ġiet approssimata billi ġie evalwat r-rispons għall-QF-CMV f'kampjuni ta' donaturi b'saħħithom b'evidenza ta' esponiment preċedenti għas-CMV (individwi seropożittivi għas-CMV IgG). Il-QF-CMV juża numru kbir ta' epitopi speċifiċi għas-CMV minn proteini tas-CMV differenti, u b'hekk jipprovdi kopertura wiesgħa tal-popolazzjoni b'diversi aplotipi HLA ta' Klassi I (madwar 98% tal-popolazzjoni). Billi l-aplotipi tal-HLA tas-suġġetti ttestjati kontra s-seroloġija tas-CMV ma kinux magħrufa, perċentwal żgħir ta' individwi b'seroloġija pożittiva kien mistenni li ma jirrispondix għall-QF-CMV Blood Collection Tubes.

Speċifità

Fi studju ta' 591 kampjun minn suġġetti b'saħħithom, ma nstab l-ebda riżultat pożittiv-falz ta' QF-CMV f'individwi li ttestjaw bħala seronegattivi għas-CMV IgG, b'248/248 kampjun li ttestja mhux reattiv permezz tal-QF-CMV ELISA u negattiv permezz ta' test seroloġiku tas-CMV IgG. Għalhekk, ir-riżultati miksuba permezz tal-QF-CMV u t-test tas-seroloġija tas-CMV IgG urew konkordanza ta' 100%.

Fl-evalwazzjonijiet l-oħra kollha tal-ispeċifiċità mwettqa f'riċevituri ta' trapjanti ta' organi solidi (1–8), riċevituri ta' trapjanti ta' ċelluli staminali ematopojetici (9,10) u pazjenti infettati bl-HIV (11), il-konkordanza bejn is-seroloġija QF-CMV u CMV IgG intweriet ukoll li hija ta' 100%.

Sensittività

Fi studju mwettaq fuq 343 kampjun minn suġġetti b'saħħithom li rriżultaw seropożittivi għas-CMV IgG, il-livell ta' qbil bejn ir-risponsi tal-QF-CMV u r-riżultati tas-seroloġija tas-CMV IgG kien ta' 80.5% b'276/343 kampjun li rriżultaw reattivi għal QF-CMV u pożittivi għat-test tas-seroloġija tal-CMV IgG. Id-diskordanza osservata tista' tkun dovuta għas-seroloġija tas-CMV pożittiva-falza, jew in-nuqqas ta' tipi HLA li jirrispondu fl-individwi ttestjati.

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

Studji li jenfasizzaw l-utilità klinika

Kemm is-seroloġija tas-CMV IgG u kif ukoll il-QF-CMV jiddeskrivu l-użu maħsub tagħhom bħala wiehed li jippermetti l-iskoperta tal-immunità għas-CMV. F'ambjent ta' trapjant, is-seroloġija tas-CMV tintuża ħafna qabel it-trapjant biex tistabbilixxi r-riskju ta' kumplikazzjonijiet tas-CMV li jseħħu fir-riċevitur wara t-trapjant, iżda għandha valur limitat hija nnifisha wara t-trapjant. Inkella, il-QF-CMV jista' jintuża f'riċevituri ta' trapjanti biex jiġi vvalutat il-livell ta' immunità tas-CMV f'dawk il-pazjenti f'riskju li jiżviluppaw infezzjoni sintomatika tas-CMV u/jew mard minħabba immunosoppressjoni (12–15).

Numru ta' studji kliniċi ppubblikati f'varjetà ta' gruppi ta' trapjanti wrew l-utilità tal-QuantIFERON-CMV (1–11, 15, 16).

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

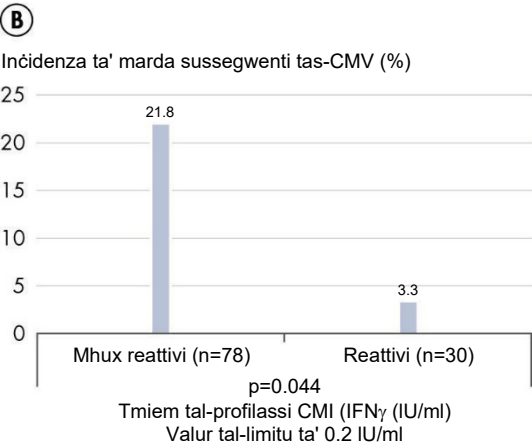
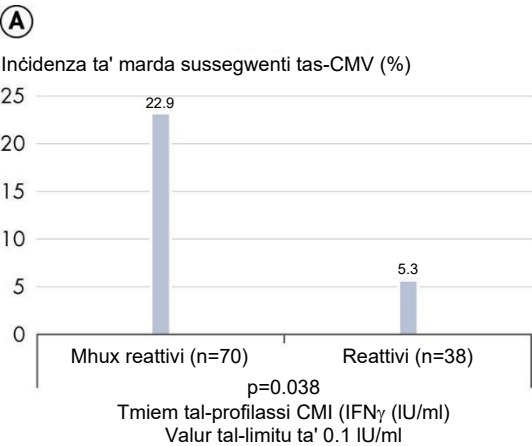


Figura 5. Rati tal-marda tas-CMV li tibda tard f'pazjenti b'riżultat reattiv għall-QuantIFERON-CMV kontra riżultat mhux reattiv għall-QuantIFERON-CMV fi tmjem il-profilassi. Dejta sottostanti misjuba f'Kumar et al. (4).

Barra minn hekk, ir-riċevituri ta' trapjant seronegattivi għas-CMV li jirċievu organu minn donatur pożittiv għas-CMV (D+R-) b'riżultat reattiv għall-QF-CMV mat-tlestija tal-profilassi baqgħu ħielsa mill-marda tas-CMV aktar ta' spiss, u għal aktar żmien, u dan jindika li l-QF-CMV jista' jintuża biex jidentifika lil dawk li qegħdin f'riskju li jiżviluppaw marda tas-CMV li tibda tard.

Dan l-istudju enfasizza wkoll li f'dan il-koorti ta' pazjenti bi trapjant bl-ogħla riskju li jiżviluppaw il-marda tas-CMV (D+/R-), riżultat reattiv fi kwalunkwe ħin wara l-profilassi kien assoċjat ma' ċans ogħla li jibqgħu ħielsa mill-marda tas-CMV.

Fi studju ta' 37 pazjent bi trapjant ta' organu solidu (6), il-valutazzjoni tar-risponsi taċ-ċelluli T CD8+ speċifiċi għas-CMV permezz tal-QF-CMV għenet fit-tbassir tat-tneħħija spontanja tal-virus meta mqabbla mal-progressjoni tal-marda tas-CMV, wara żidiet fil-viremija tas-CMV. F'dan l-istudju, 24/26 pazjent (92.3%) b'riżultat reattiv għall-QF-CMV (bl-użu ta' limitu ta' test IFN- γ ≥ 0.2 IU/ml), neħħew il-virus CMV b'mod spontanju, filwaqt li 5/11-il pazjent biss (45.5%) b'riżultat mhux reattiv għall-QF-CMV kellhom l-istess riżultat.

Studju ta' 67 riċevitur ta' trapjant tal-pulmun li evalwa episodji ta' viremija tas-CMV wara t-trapjant (7), osserva li 18/25 (72%) episodju ta' viremija tas-CMV kien preċedut minn riżultat mhux reattiv għall-QF-CMV, kontra 4/16-il episodju (25%) li kien preċedut minn rispons reattiv għall-QF-CMV (test eżatt ta' Fisher, $p = 0.0046$; Figura 6).

Episodji ta' DNAemia tal-HCMV b'tagħbija virali ta' >1000 kopja/ml (%)

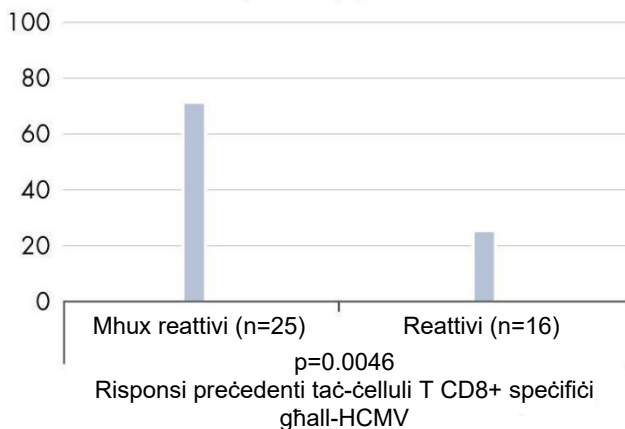


Figura 6. Analizi statistika tar-risponsi taċ-ċelluli T CD8+ speċifiċi għas-CMV kif skoperti minn QuantiFERON-CMV u l-iżvilupp tal-viremija tas-CMV (test eżatt ta' Fisher, $p=0.0046$). Dejta sottostanti misjuba f'Weselsindtner et al (7).

Fi studju prospettiv multiċentriku kbir ta' 127 pazjent bi trapjant ta' organi solidi li kienu donaturi u seropożittivi għas-CMV u riċevituri u seronegattivi għas-CMV (8), fejn kollha rċewew profilassi antivirali, wera li pazjenti b'riżultat reattiv għall-QF-CMV (bl-użu ta' limitu ta' test ta' 0.1 IU/ml) fi kwalunkwe punt ta' żmien wara t-tlestija tal-profilassi anti-CMV kellhom rata sinifikament aktar baxxa tal-marda b'onset tard ta' 12-il xahar wara t-trapjant (6.4%), meta mqabbla ma' dawk li kellhom riżultat mhux reattiv għall-QF-CMV (22.2%) u riżultat indeterminat (58.3%, $p < 0.001$). Meta r-riżultati indeterminati ġew ikklassifikati bħala "mhux reattivi" wkoll, l-inċidenza tal-marda tas-CMV sussegwenti kienet ta' 6.4% vs. 26.8%, $p = 0.024$. Il-valuri predittivi pożittivi u negattivi tal-QF-CMV għall-protezzjoni mill-marda tas-CMV ġew irrappurtati li huma 0.90 (95% CI 0.74–0.98) u 0.27 (95% CI 0.18–0.37), rispettivament. Dan l-istudju sab li l-QF-CMV jista' jkun utli biex ibassar jekk il-pazjenti humiex f'riskju baxx, intermedju, jew għoli għall-iżvilupp ta' marda tas-CMV sussegwenti wara l-profilassi.

Fi studju prospettiv ta' 55 riċevitur ta' trapjant ta' organu solidu (8) fejn ġiet analizzata r-relazzjoni bejn ir-riżultati tal-QF-CMV ta' qabel it-trapjant u l-episodji ta' replikazzjoni tas-CMV ta' wara t-trapjant, instab li ġiet osservata inċidenza oġġla ta' replikazzjoni tas-CMV ta' wara t-trapjant fir-riċevituri seropożittivi għas-CMV b'riżultat tal-QF-CMV ta' qabel it-trapjant mhux reattiv (bl-użu ta' limitu ta' test ta' 0.2 IU/ml) (7/14 jew 50%), meta mqabbla ma' dawk ir-riċevituri seropożittivi għas-CMV b'riżultat reattiv għall-QF-CMV ta' qabel it-trapjant (4/30 jew 13.3%, $p = 0.021$).

Dan l-istudju sab li r-riċevituri b'rispons mhux reattiv għall-QF-CMV qabel it-trapjant li rċewew organu minn donatur seropożittiv għas-CMV kellhom riskju għaxar darbiet akbar ta' replikazzjoni tas-CMV meta mqabbla ma' dawk ir-riċevituri b'rispons reattiv għall-QF-CMV reattiv qabel it-trapjant (OR aġġustat 10.49, 95% CI 1.88–58.46). Għalhekk, analiżi QF-CMV qabel it-trapjant tista' tkun utli fit-tbassir tar-riskju għar-replikazzjoni tas-CMV wara t-trapjant u b'hekk tippermetti l-individwalizzazzjoni tal-ġestjoni tal-infezzjoni tas-CMV wara trapjant ta' organu solidu.

Numru ta' studji oħra li jinvestigaw id-detezzjoni ta' risponsi taċ-ċelluli T CD8+ speċifiċi għas-CMV permezz ta' QF-CMV f'grupp ta' riċevituri ta' trapjanti tlestew (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) jew bħalissa għaddejjin madwar id-dinja.

Linji gwida ta' kunsens internazzjonali dwar il-ġestjoni taċ-ċitomegalovirus fit-trapjant ta' organi solidi

L-importanza tal-monitoraġġ immuni speċifiku għas-CMV ġiet rikonoxxuta u ppubblikata fl-*Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (Linji Gwida ta' Kunsens Internazzjonali Aġġornati dwar il-Ġestjoni taċ-Ċitomegalovirus fit-Trapjant ta' Organi Solidi) (12). Dawn il-linji gwida internazzjonali, żviluppati minn bord ta' esperti dwar is-CMV u tat-trapjant ta' organi solidi, imlaqqa' mit-Taqsuma tal-Mard Infettiv tas-Socjeta' tat-Trapjant, jirrappreżentaw linji gwida ta' kunsens ibbażati fuq l-evidenza u l-opinjoni esperta dwar il-ġestjoni tas-CMV inklużi: id-dijanostika, l-immunologija, il-prevenzjoni u t-trattament.

Dawn il-linji gwida kkonkludew li "Il-monitoraġġ immuni tar-risponsi taċ-ċelluli T speċifiċi għas-CMV jista' jbassar individwi f'riskju ta' marda tas-CMV wara t-trapjant u jista' jkun utli biex jiggwida l-profilassi u t-terapija preventivi" (12).

Barra minn hekk, il-linji gwida pprovdeu ukoll rakkomandazzjonijiet dwar l-attributi tal-assaġġ ideali ta' monitoraġġ immuni, li inkludew:

- Il-ħila li jiġu vvalutati l-kwantità u l-funzjoni taċ-ċelluli T CD4⁺ u CD8⁺ ta' riċevitur ta' trapjant
- Il-ħila li jitkejjel l-IFN- γ
- Semplici biex titwettag, kosteffettiva u riproducibbli
- Ikollu ħin ta' tibdil rapidu
- Jippermettu li l-kampjuni jintbagħtu faċilment lil laboratorji ta' riferiment speċjalizzati

II-QF-CMV jissodisfa kważi l-kriterji kollha speċifikati minn dawn il-linji gwida u jirrappreżenta l-uniku assaġġ standardizzat ta' monitoraġġ immuni kapaċi li jidentifika l-IFN- γ , speċifiku għas-CMV.

Karatteristiċi tal-Prestazzjoni tal-Assaġġ

Il-QF-CMV ELISA juża standard rikombinanti uman tal-IFN- γ , li ġie analizzat kontra preparazzjoni ta' referenza tal-IFN- γ (NIH Ref: Gxg01-902-535). Ir-riżultati għall-kampjuni tat-test huma rrappurtati f'Unitajiet Internazzjonali (IU) relattivament għall-kurva standard ippreparata billi tiġi ttestjata d-dilwizzjoni tal-istandard sekondarju fornut mal-kitt.

Antikorpi eterofili (eż., umani anti-ġrieden) fis-seru jew fil-plażma ta' ċertu individwi huma magħrufa li jikkawżaw interferenza mal-immunoassaġġi. L-effett tal-antikorpi eterofili fil-QF-CMV ELISA jiġi minimizzat biż-żieda ta' seru normali tal-ġrieden mad-Dilwent Aħdar u l-użu ta' frammenti ta' antikorpi monoklonali F(ab')₂ bħala l-antikorp tal-qbid tal-IFN- γ miksi mal-bwieri tal-mikropjastri.

Il-limitu tal-iskoperta tal-QF-CMV ELISA huwa ta' 0.065 IU/ml u m'hemm l-ebda evidenza ta' fenomenu ta' inibizzjoni b'doża għolja b'konċentrazzjonijiet ta' IFN- γ sa 10,000 IU/ml. L-antikorpi tal-QF-CMV ELISA ntwerew li ma jirreaġixxu mal-ebda ċitokini ttestjati, inklużi IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 u IL12.

Il-QF-CMV ELISA ntweraw li huwa lineari billi tqiegħdu ħames repliki ta' 11-il pools ta' plażma ta' konċentrazzjonijiet magħrufa tal-IFN- γ b'mod każwali fuq il-pjastra tal-ELISA. Il-linja ta' rigressjoni lineari għandha inklinazzjoni ta' 1.002 ± 0.011 u koeffiċjent ta' korrelazzjoni ta' 0.99 (Figura 7).

Livell determinat tal-IFN- γ

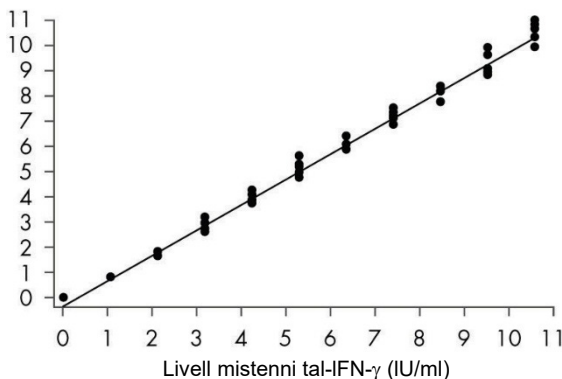


Figura 7. Profil ta' linearità tal-QF-CMV ELISA determinat mill-ittestjar ta' ħames repliki ta' 11-il kampjun tal-plażma b'konċentrazzjonijiet magħrufa ta' IFN- γ .

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

L-impreċiżjoni fi ħdan it-test jew intraassaġġ ġiet stmata billi ttieħdet medja tal-%CVs għal kull plażma tat-test li fiha IFN- γ minn kull test tal-pjastra ($n = 9$) u varja minn 4.1 sa 9.1%CV. Il-medja tal-%CV ($\pm 95\%$ CI) fi ħdan il-ġirja kienet ta' $6.6\% \pm 0.6\%$. Il-plażma żero IFN- γ kellha medja ta' 14.1%CV.

L-impreċiżjoni totali jew interassaġġ ġiet determinata billi tqabblu s-27 konċentrazzjoni kkalkulata tal-IFN- γ għal kull kampjun tal-plażma u varjat minn 6.6 sa 12.3%CV. Il-medja ġenerali ta' %CV ($\pm 95\%$ CI) kienet ta' $8.7\% \pm 0.7\%$. Il-plażma bl-IFN- γ uriet CV ta' 26.1%. Dan il-livell ta' varjazzjoni huwa mistenni għaliex il-konċentrazzjoni kkalkulata ta' IFN- γ hija baxxa u l-varjazzjoni madwar stima baxxa ta' konċentrazzjoni se tkun akbar minn dik għal konċentrazzjonijiet ogħla.

Informazzjoni Teknika

Riżultati indeterminati

Ir-riżultati indeterminati jistgħu jkunu relatati mal-istatus immuni tal-individwu li qed jiġi ttestjat, iżda jistgħu jkunu relatati wkoll ma' numru ta' fatturi tekniċi:

- Iktar minn 16-il siegħa mit-teħid tad-demem sal-inkubazzjoni f'temperatura ta' 37°C
- Hażna tad-demem barra mill-medda tat-temperatura rakkomandata (22°C ± 5°C)
- Taħlit insuffiċjenti tat-tubi tal-ġbir tad-demem
- Hasil mhux komplut tal-pjastra ELISA

Jekk ikun hemm suspett ta' problemi tekniċi bil-ġbir jew il-ġestjoni tal-kampjuni tad-demem, irrepeti t-test tal-QF-CMV mill-ġdid b'kampjuni tad-demem ġodda. Ir-ripetizzjoni tat-test ELISA tal-plażmi stimulat tista' titwettaq jekk ikun hemm suspett ta' xi devjazzjoni proċedurali fit-test ELISA. Riżultati indeterminati (minn valuri baxxi ta' Mitoġenu) ma jkunux mistennija li jinbidlu wara ripetizzjoni sakemm ma jkunx hemm żball fit-test ELISA.

Kampjuni tal-plażma magħquda

Jekk iseħħu emboli tal-fibrina waqt il-ħażna fit-tul ta' kampjuni tal-plażma, iċċentrifuga l-kampjuni biex is-toħloq sediment tal-materjal magħqud u tiffaċilita l-pipettar tal-plażma.

Gwida għas-Soluzzjoni tal-Problemi

Din il-gwida għas-soluzzjoni tal-problemi tista' tkun ta' għajjnuna biex issolvi kwalunkwe problema li tista' tinqala'. Għal aktar informazzjoni, ara wkoll l-**Informazzjoni Teknika** pprovduta fuq **www.QuantiFERON.com**. Għall-informazzjoni ta' kuntatt ara l-qoxra ta' wara.

Kummenti u suġġerimenti

Qari tad-densità ottika baxx għall-istandards

- | | |
|--|--|
| a) Żball standard tad-dilwizzjoni | Żgura li d-dilwizzjonijiet tal-Istandard tal-Kitt huma ppreparati b'mod korrett skont il-Fuljett ta' Tagħrif tal-QF-CMV ELISA. |
| b) Żball fl-użu tal-pipetti | Żgura li l-pipetti huma kkalibrati u użati skont l-Istruzzjonijiet tal-manifattur. |
| c) It-temperatura ta' inkubazzjoni baxxa wisq | L-inkubazzjoni ta' ELISA għandha titwettaq fit-temperatura tal-kamra ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). |
| d) Il-hin tal-inkubazzjoni qasir wisq | L-inkubazzjoni tal-pjastra bil-konjugat, l-istandards u l-kampjuni għandha tkun ta' 120 ± 5 minuti. Is-Soluzzjoni tas-Sottostrat tal-Enzima tiġi inkubata fuq il-pjastra għal 30 minuta. |
| e) Intuża l-filtru l-ħażin tal-qarrej tal-pjastr | Il-pjastra għandha tinqara f'450 nm b'filtru ta' referenza bejn 620 u 650 nm. |
| f) Ir-reagenti huma keshin wisq | Ir-reagenti kollha, bl-eċċezzjoni tal-Konċentrat Conjugate 100x, iridu jinġiebu għat-temperatura tal-kamra qabel ma jibda l-assaġġ. Dan jiehu madwar siegħa. |
| g) Il-kitt/komponenti skadew | Żgura li l-kitt jintuża qabel id-data ta' skadenza. Żgura li l-Istandard rikostitwit u l-Konjugat b'Konċentrat ta' 100x jintużaw fi żmien 3 xhur mid-data tar-rikostituzzjoni. |

L-iżvilupp tal-kulur mhuwiex speċifiku

- | | |
|--|--|
| a) Hasil mhux komplut tal-pjastra | Aħsel il-pjastra mill-inqas sitt darbiet b'400 pl/bwejra ta' buffer tal-ħasil. Jistgħu jkunu meħtieġa aktar minn sitt ċikli ta' ħasil skont il-magna tal-ħasil li tkun qed tintuża. Għandu jintuża ħin ta' tixrib ta' mill-inqas 5 sekondi bejn ċiklu u ieħor. |
| b) Kontaminazzjoni inkroċjata tal-bwieri tal-ELISA | Oqgħod attent/a meta tuża l-pipetta u tħallat il-kampjun biex timminimizza r-riskju. |
| c) Il-kitt/komponenti skadew | Żgura li l-kitt jintuża qabel id-data ta' skadenza. Żgura li l-Istandard rikostitwit u l-Konjugat b'Konċentrat ta' 100x jintużaw fi żmien 3 xhur mid-data tar-rikostituzzjoni. |

Kummenti u suġġerimenti

- | | |
|--|---|
| d) Is-Soluzzjoni tas-Sottostrat tal-Enżima hija kkontaminata | Armi s-sottostrat jekk teżisti kulurazzjoni blu. Żgura li qed jintużaw reċipjenti tar-reagenti nodfa. |
| e) Taħlit tal-plażma f'tubi taċ-ċentrifuga qabel il-ġbir | Kun żgur li l-kampjuni tal-plażma jinġabru bir-reqqa minn fuq il-ġell mingħajr ma jiġu ppipettati 'l fuq u 'l isfel, filwaqt li toqgħod attent li ma tfixkilx il-materjal fuq il-wiċċ tal-ġell. |

Sfond għoli

- | | |
|--|--|
| a) Hasil mhux komplut tal-pjastra | Aħsel il-pjastra mill-inqas sitt darbiet b'400 pl/bwejra ta' buffer tal-ħasil. Jistgħu jkunu meħtieġa aktar minn sitt ċikli ta' hasil skont il-magna tal-ħasil li tkun qed tintuża. Għandu jintuża ħin ta' tixrib ta' mill-inqas 5 sekondi bejn ċiklu u iehor. |
| b) Temperatura ta' inkubazzjoni għolja wisq | L-inkubazzjoni ta' ELISA għandha titwettagħ f'temperatura tal-kamra ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). |
| c) Il-kitt/komponenti skadew | Żgura li l-kitt jintuża qabel id-data ta' skadenza. Żgura li l-istandard rikostitwit u l-Konjugat b'Konċentrat ta' 100x jintużaw fi żmien 3 xhur mid-data tar-rikostituzzjoni. |
| d) Is-Soluzzjoni tas-Sottostrat tal-Enżima hija kkontaminata | Armi s-sottostrat jekk teżisti kulurazzjoni blu. Żgura li qed jintużaw reċipjenti tar-reagenti nodfa. |

Kurva standard mhux lineari u varjabbiltà duplikata

- | | |
|---|--|
| a) Hasil mhux komplut tal-pjastra | Aħsel il-pjastra mill-inqas sitt darbiet b'400 pl/bwejra ta' buffer tal-ħasil. Jistgħu jkunu meħtieġa aktar minn sitt ċikli ta' hasil skont il-magna tal-ħasil li tkun qed tintuża. Għandu jintuża ħin ta' tixrib ta' mill-inqas 5 sekondi bejn ċiklu u iehor. |
| b) Żball standard tad-dilwizzjoni | Żgura li d-dilwizzjonijiet tal-istandard tal-kitt huma ppreparati b'mod korrett skont dan il-Fuljett ta' Tagħrif. |
| c) Taħlit fqir | Ħallat ir-reagenti sewwa billi taqlibhom ta' taħt fuq jew thawwad bil-mod qabel ma żżidhom mal-pjastra. |
| d) Teknika tal-użu tal-pipetti inkonsistenti jew interruzzjoni waqt it-twaqqif tal-assaġġ | Iż-żieda tal-kampjun u tal-istandard għandha titwettagħ b'mod kontinwu. Ir-reagenti kollha għandhom jiġu ppreparati qabel ma jibda l-assaġġ. |

Informazzjoni dwar il-prodott u gwidi tekniċi huma disponibbli b'xejn mingħand QIAGEN, permezz tad-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

Is-simboli li ġejjin jistgħu jidhru fuq l-imballaġġ u t-tikkettar:

Simbolu	Definizzjoni tas-simboli
	Fih reaġenti biżżejjed għal <N> reazzjonijiet
	Uża sa
	Markatura CE
	Apparat mediku dijanjostiku in vitro
	Numru tal-katalgu
	Numru tal-lott
	Numru tal-materjal
	Numru tal-Oġġett Kummerċjali Globali
	Limitazzjoni tat-temperatura
	Terġax 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 ta' Appoġġ Tekniku tagħna fuq **www.qiagen.com/Support**, ċempel fuq 00800-22-44-6000, jew ikkuntattja wieħed mid-Dipartimenti tas-Servizz Tekniku ta' QIAGEN jew distributuri lokali (ara l-qoxra ta' wara jew żur **www.qiagen.com**).

Proċedura Mqassra tat-Test ELISA

Stadju 1: Inkubazzjoni tad-demm

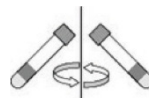
1. Iġbor id-demm tal-pazjent fit-tubi tal-ġbir tad-demm u ħallat billi tħawwadhom għaxar (10) darbiet sew biżżejjed biex tiżgura li l-wiċċ ta' ġewwa kollu tat-tubu jkun miksi bid-demm, biex jinħallu l-antigeni fuq il-ħitan tat-tubu.



2. Inkuba t-tubi weqfin f'temperatura ta' $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ għal 16 sa 24 siegħa.



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



4. Wara ċ-ċentrifugazzjoni, evita li tippipetta 'l fuq u 'l isfel jew li tħallat il-plażma bi kwalunkwe mezz qabel il-ġbir. F'kull ħin, oqgħod attent/a li ma tiddistribwixxix il-materjal fuq il-wiċċ tal-ġell.



Stadju 2: IFN- γ ELISA

1. Ekwilibra l-komponenti ELISA, bl-eċċezzjoni tal-Konjugat b'Konċentrat ta' 100x, għat-temperatura tal-kamra għal mill-inqas 60 minuta.



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

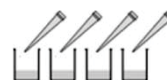


3. Irrikostitwixxi l-Konjugat lijoofilizzat b'Konċentrat ta' 100x b'ilma distillat jew dejonizzat.

4. Ipprepara l-konjugat tas-saħħa tax-xogħol fid-Dilwent Aħdar u žid 50 μ l mal-bwieri kollha.



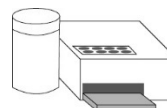
5. Žid 50 μ l kampjuni tal-plażma tat-test u 50 μ l standards fil-bwieri x-xierqa. Ħallat permezz ta' apparat tat-taħlit.



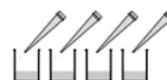
6. Inkuba għal 120 minuta fit-temperatura tal-kamra.



7. Aħsel il-bwieri mill-inqas 6 darbiet b'400 μ l/bjar ta' buffer tal-ħasil.



8. Žid 100 μ l Soluzzjoni tas-Sottostrat tal-Enżima fil-bwieri. Ħallat permezz ta' apparat tat-taħlit.



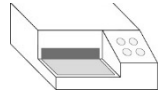
9. Inkuba għal 30 minuta fit-temperatura tal-kamra.



10. Żid 50 μ l ta' Soluzzjoni tas-Sottostrat tal-Enżima fil-bwieri kollha.
Hallat permezz ta' apparat tat-taħlit.



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



12. Analizza r-riżultati



Kronoloġija tar-Revizjonijiet tal-Manwal

Dokument	Bidliet	Data
L1075110-R06	Materjali meħtieġa iżda mhux ipprovduti, għotjien tal-pjastri miżjuda, paġna 9	Ottubru 2019

Din il-paġna tballiet vojta intenzjonalment

Din il-paġna thalliet vojta intenzjonalment

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

Ftehim ta' Liċenzja Limitata għal QuantiFERON-CMV ELISA

L-użu ta' dan il-prodott jindika l-qbil ta' kwalunkwe xerrej jew utent tal-prodott mat-termini li ġejjin:

1. Il-prodott jista' jintuża biss skont il-protokoll pprovduti mal-prodott u ma' dan il-manwal u għall-użu mal-komponenti li jinsabu fil-pannell biss. QIAGEN ma tagħti l-ebda liċenzja taht xi proprjetà intellettuali tagħha biex tuża jew tinkorpora l-komponenti mehmuzi ta' dan il-pannell ma' xi komponenti mhux inkluzi f'dan il-pannell hliel kif deskritt fil-protokoll pprovduti mal-prodott, f'dan il-manwal, u fil-protokoll addizzjonali disponibbli fuq www.qiagen.com. Uħud minn dawn il-protokoll addizzjonali ġew ipprovduti minn utenti ta' QIAGEN għal utenti ta' QIAGEN. Dawn il-protokoll ma ġewx ittestjati jew ottimizzati bir-reqqa minn QIAGEN. QIAGEN la tiggarantihom u lanqas ma tiggarantixxi li ma jksrux id-drittijiet ta' parti terza.
2. Minbarra l-liċenzji espressament iddikjarati, QIAGEN ma tagħti l-ebda garanzija li dan il-pannell u/jew l-użu/i tiegħu ma jksrux id-drittijiet ta' parti terza.
3. Dan il-pannell u l-komponenti tiegħu huma liċenzjati sabiex jintużaw darba biss u ma jistgħux jerġġu jintużaw, jiġu rinnovati, jew jinbiegħu mill-ġdid.
4. QIAGEN tiġhad speċifikament kwalunkwe liċenzja oħra, espressa jew impliċita għajr dawk iddikjarati espressament.
5. Ix-xerrej u l-utent tal-pannell jaqblu li ma jiddux u lanqas ma jippermettu lil xi haddieħor biex jieh u passi li jistgħu jwasslu jew jiffacilitaw xi atti li huma pprobiti hawn fuq. QIAGEN tista' tinforza l-projbizzjonijiet ta' dan il-Ftehim ta' Liċenzja Limitata fi kwalunkwe Qorti, u għandha tirkupra l-ispejjeż investigattivi u tal-Qorti kollha tagħha, inkluzi l-miżati tal-avukati, fi kwalunkwe azzjoni biex tinforza dan il-Ftehim ta' Liċenzja Limitata jew kwalunkwe wiehed mid-drittijiet tal-proprjetà intellettuali tagħha relatati mal-bord u/jew il-komponenti tiegħu.

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

© 2019 QIAGEN, id-drittijiet kollha riżervati.

