
QuantiFERON[®]-CMV

Fuljett tal-Pakkett 2 x 96

It-test li jkejjel ir-risponsi ta' interferon-gamma f'demm
sħiħ għal antigeni ta' peptidi ta' Ċitomegalovirus Uman.

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, L-Awstralja

Telefown (L-Awstralja) +613-9840-9800, (L-Ewropa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, IL-ĠERMANJA

1075110MT Rev. 01



Werrej

Użu Maħsub	5
Daħla	5
Il-Prinċipji tal-Assaġġ	5
Ħin Meħtieġ biex jitwettaq l-Assaġġ	6
Reaġenti u Ħażna	6
Materjali Meħtieġa Iżda Mhux Provdu	7
Ħażna u Ġestjoni	7
Twissijiet u Prekawzjonijiet	8
Ġbir ta' Kampjuni u Ġestjoni	9
Istruzzjonijiet dwar l-Użu	10
Stadju 1 — Inkubazzjoni tad-demem u ħsad tal-plażma	10
Stadju 2 — QuantiFERON-CMV ELISA għal IFN-γ Uman	10
Kalkolazzjonijiet u Interpretazzjoni tat-Test	13
Interpretazzjoni tar-Riżultati	14
Limitazzjonijiet	14
Valuri Mistennija	15
Karatteristiċi ta' Prestazzjoni	16
Ittestjar ta' previżjoni	16
Referenza tal-assaġġ	17
Studji Kliniċi	17
Speċifiċità	17
Sensittività	18
Studji li jenfasizzaw l-utilità klinika	18
Linji gwida ta' kunsens internazzjonali dwar il-ġestjoni ta' citomegalovirus fi trapjanti ta' organi solidi	20
Karatteristiċi ta' Prestazzjoni tal-Assaġġ	21
Informazzjoni Teknika	23
Riżultati Inkonklussivi	23
Gwida għal meta jinqalgħu problemi	24
Biblijografija	25
Servizz Tekniku	26

Proċedura tat-Test fil-Qosor	27
Stadju 1 — Inkubazzjoni tad-demm	30
Stadju 2 — IFN- γ ELISA	30

Użu Maħsub

QuantIFERON-CMV (QF-CMV) huwa assaġġ in vitro li juża koktejl ta' peptidi li jissimulaw proteini ta' cito-megalovirus uman (CMV) biex jistimulaw ċelluli f'demm sħiħ eparinizzat. L-osservazzjoni ta' interferon-gamma (IFN- γ) b'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) jiġi użat biex jikkwantifika r-risponsi in vitro ta' dawn l-antiġeni peptidi li huma assoċjati ma' kontroll immunoloġiku 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 l-livell ta' immunità anti-CMV tal-pazjent.

QF-CMV mhux test biex jistabilixxi jekk hemmx infezzjoni ta' CMV u m'għandux jintuża biex jeskludi infezzjoni b'CMV.

Daħla

CMV huwa virus ta' herpes li jinfetta bejn 50-85% ta' adulti fil-popolazzjoni. Huwa komplikazzjoni li sseħħ ta' spiss minħabba trażżin immunoloġiku, b'mod partikolari wara trapjanti, u jista' jikkontribwixxi għal morbidità u mortalità f'reċipjenti ta' trapjanti. Terapiji immunosoppressivi attwali użati biex jipprevjenu r-riġetazzjoni ta' organu trapjantat għandhom effett detrimental fuq il-limfoċiti-T u r-risponsi immuni li jsiru permezz ta' ċelluli (CMI -cell mediated immune response), li jirriżultaw f'suxxetibilità oġġla għal infezzjonijiet virali ta' wara t-trapjant. L-importanza tal-funzjoni ċellulari tal-limfoċiti T fit-trażżin tar-replikazzjoni ta' CMV huwa wkoll innotat mill-fatt li limfoċiti T ċitotossici (CTLs - cytotoxic T-Lymphocytes) CD8⁺ speċifiċi għal CMV jistgħu jiproteġu f'patogenesi assoċjata mal-virus. L-enumerazzjoni ta' CTLs speċifiċi ta' CD8⁺ CMV f'pazjenti immunosoppressati u l-produzzjoni ta' IFN- γ jistgħu jkunu ta' previżjoni dwar ir-riskju li jiżviluppa mard ta' CMV. Il-produzzjoni ta' IFN- γ jista' jkun sostitut funzjonali għall-identifikazzjoni ta' CTLs speċifiċi għal CMV.

QF-CMV huwa assaġġ għar-rispons ta' CMI għal antiġeni ta' peptidi li jissimulaw il-proteini ta' CMV. Il-peptidi ta' CMV huma disinjati biex jimmiraw għal ċelluli T CD8⁺, li jinkludu A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 u Cw6 (A30, B13) ħaplotipi HLA ta' Klassi I li jkopru >98% tal-popolazzjoni tal-bniedem. Individwi infettati b'CMV ġeneralment għandhom limfoċiti CD8⁺ fid-demm tagħhom li jirrikonossu dawn l-antiġeni. Dan il-proċess ta' rikonossiment jinvolvi l-ġenerazzjoni u t-tnixxija ta' ċitokin, IFN- γ . Is-sejba u l-kwantifikazzjoni sussegwenti ta' IFN- γ jiffurmaw il-bażi ta' dan it-test.

Il-Prinċipji tal-Assaġġ

It-test ta' AF-CMV isir f'2 stadji. L-ewwel, demm sħiħ jiġi miġbur f'kull wieħed mit-tubi tad-demm għal QF-CMV, li jinkludu tubu ta' Kontroll Nil, tubu t'Antiġen ta' CMV, u tubu ta' Mitogen.

It-tubu ta' Mitogen jintuża fit-test ta' QF-CMV bħala kontroll pożittiv. Dan jista' jkun meħtieġ fejn ikun hemm dubju dwar l-istat immunoloġiku tal-individwu.

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

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

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

Test hu kkonsidrat 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 Mitogen iservi bħala kontroll pożittiv ta' IFN- γ għal kull kampjun ittestjat. Rispons baxx għal Mitogen jindika riżultat inkonklussiv meta kampjun tad-demmm ikollu wkoll rispons mhux reattiv għall-antigeni ta' CMV. Din l-iskema tista' sseħħ b'limfoċiti insuffiċjenti, attività limfoċitika mnaqqsa minħabba ġestjoni skorretta tal-kampjun, mili/taħlit mhux korrett tat-tubu Mitogen, jew l-inkapaċità tal-limfoċiti tal-pazjent li jiġġeneraw IFN- γ , bħal f'kazijiet ta' pazjenti bi trapjant riċenti. Il-kampjun Nil jaġġusta għal IFN- γ fl-isfond jew mhux speċifiċi f'kampjuni tad-demmm. Il-livell ta' IFN- γ fin-Nil tube jiġi mnaqqas mil-livell ta' IFN- γ għat-tubu ta' CMV Antigen u t-tubu Mitogen (irreferi għal "Interpretazzjoni tar-Riżultati" f'paġna 14 ta' dan il-Fuljett tal-Pakkett għal gabra fil-qosor dwar kif ir-riżultati ta' QF-CMV jiġu interpretati).

Fin Meħtieġ biex Jitwettaq l-Assaġġ

Il-ħin meħtieġ sabiex isir l-assaġġ ta' QF-CMV hu stmat hawn isfel: il-ħin tal-ittejtjar ta' kampjuni multipli meta miġbura f'lott huwa wkoll indikat:

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

Reaġenti u Hażna

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) Tubi għal Ġbir tad-Demm għal CMV u l-Kontroll għall-Antigen (Pakkett Wieħed għal Pazjent)	
Nru tal-Katalgu	0192-0301
Numru ta' preparazzjonijiet	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON Kontroll Nil) (tapp griż)	Tubu 1
CMV Antigen (Antigen ta' CMV) (tapp blu)	Tubu 1
QuantiFERON Mitogen Control (Kontroll Mitogen ta' QuantiFERON) (tapp vjola)	Tubu 1
Fuljett tal-Pakkett	1
QuantiFERON-CMV ELISA Components (Komponenti ta' QuantiFERON-CMV ELISA)	
Nru tal-Katalgu	0350-0201
Strippi għal microplate	24 x 8 stripi għat-toqob
Human IFN- γ Standard (Standard Uman ta' IFN- γ), lijoġilizzat	Fjala x 1
Green Diluent (Dilwent Aħdar)	1 x 30 ml
QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate (Konjugat ta' QuantiFERON Konċentrat 100X), lijoġilizzat	1 x 0.3 ml
QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate (Wash Buffer ta' QuantiFERON Konċentrat 20X)	1 x 100 ml
QuantiFERON Enzyme Substrate Solution (Soluzzjoni ta' Sottostrat għall-Enzima ta' QuantiFERON)	1 x 30 ml
QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Soluzzjoni li Twaqqaf l-Enzima ta' QuantiFERON)	1 x 15 ml

Materjal Meħtieġ Iżda Mhux Provdut

- Inkubatur ta' 37°C; CO₂ mhux meħtieġ
- Pipetti kkalibrati ta' volum varjabbli sabiex jfornu minn 10 µl sa 1000µl bi truf li jintużaw darba u jintremew
- Pipetti kkalibrati multikanali li kapaċi jfornu minn 50 µl u 100 µl bi truf li jintużaw darba u jintremew
- Shaker għal microplate
- Ilma deijonizzat jew distillat, 2 litri
- Washer għal microplate (washer awtomatizzat rakkomandat)
- Microplate reader mgħammar b'filter ta' 450 nm u filter ta' riferiment ta' 620 nm sa 650 nm

Hażna u Ġestjoni

Tubi għall-Ġbir tad-Demm

- Żomm it-tubi tal-ġbir tad-demm f'temperatura bejn 4°C u 25°C.
- Iż-żmien massimu ta' kemm idumu tajbin it-tubi ta' ġbir tad-demm ta' QuantiFERON-CMV huwa ta' 15-il xahar mid-data tal-produzzjoni, meta miżmuma f'temperatura bejn 4°C u 25°C.

Reaġenti għal Kitt ta' ELISA

- Añžen il-kitt f'temperatura bejn 2°C u 8°C.
- Ipproteġi dejjem l-Enzyme Substrate Solution mix-xemx diretta

Reaġenti mhux rekostitwiti u li ma ntuzawx

Għall-istruzzjonijiet dwar kif għandek tirrikostitwixxi r-reaġenti, jekk jogħġbok ara l-"Istruzzjonijiet dwar l-Użu - Stadju 2" (il-passi 3 u 5 fil-paġni 10 u 11).

- Il-Kitt Standard rikostitwit jista' jinżamm sa 3 xhur jekk jinħażen f'temperatura bejn 2°C u 8°C.

Innota d-data li fih il-Kitt Standard kien rikostitwit.

- Ġaladarba rikostitwit, il-Quantiferon Conjugate 100X Concentrate għandu jiġi ritornat lura għall-ħażna f'temperatura bejn 2°C u 8°C u għandu jintuża fi żmien 3 xhur.

Innota d-data li fih il-Konjugat kien rikostitwit.

- Il-konjugat ta' qawwa li bih ser taħdem għandu jintuża fi żmien 6 sigħat minn x'hin ikun ġie preparat.
- Il-Wash Buffer ta' qawwa li bih ser taħdem jista' jinżamm f'temperatura ambjentali (17°C sa 27°C) għal sa ġimagħtejn.

Twissijiet u Prekawzjonijiet

Għal Użu Dijanjostiku In Vitro.

Meta taħdem b'kimiċi, dejjem għandek tilbes ġigaga adattata, ingwanti li jintremew wara l-użu, u nuċċali protettivi. Għal aktar tagħrif, jekk jogħġbok ikkonsulta l-fuljetti xierqa dwar tagħrif fuq is-sigurtà (SDS). Dawn huma disponibbli onlajn f'għamla ta' PDF konvenjenti u kumpatt fuq www.qiagen.com/safety fejn tista' ssib, tara u tistampa l-SDS ta' kull kitt ta' QIAGEN u l-komponent tal-kitt.



ATTENZJONI: Iġġestixxi d-demem uman bħaliekieku huwa potenzjalment infettiv. Osserva l-linji gwida rilevanti dwar kif għandek tiġġestixxi d-demem.

Il-frażijiet dwar ir-riskju u s-sigurtà li ġejjin japplikaw għall-komponenti tal-Kitt ta' QF-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (Soluzzjoni li Twaqqaf l-Enzima ta' QuantiFERON)



Fih sulfuric acid: Irritanti. Frażijiet ta' riskju u sigurtà: * R36/38, S26-36/37/39

■ **Green Diluent** fih serum normali tal-ġurdien u casein, li jista' jqanqal rispons allergiku; evita l-kuntatt mal-ġilda.

Għal Emergenza Kimika

Tixrid, Tnixxija, Esponiment, jew Aċċident

Ċempel lil CHEMTREC Filgħodu jew Filgħaxija

FI-Istati Uniti u l-Kanada 1-800-424-9300

Barra l-Istati Uniti u l-Kanada +1-703-527-3887 (sejñiet irriversjati aċċettati)

Aktar tagħrif

Fuljetti ta' Tagħrif dwar is-Sigurtà: www.qiagen.com/safety

*R36/38: Irritanti għall-għajnejn u l-ġilda; S26 F'każ ta' kuntatt mal-għajnejn, laħlaħ minnufih b'ħafna ilma u fittex għajjnuna medika; S36/37/39 Ilbes indumenti protettivi adattati, ingwanti u protezzjoni għall-għajnejn/wiċċ.

Ġbir ta' kampjuni u Ġestjoni

Punti importanti qabel tibda:

Devjazzjonijiet mill-fuljett tal-pakkett għal QF-CMV jistgħu jwasslu għal riżultati żbaljati. Jekk jogħġbok aqra l-istruzzjonijiet b'attenzjoni qabel ma tuża.

- M'għandekx tuża l-kitt jekk xi flixxun ta' reaġent juri sinjali ta' ħsara jew tnixxija qabel l-użu.
- M'għandekx tħallat jew tuża reaġenti ta' ELISA minn lottijiet ta' kitts oħra ta' QF-CMV ELISA
- Armi reaġenti mhux użati u kampjuni bijoloġiċi b'mod konformi mar-regolamenti Lokali, Statali, u Federali.
- M'għandekx tuża t-tubi tal-ġbir tad-demem ta' QF-CMV jew il-kitts ta' QF-CMV ELISA wara d-data ta' skadenza.

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

- 1 Nil Control (Kontroll Nil) (tapp griż)
2. CMV Antigen (tapp blu)
3. Kontroll ta' Mitogen (tapp vjola)

L-antiġeni ġew mnixxa fuq il-wiċċ ta' ġewwa tat-tubi li fihom jingabar id-demem, u allura huwa essenzjali li l-kontenut tat-tubi jithallat sew mad-demem. It-tubi għandhom jiġu trasferiti go inkubatur f'temperatura ta' 37°C kemm jista' jkun malajr, u fi żmien 16-il siegħa minn meta jingabru.

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

1. **Għal kull pazjent iġbor 1 ml ta' demm billi ttaqqab il-vina direttament f'kull wieħed mit-tubi ta' ġbir tad-demem ta' QF-CMV.**
 - Peress li t-tubi ta' 1 ml jiġbdu d-demem 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 l-volum korrett ikun ġie miġbud.
Il-marka s-sewda fuq in-naħa tat-tubi tindika safejn hu meħtieġ li jimtela għall-volum ta' 1 ml. It-tubi għall-ġbir tad-demem ta' QF-CMV ġew invalidati għal volumi li jvarjaw minn 0.8 ml sa 1.2 ml. Jekk il-livell ta' demm fi kwalunkwe tubu mhux qrib is-sinjali indikatur, huwa rakkomandat li jittieħed kampjun tad-demem ieħor.
 - It-tubi tal-ġbir tad-demem ta' QF-CMV ġew invalidati sabiex fihom jingibed 0.8 ml u 1.2 ml f'altitudni ta' livell ta' baħar sa 810 metri (2650 pied). 'Il fuq minn din l-altitudni, l-utenti għandhom jiżguraw li d-demem jiġi miġbud f'kull tubu fi f'dan dawn il-limiti. Jekk ikun hemm ftit demm biss, id-demem jista' jingabar b'siringa u 1 ml jiġi trasferit 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 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.
 - Jekk labra farfett qed tintuża biex jingabar id-demem, tubu "tat-tindif" għandu jintuża sabiex jiġi żgurat li l-pajp jimtela bid-demem qabel ma jintużaw it-tubi tal-ġbir tad-demem ta' QF-CMV
2. **Minnufih wara li jimtlew it-tubi, ħallathom għal għaxar (10) darbiet biżżejjed biex tiżgura li l-wiċċ kollu ta' ġewwa tat-tubu jiġi miksi bid-demem, sabiex l-antiġeni li jinsabu mal-wiċċ tat-tubu jinħallu.**
 - It-tubi għandhom jinżammu f'temperatura ta' bejn 17°C–25°C fil-ħin li jkun qed jimtlew.
 - It-taħlit bis-saħħa jista' jikkaguna s-faxxar tal-ġell u jista' jwassal għal riżultati aberranti.
3. **Immarka t-tubi b'mod xieraq.**
4. **It-tubi għandhom jiġu trasferiti għal inkubatur ta' 37°C±1°C kemm jista' jkun malajr, u fi żmien 16-il siegħa mill-ġbir. M'għandekx tqiegħed il-kampjuni tad-demem go friġġ jew friża.**

Istruzzjonijiet dwar I-Użu

Stadju 1 — Inkubazzjoni tad-demm u ħsad tal-plażma

1. Jekk id-demm ma jiġix inkubat minnufih wara l-ġbir, it-taħlit tat-tubi għandu jiġi ripetut minnufih qabel l-inkubazzjoni kif deskritt fl-istadju 2 tas-sezzjoni preċedenti.
2. Inkuba t-tubi WEQFIN f'temperatura ta' 37°C għal bejn 16-il siegħa sa 24 siegħa. L-inkubatur ma jeħtieġ l-ebda CO₂ jew umidifikazzjoni.
3. Wara l-inkubazzjoni, it-tubi tal-ġbir tad-demm jistgħu jinżammu bejn 2°C u 27°C għal sa 3 ijiem qabel l-istadju li jmiss. Wara l-inkubazzjoni tat-tubi f'temperatura ta' 37°C, iċċentrifuga t-tubi għal 15-il minuta b'RCF ta' bejn 2000 sa 3000 (g) li-plagg tal-ġel ser jissepara ċ-ċelluli minn mal-plażma. Jekk dan ma jseħx, it-tubi għandhom jiġu ċentrifugati mill-ġdid b'veloċità akbar.
 - Huwa possibbli l-plażma tinħasad mingħajr ċentrifugazzjoni, imma kura addizzjonali hi meħtieġa sabiex il-plażma titneħħa mingħajr ma tiddisturba ċ-ċelluli.
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.
 - Kampjuni tal-plażma għandhom jinħasdu biss permezz ta' pipetta.
 - Kampjuni ta' plażma jistgħu jiġu kkargati minn tubi tal-ġbir tad-demm ċentrifugat direttament għal ġol-platt tal-QF-CMV ELISA, li jinkludi meta workstations awtomatizzati ta' ELISA jintużaw.
 - Il-kampjuni tal-plażma jistgħu jinħażnu għal sa 28 jum f'temperatura ta' bejn 2°C u 8°C jew, jekk jinħasdu, jew taħt -20°C (imma preferibbilment inqas minn -70°C) għal perijodi estiżi f'tubi jew reċipjenti ta' ħażna għall-plażma.

Stadju 2 — QuantiFERON -CMV ELISA għal IFN-γ Uman

1. Il-kampjuni u r-reagenti kollha tal-plażma, ħlief għal Conjugate 100X Concentrate, għandhom jinġiebu għal temperatura ambjentali tal-kamra (17°C sa 27°C) qabel ma jintużaw. Ħalli tal-anqas 60 minuta sabiex jinħoloq ekwilibriju.
2. Neħhi l-istrippi li mhumiex meħtieġa mill-kwadru, issiġilla mill-ġdid il-pawċ tal-fojl, u rritorna lura lejn il-friġġ għal ħażna sakemm jerġa' jkun meħtieġ.

Ħalli tal-anqas strippa waħda għall-Istandards ta' ELISA għal QF-CMV u biżżejjed strippi għall-għadd ta' pazjenti li qed jiġu ttestjati. Wara l-użu, żomm il-kwadru u l-għatu għal użu bl-istrippi li fadal.
3. Irrikostitwixxi l-Kitt Standard imnixxeff iffriżat bil-volum ta' ilma deijonizzat jew distillat indikati fit-tabella tal-fjal tal-iStandard. Ħallat bil-mod sabiex timinimizza r-ragħwa u aċċerta li jkun hemm risolubilizzazzjoni kompluta. Ir-rikostituzzjoni tal-iStandard għall-volum dikjarat ser tipproduċi soluzzjoni b'konċentrazzjoni ta' 8.0 IU/ml.
4. Il-Kurva Standard tiġi preparata bl-użu ta' 3 dilwazzjonijiet tal-Kitt Standard u l-Green Diluent biss bħala Standard 4 (0 IU/ml).

Uża l-Kitt Standard rikostitwit biex tipproduċi serje ta' dilwazzjonijiet għal 3 konċentrazzjonijiet tal-IFN-γ. Iddilwa l-Green Diluent (GD) fil-kitt (ara Figura 1 fil-paġna li jmiss). L-standards għandhom jiġu assaġġati tal-anqas darbtejn: l-istadji li jmiss jiġġeneraw volum suffiċjenti għal dan.

 - a. Immarka t-tubi "S1", "S2", "S3", "S4".
 - b. Żid 150 µl ta' Diluent Aħdar f'4 tubi (S1-S4)
 - c. Żid 150 µl tal-Kitt Standard f'S1 u ħawwad sew.
 - d. Ittrasferixxi 50 µl minn S1 għal S2 u ħawwad sew.
 - e. Ittrasferixxi 50 µl minn S2 għal S3 u ħawwad sew.

f. Green Diluent waħdu jservi bħala l-istandard żero (S4).

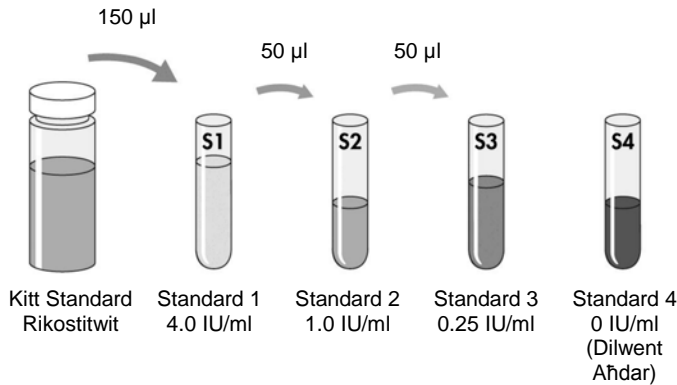


Figura 1. Preparazzjoni tal-Kurva Standard. Ipprepara dilwazzjonijiet friski tal-Kitt Standard għal kull sessjoni ta' ELISA

5. **Irrikostitwixxi QuantiFEON Conjugate 100x Concentrate** imnixxef iffriżżat b' 0.3 ml ta' ilma dejonizzat jew distillat. **Ħallat bil-mod sabiex timminimizza l-formazzjoni ta' ragħwa u iżgura solubizzazzjoni kompluta tal-Konjugat.**
6. **Il-konjugat tal-qawwa li ser jintuża jiġi preparat billi jiġi dilwit l-ammont meħtieġ ta' Conjugate 100X Concentrate rikostitwit fi Green Diluent kif stabbilit f'Tabella 1 - Preparazzjoni tal-Konjugat.**
 - Ħallat sew imma bil-mod sabiex tevita l-formazzjoni ta' ragħwa.
 - Irritorna kull Conjugate 100X Concentrate li ma ntuzax lura għal temperatura ta' 2°C sa 8°C wara l-użu.
 - Uża biss Green Diluent.

Tabella 1. Preparazzjoni ta' Konjugat

Għadd ta' strippi	Volum ta' Conjugate 100X Concentrate	Volum ta' Green Diluent
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

7. **Qabel l-assaġġ, il-plażmi għandhom jithalltu sabiex jiġi żgurat li IFN- γ jiġi distribwit b'mod konsistenti f'kull kampjun. Iddilwa wkoll l-plażma ta' CMV u ta' Mitogen 1/10 fi Green Diluent (10 μ l plażma mħallat ma' 90 μ l GD) jekk riżultati kwantitattivi huma meħtieġa. Il-plażma Nil m'għandux jiġi dilwit.**
- Huwa rakkomandat li l-kampjuni li ġejjin jiġu ttestjati:
- Nil, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)
- Madanakollu, l-għażliet għal kampjuni tal-pazjent li ġejjin jiġu wkoll sostnuti bil-QuantIFERON-CMV Analysis Software.
- Nil, CMV Antigen, Mitogen
 - Nil, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)
 - Nil, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10)
 - Nil, CMV Antigen (1/10), Mitogen
8. **Żid 50 μ l ta' konjugat ta' qawwa li ser taħdem bih li jkun għadu kif ġie preparat għal ġot-toqob tal-ELISA meħtieġa b'pipetta multichannel.**
9. **Żid 50 μ l ta' kampjuni ta' plażma tat-test għal ġot-toqob xierqa permezz tal-pipetta multichannel. FI-aħħar nett, žid 50 μ l kull darba tal-Istandards 1 sa 4.**
10. **Ħallat il-kampjuni tal-konjugat u tal-plażma/standards sew permezz ta' microplate shaker għal minuta.**
11. **Għatti kull platt b'għatu u inkuba fit-temperatura tal-kamra (17°C sa 27°C) għal 120 \pm 5 minuti.**
- Il-platti m'għandhomx ikunu esposti għal xemx diretta waqt l-inkubazzjoni.
12. **Waqt l-inkubazzjoni, iddilwa parti waħda ta' Wash Buffer 20X Concentrate ma' 19-il parti ta' ilma deijonizzat jew distillat u ħallat sew. Ġie provdut biżżejjed Wash Buffer 20X Concentrate sabiex jiġu ppreparati 2 litri ta' buffer għal ħasil ta' qawwa li tista' taħdem bih.**
- Aħsel it-toqob bi 400 μ l ta' buffer tal-ħasil ta' qawwa li tista' taħdem bih għal tal-anqas 6 ċikli. Plate washer awtomatizzata huwa rakkomandat.
- Ħasil sew huwa importanti ħafna għall-prestazzjoni tal-assaġġ. Iżgura li kull toqba hija **kompletament mimlija** b'buffer tal-ħasil sax-xifer għal kull ċiklu ta' ħasil. Perijodu ta' għaddis ta' mill-anqas 5 sekondi bejn ċiklu u ieħor huwa rakkomandat.
 - Diżinfetant standard tal-laboratorju għandu jiġi miżjud mar-riżervwar tal-effluent, u proċeduri stabbiliti għandhom jiġu segwiti għad-dekontaminazzjoni ta' materjal potenzjalment infettiv.
13. **Taptap il-pjatti wiċċhom 'l isfel fuq xuguman assorbenti biex tneħħi buffer tal-ħasil li jkun fadal. Żid 100 μ l ta' Enzyme Substrate Solution (Soluzzjoni ta' Sottostrat għall-Enzima) f'kull toqba u ħallat sew bil-microplate shaker.**
14. **Għatti kull platt b'tapp u inkuba fit-temperatura ambjentali tal-kamra (17°C sa 27°C) għal 30 minuta.**
- Il-platti m'għandhomx ikunu esposti għal xemx diretta waqt l-inkubazzjoni.
15. **Wara inkubazzjoni ta' 30 minuta, žid 50 μ l ta' Enzyme Stopping Solution (Soluzzjoni li Twaqqaf ir-Reazzjoni tal-Enzima) f'kull toqba u ħallat sew.**
- L-Enzyme Stopping Solution għandha tiġi miżjuda fit-toqob bl-istess ordni u b'madwar l-istess veloċità bħal tas-sottostrat fi stadju 13.
16. **Kejjel id-denità ottika (OD) ta' kull toqba fi żmien 5 minuti wara li tkun waqqaft ir-reazzjoni permezz tal-microplate reader mgħammra b'filter ta' 450 nm u b'filter ta' referenza ta' 620 nm sa 650 nm. Il-valuri OD jintużaw biex jikkalkulaw ir-riżultati.**

Kalkolazzjonijiet u Interpretazzjonijiet tat-Test

QuantIFERON Analysis Software, għall-analiżi ta' data mhux maħduma u l-kalkolazzjoni tar-riżultati, hi disponibbli mingħand QIAGEN fuq www.QuantiFERON.com

Is-software iwettaq kontroll tal-kwalità tal-istima tal-assaġġ, jiġġenera kurva standard u jipprovdi riżultat għat-test għal kull pazjent, kif dettalljat fit-taqsimha tal-Interpretazzjoni tar-Riżultati.

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

Ġenerazzjoni tal-Kurva Standard

Stabilixxi l-valuri OD medji tar-repliki tal-Kitt Standard fuq kull platt.

Ibni kurva standard $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ billi tiplottja l- $\log_{(e)}$ tal-OD medju (assi-y) kontra l- $\log_{(e)}$ tal-konċentrazzjoni ta' IFN- γ tal-istandards f' IU/ml (assi-x), u neħħi l-istandard zero minn dawn il-kalkolazzjonijiet. Ikkalkula l-linja tal-aħjar tqegħid (best fit) għall-kurva standard b'analizi rigressiva.

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

Dawn il-kalkolazzjonijiet jistgħu jsiru permezz ta' pakketti tas-software disponibbli ma' microplate readers, u software ta' spreadsheets standard jew tal-istatistika (bħal Microsoft® Excel®). Huwa rakkomandat li dawn il-pakketti jintużaw biex jikkalkulaw l-analiżi rigressiva, il-koeffiċjent ta' varjazzjoni (%CV) għall-istandards, u l-koeffiċjent ta' korelazzjoni (r) tal-kurva tal-istandard

Il-Kontroll tal-Kwalità tat-Test

Il-precizjoni tar-riżultati tat-test huwa dipendenti fuq il-ġenerazzjoni ta' kurva standard preċiża. Għalhekk, riżultati derivati mill-istandards għandhom jiġu eżaminati qabel ma' riżultati ta' kampjun ta' test jistgħu jiġu interpretati.

Sabiex l-ELISA tkun valida

- Il-valur OD medju għal Standard 1 irid ikun ≥ 0.600 .
- Il-%CV tal-valuri ta' OD tar-repliki ta' Standard 1 u Standard 2 irid ikun $< 15\%$
- Valuri ta' OD replikati għal Standards 3 u 4 m'għandhomx ivarjaw b'aktar minn 0.040 ta' unitajiet ta' densità ottika mill-medja tagħhom.
- Il-koeffiċjent ta' korelazzjoni (r) ikkalkulat mill-valuri ta' assorbanza medja tal-istandards għandhom ikunu ≥ 0.98

Jekk il-kriterji t'hawn fuq ma jkunux sodisfatti, it-test ikun invalidu u jkollu jiġi ripetut.

Il-valur medju ta' OD għal Zero Standard (Green Diluent) għandu jkun ta' ≤ 0.150 Jekk il-valur medju ta' OD hu > 0.150 il-proċedura tal-ħasil tal-platt għandha tiġi mistħarrġa.

Interpretazzjoni tar-Riżultati

Ir-riżultati ta' QuantiFERON-CMV huma interpretati bl-użu tal-kriterji li ġejjin:

CMV nieqed Nil (IU/ml)*	Mitogen nieqes Nil (IU/ml)	Riżultat QF-CMV	Rapport/interpretazzjoni
< 0.2	≥ 0.5	Mhux reattiv	Immunità anti-CMV mhix osservata
≥ 0.2	Kwalunkwe	Reattiv	Immunità anti-CMV osservata
< 0.2	< 0.5	Inkonklussiv [†]	Riżultat inkonklussiv għar-rispons ta' CMV

* Ir-risponsi ta' IFN- γ għall-Antiġen ta' CMV u l-kontroll pożittiv ta' Mitogen jistgħu komunement ikunu 'l barra mill-medda tal-microplate reader. Dan m'għandu l-ebda impatt fuq ir-riżultati kwalitattivi

[†] Irreferi għat-Taqsima dwar Meta Jinqalgħu Problemi għal kawżi possibbli

Limitazzjonijiet

Ir-riżultati tat-testijiet ta' QuantiFERON-CMV għandhom jintużaw flimkien ma' kull storja epidemjoloġika tal-individwu, stat mediku attwali, u evalwazzjonijiet dijanjostiċi oħra.

Riżultati mhux affidabbli jew inkonklussivi jistgħu jsejnhu minħabba:

- Devjazzjoni mill-proċedura deskritta fil-Fuljett tal-Pakkett.
- Livelli eċċessivi ta' IFN- γ fit-tubu Nil
- Aktar minn 16-il siegħa minn meta ngibed il-kampjun tad-demem sakemm intqiegħed fl-inkubazzjoni f'temperatura ta' ta' 37°C.

Valuri Mistennija

Valuri mistennija ta' IFN- γ li jużaw QuantiFERON-CMV kienu miksuba mill-ittestjar ta' 591 kampjun minn adulti b'saħħithom, 341 minnhom kienu serpożittivi u 250 kienu seronegattivi għal CMV. Fil-250 individwu adult b'saħħtu mingħajr infezzjoni ta' CMV, kif stabbilit mis-seroloġija anti-CMV (CMV seronegattiv), 100% tal-individwi pproduċew risponsi għal IFN- γ ta' < 0.2 IU/ml tat-tubu ta' CMV Antigen (nieqes Nil). Id-distribuzzjoni tat-tubu ta' CMV Antigen (nieqes Nil) għall-341 individwu b'saħħtu b'infezzjoni ta' CMV, kif stabbilit b'seroloġija anti-CMV (CMV seropożittiv), hija murija f'Figura 2.

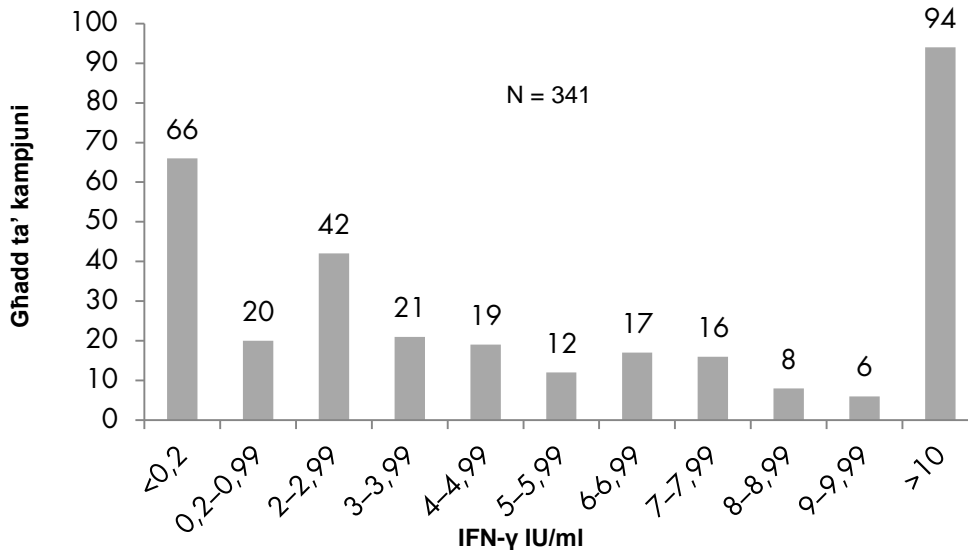


Figura 2. Id-distribuzzjoni ta' risponsi għal CMV-Nil IFN- γ f'individwi serpożittivi b'saħħithom (n=341).

Id-distribuzzjoni ta' Mitogen (nieqes I-isfond Nil) irriżulta fi 731 kampjun tad-demmi normali minn individwi adulti b'saħħithom, irrISPETTIVAMENT minn infezzjoni CMV magħrufa kif murija f'Figura 3. Ir-riżultat ta' Mitogen (nieqes in-Nil) ta' inqas minn 0.5 IU/ml jindika jew li t-test ma ħadimx jew li dik il-persuna tinsab fi stat immunokomprometat. F'popolazzjoni b'saħħitha kienu bis 2/731 li waqgħu f'din il-kategorija.

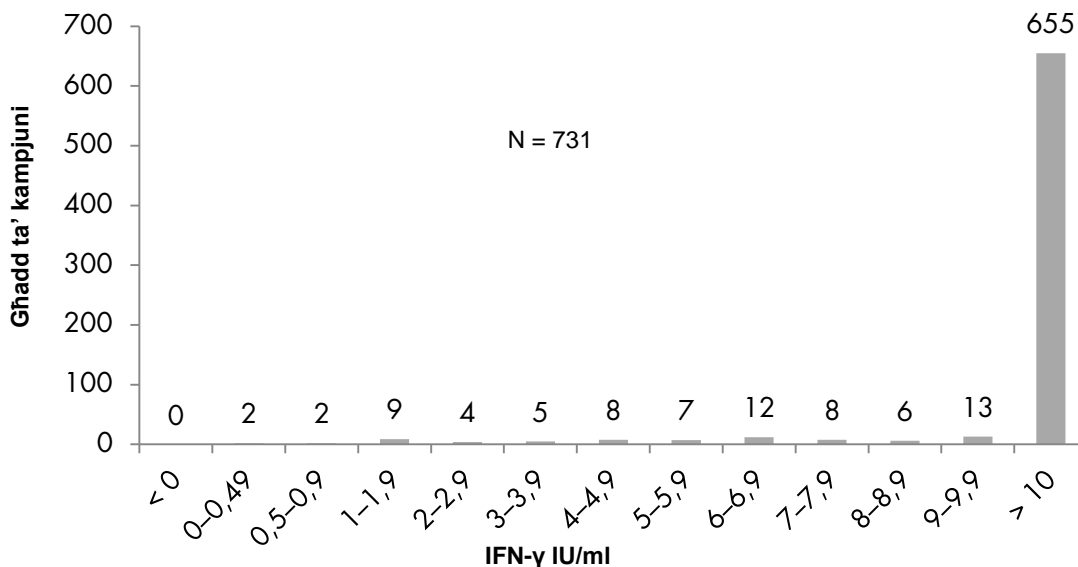


Figura 3. Id-distribuzzjoni ta' risponsi għal Mitogen-Nil IFN- γ f'individwi adulti u b'saħħithom (n=731).

Valuri mistennija għal tubi Nil huma murija f'Figura 4. Tagħrif hu derivat minn 1020 kampjun ta' plazma minn fuq individwi b'saħħithom ittestjati bl-użu ta' QuantiFERON-CMV ELISA.

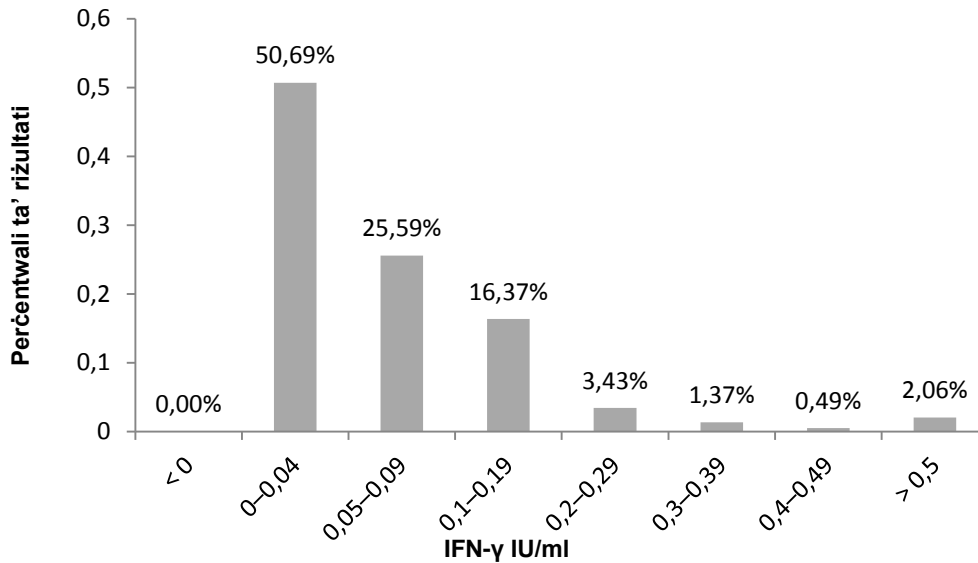


Figura 4. Distribuzzjoni (mfissra bħala % ta' popolazzjoni) ta' risponsi ta' NIL IFN-γ f'individwi adulti b'saħħithom (n=1020)

Karatteristiċi ta' Prestazzjoni

Ittestjar ta' Previżjoni

Referenza għat-test għall-osservazzjoni ta' esponiment għal CMV permezz ta' QF-CMV kien stabbilit wara l-analiżi ta' rizzultati minn grupp ta' individwi b'saħħithom (n = 233) fejn ir-rizzultati ta' QF-CMV kienu mqabbla ma' rizzultati seroloġiċi ta' CMV. Analizi ROC stabbilixxiet li referenza għat-test ta' 0.04 IU/ml (wara tnaqqis ta' nil) ipprova l-aħjar valuri pożittivi u negattivi ta' previżjoni għal QF-CMV (erja taħt il-kurva = 0.9679 [96%CI = 0.9442 sa 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.

F'ittestjar ta' previżjoni, il-prestazzjoni ta' QF-CMV kienet imqabbla mat-test ta' seroloġija ta' SeraQuest CMV IgG (Quest International). L-assaġġ QF-CMV wera 95% (294/310 individwu) qbil mat-test seroloġiku ta' anti-HCMV ta' previżjoni f'individwi b'saħħithom, b'ebda wieħed mill-149 donatur seronagattiv ma juri xi reattività bi QF-CMV, u 145 minn 161 donatur seropożittiv juri rispons reattiv għal IFN-γ. Globalment, qbil pożittiv kien ta' 90% b' valur ta' qbil negattiv ta' 100%. Il-livell ta' qbil bejn ir-risponsi għal peptidi ta' IFN-γ, kif imkejjejl bi QF-CMV, f'voluntieri b'saħħithom, u l-istat seroloġiku ta' anti-CMV ta' dawn l-individwi permezz tat-test seroloġiku SeraQuest IgG huwa muri f'Tabella 2.

Tabella 2. 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%)

Referenza tal-assaġġ

Ir-referenza rakkomandata għat-test kliniku għal dan l-assaġġ hu ta' 0.2 IU/ml fit-tubu ta' CMV Antigen (nieqes Nil) għalkemm referenzi differenti jistgħu jiġu validati għal kontrolli kliniċi differenti. Ir-raġunar qiegħed fid-differenzi immunoloġiċi fundamentali bejn popolazzjoni ta' test normali u popolazzjonijiet li fihom it-test hu kkonsidrat bħala utli klinikament - speċifikament persuni immunosoppressi li minħabba l-immunosoppressjoni jinsabu f'riskju li jiżviluppaw infezzjoni sintomatika ta' CMV u/jew mard. F'individwi ta' riskju għoli bħal dawn, l-utilità klinika qegħda fl-intraċċjar bi preċiżjoni permezz ta' QF-CMV tal-livell tal-immunità ta' anti-CMV f'dawn l-individwi, peress li n-nuqqas ta' immunità jista' jkun assoċjat ma' żvilupp ta' mard ta' CMV (1-5, 7, 8, 11-16).

Studji Kliniċi

Peress li m'hemmx standard definittiv biex tiġi kkonfermata jew ikkonfuta d-dijanjsi ta' infezzjoni b'citomegalovirus, stima ta' sensitività u speċifità ta' QF-CMV ma tistax tiġi evalwata b'mod prattiku. L-ispeċifità u s-sensitività ta' QF-CMV kienu approssimati billi ġie evalwat il-livell ta' qbil bejn ir-risponsi ta' IFN- γ għal peptidi ta' CMV, kif imkejjel bi QF-CMV, f'voluntieri b'saħħithom, u l-istat seroloġiku ta' anti-CMV ta' dawn l-individwi permezz ta' test seroloġiku ta' CMV IgG.

L-ispeċifità ta' QF-CMV kienet approssimata billi ġew evalwati r-rati pożittivi-foloz (rispons reattiv ta' QF-CMV) f'voluntiera b'saħħithom mingħajr ebda evidenza ta' esponiment minn qabel għal CMV (individwi seronegattivi għal CMV). Is-sensitività kienet approssimata billi ġew evalwati voluntieri b'saħħithom b'evidenza ta' esponiment minn qabel għal CMV (individwi seropożittivi għal CMV). Għalkemm QF-CMV jutilizza għadd kbir ta' epitopi speċifiċi għal CMV minn proteini differenti ta' CMV, u b'hekk jipprovdi applikazzjoni klinika mifruxa għal firxa wiesgħa tal-popolazzjoni b'ħaplotipi diversi ta' Klassi I ta' HLA, il-kopertura ta' dawn il-peptidi mhix 100%. Peress li l-ħaplotipi ta' HLA ta' individwi ttestjati kontra s-seroloġija ta' CMV ma kienux magħrufa, perċentwal żgħir ta' individwi seroloġikament pożittivi kienu mistennija li ma jirrispondux għat-tubi ta' QF-CMV.

Speċifità

Fi studju li sar f'individwi b'saħħithom mingħajr evidenza ta' esponiment minn qabel għal CMV (individwi seronegattivi għal CMV fejn n = 250), il-livell ta' qbil bejn ir-risponsi ta' IFN- γ għal peptidi ta' CMV, kif imkejjel bi QF-CMV u tagħrif seroloġiku dwar anti-CMV instab li hu 100%.

Fl-evalwazzjonijiet ta' speċifità l-oħra kollha li saru fuq reċipjenti ta' trapjanti ta' organi solidi (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), ir-reċipjenti ta' trapjanti ematopojetici għal ċelluli steminali (7, 13) u pazjenti infettati b'HIV (2), il-livell ta' qbil bejn ir-risponsi ta' IFN- γ għal peptidi ta' CMV, kif imkejjel b'QF-CMV u seroloġija anti-CMV, b'mod konsistenti ntweraw li hu 100%.

Sensittività

Fi studju li sar f'individwi b'saħħithom b'evidenza ta' esponiment minn qabel għal CMV (individwi seropożittivi għal CMV fejn $n = 341$), il-livell ta' qbil bejn ir-risponsi ta' IFN- γ għal peptidi ta' CMV, kif imkejjejl bi QF-CMV u tagħrif seroloġiku dwar anti-CMV instab li hu ta' 80.6% (275/341). In-nuqqas ta' qbil jista' jkun dovut għall-użu ta' referenza ogħla għat-test (0.2 IU/ml), seroloġija pożittiva-falza għal CMV, jew in-nuqqas ta' rispons ta' individwi għall-peptidi ta' CMV, inklużi fl-assaġġ.

Fl-evalwazzjonijiet ta' sensittività li saru fuq reċipjenti ta' trapjanti ta' organi solidi (1, 3., 4, 8, 12, 14-16), ir-reċipjenti ta' trapjanti ematopojetici għal ċelluli steminali (7, 13) u pazjenti infettati b'HIV (2), xi livelli ftit aktar baxxi nstabu bejn ir-risponsi ta' IFN- γ għal peptidi ta' CMV, kif imkejjejl bi QF-CMV u risponsi seropożittivi għal CMV, f'dawn il-pazjenti. Il-livell aktar baxx ta' qbil jista' jkun riżultat ta' seroloġija pożittiva-falza għal CMV, in-nuqqas ta' rispons mill-pazjenti għal peptidi ta' CMV inklużi fl-assaġġ, jew in-nuqqas ta' ċelluli T reattivi f'dawn il-pazjenti minħabba l-immunosopressjoni tagħhom.

Studji li jenfazzjaw l-utilità klinika

Kemm is-seroloġija u kemm QF-CMV jiddeskrivu l-użu maħsub li jippermetti l-osservanza ta' immunità għal CMV. F'każ ta' trapjanti, is-seroloġija ta' CMV tiġi użata b'mod wiesgħa sabiex jiġi stabbilit ir-riskju ta' kumplikazzjonijiet ta' CMV li jseħħu fir-reċipjent 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 immunosopressjoni (6, 9-11).

Għadd ta' studji klinici ppubblikati f'diversi koorti tat-trapjant urew l-utilità ta' QuantiFERON-CMV (1-5, 7, 8, 11-16).

Fi studju kbir ta' 108 reċipjenti ta' trapjanti ta' organi solidi (4), pazjenti b'riżultat ta' QF-CMV Reactive fi tmiem il-profilassi ta' anti-CMV kellhom rata aktar baxxa b'mod sinifikanti ta' bidu tard tal-marda meta mqabbla ma' dawk ta' riżultat ta' QF-CMV Non-reactive (5.3% kontra 22.9% rispettivament, $p=0.044$) (Figura 5).

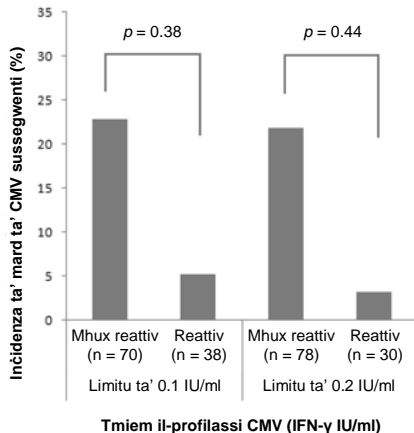


Figura 5. Rati ta' bidu tard tal-marda ta' CMV f'pazjenti b'riżultat ta' QuantiFERON-CMV Reactive kontra riżultat ta' QuantiFERON Non-reactive fi tmiem il-profilassi. Tagħrif riprodott minn Kumar et al. (4)

Barra minn hekk, pazjenti b'test reattiv ta' QF-CMV mat-tlestija tal-profilassi baqgħu ħielsa ill-mard ta' CMV aktar ta' spiss, u għal tul ta' żmien itwal (Figura 6), li jindika li QF-CMV jista' jiġi użat biex jidentifika dawk li jinsabu f'riskju li l-marda tagħhom ta' CMV tiffaċċa tard.

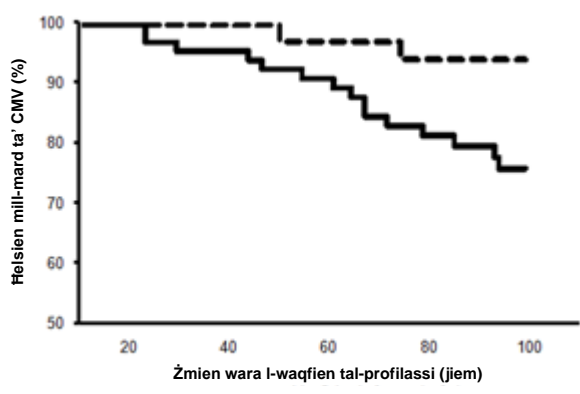


Figura 6. Il-ħin sabiex tiżviluppa l-marda ta' CMV f'pazjenti b'riżultat ta' QuantiFERON-CMV Reactive (enfazzat b'linja mkissra) kontra riżultat ta' QuantiFERON-CMV Non-reactive (enfazzat b'linja solida) fi tmien il-profilassi. Tagħrif riprodott minn Kumar et al. (4)

Dan l-istudju enfazzizza wkoll li fil-koorti ta' pazjenti li fuqhom sar trapjant fl-ogħla riskju li jiżviluppaw il-mard ta' CMV (reċipjenti ta' trapjant seronegattivi għal CMV li jirċievu organu minn donatur serpożittiv għal CMV, i.e., D+/R-) riżultat ta' QF-CMV Reactive fi kwalunkwe ħin wara l-profilassi kien assoċjat ma' 90% probabbiltà li jibqa' ħieles minn mard ta' CMV.

Fi studju fuq 37 pazjent li fuqhom sar trapjant ta' organu solidu (12) 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 Reactive, spontanament neħħew il-virus ta' CMV filwaqt li 5/11 biss (45.5%) ta' pazjenti b'riżultat ta' QF-CMV Non-reactive kellhom l-istess eżitu.

Studju ta' 67 reċipjent ta' trapjant tal-pulmun li fih kienu assessjati episodji ta' viremja ta' CMV wara t-trapjant (14), wera li 18/25 (72%) ta' episodji ta' viremja kienu preċeduti b'riżultat ta' QF-CMV Non-reactive, kontra 4/16 (25%) ta' episodji li kienu preċeduti minn rispons ta' QF-CMV Reactive (test eżatt ta' Fischer, $p = 0.0046$, ara Figura 7).

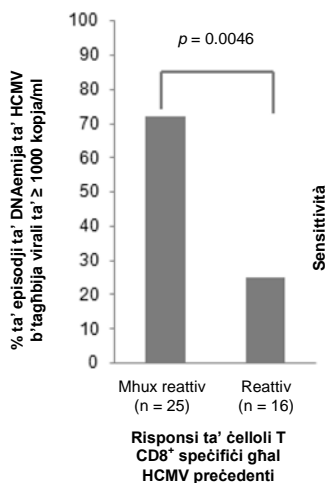


Figura 7. Analizi statistika ta' risponsi speċifiċi minn ċelluli T CD8⁺ speċifiċi għal CMV kif intraċċati minn QuantiFERON-CMV u l-iżvilupp ta' viremja ta' CMV (test eżatt ta' Fischer, $p = 0.0046$). Tagħrif riprodott minn Weseslindtner et al (14).

Fi studju multiċentriku prospettiv kbir b'127 reċipjent ta' trapjant ta' organu solidu D+/R- (15), li lkoll kemm huma rċevew profilassi antivirali, pazjenti b'riżultat ta' QF-CMV Reactive (permezz ta' referenza ta' test ta' 0.1 IU/ml) fi kwalunkwe punt ta' ħin wara t-tlestija ta' profilassi ta' anti-CMV kellhom rata sinifikanti aktar baxxa ta' bidu tard tal-mard sa 12-il xahar wara t-trapjant, meta mqabbel ma' dawk li ħadu riżultat ta' QF-CMV Non-reactive u riżultat inkonklussiv (6.4% kontra 22.2% kontra 68.3% rispettivament, $p < 0.001$). Meta riżultati inkonklussivi jiġu kklasifikati wkoll bħala "Non-reactive (Mhux reattivi)", l-inkidenza ta' mard sussegwenti ta' CMV kien ta'

6.4% kontra 26.8%, $p = 0.024$ (ara Figura 8). Il-valuri pożittivi u negattivi prevedibbli ta' QF-CMV għal protezzjoni minn mard ta' CMV kienu ta' 0.90 (95% CI 0.74-0.98) u 0.27 (95% CI 0.18-0.37) rispettivament, li jindika li rżultat ta' QuantiFERON-CMV Reactive fi kwalunkwe ħin ta' wara t-trapjant kien assoċjat ma' ċans ta' 90% li jibqa' ħieles minn mard ta' CMV. 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.

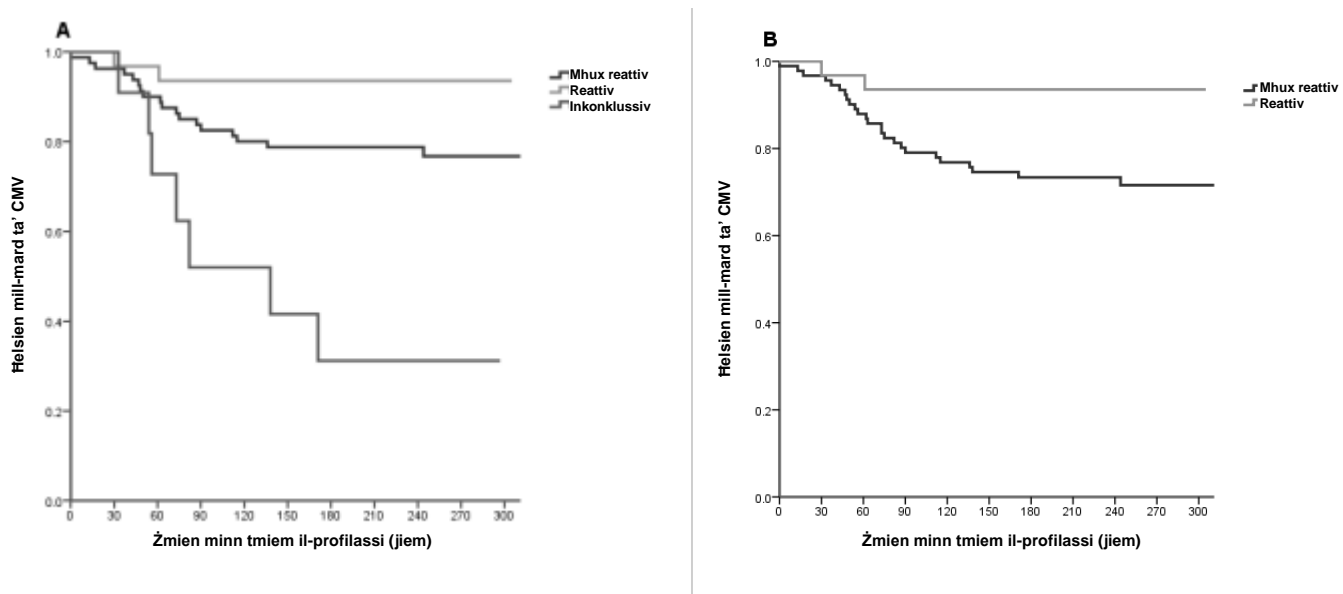


Figura 8. Il-kurvi Kaplan-Meier tal-inċidenza ta' mard ta' CMV skont ir-rizultat tal-assaġġ ta' QF-CMV

A. Rżultati ta' QF-CMV Reactive (Reattiv) kontra Non-reactive (Mhux reattiv) kontra Inkonklussiv (test ta' log rank, $p < 0.001$).

B Reactive (Reattiv) kontra Nonreactive (Mhux reattiv), meta rżultati inkonklussivi kienu kkonsidrati bħala Mhux reattivi (test ta' log rank, $p = 0.024$).

Fi studju prospettiv b'55 reċipjent ta' trapjant ta' organu solidu (16 fejn ir-relazzjoni bejn rżultati ta' QF-CMV ta' qabel it-trapjant u episodju ta' replikazzjoni ta' CMV ta' wara t-trapjant ġew analizzati, instab li kien hemm inċidenza ogħla ta' replikazzjoni ta' CMV ta' wara t-trapjant f'reċipjenti R(+) b'rżultat ta' qabel it-trattament ta' QF-CMV Nonreactive (7/14 jew 50%), meta mqabbel ma' daww ta' reċipjenti R(+) b'rżultat ta' QF-CMV Reactive (4/30 jew 13.3%).

Dan l-istudju wera li reċipjenti QF-CMV Non-reactive ta' qabel it-trapjant li rċevew organu minn donatur sero-pożittiv għal CMV kellhom żieda ta' 10 darbjet ta' replikazzjoni ta' CMV meta mqabbla ma' daww ir-reċipjenti QF-CMV Reactive ta' qabel it-trapjant (aġġustati OR 10.49. 95% CI 1.88-58.6) u li assaġġ ta' QF-CMV ta' qabel it-trapjant jista' jkun utli biex jipprevedi r-riskju għal replikazzjoni ta' CMV wara t-trapjant u b'hekk jippermetti ġestjoni individwali tal-infezzjoni ta' CMV wara trapjant ta' organu solidu.

Għadd ta' studji oħra li stħarrġu ir-rispons ta' ċelluli T CD8⁺ speċifiċi għal CMV bi QF-CMV f'koorti ta' reċipjenti ta' trapjant tlestew (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) 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-linji gwida ta' kunsens internazzjonali dwar il-ġestjoni ta' ċitomegalovirus fi trapjanti ta' organi solidi" (6). Dawn il-linji gwida internazzjonali, żviluppata minn bord ta' esperti fuq CMV u trapjanti ta' organi solidi, ġew milqugħa mill-Infectious Disease Section ta' The Transplantation Society, jirrapreżentaw kunsens dwar linji gwida bażata fuq evidenza u fehma esperta fil-ġestjoni ta' CMV li jinkludi: dijanjostiċi, 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 f'riskju ta' mard ta' CMV wara t-trapjant u jistgħu jkunu utli fil-gwida ta' profilassi u terapiji preventivi" (6).

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 jiġihaddem, effettiv biżżejjed għal prezzu, u riproducibbli
- Jista' jsir f'ħin qasir
- Faċilità biex kampjuni jkunu jistgħu jintbagħtu lil 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-metodu li jkejjel il-konċentrazzjoni ta' IFN- γ bil-QF-CMV ELISA ġie muri li huwa lineari minn 0 sa 10 IU/ml (Figura 9). L-istudju ta' linearità sar billi tqegħdu 5 replikati ta' 11-il kollezzjoni ta' plażma ta' konċentrazzjonijiet magħrufa ta' IFN- γ b'mod każwali fuq il-platt tal-ELISA.

Il-QF-CMV ELISA ma juri l-ebda evidenza ta' effett ganċ minħabba doża għolja (prozona) b'konċentrazzjonijiet ta' IFN- γ sa 100,000 IU/ml

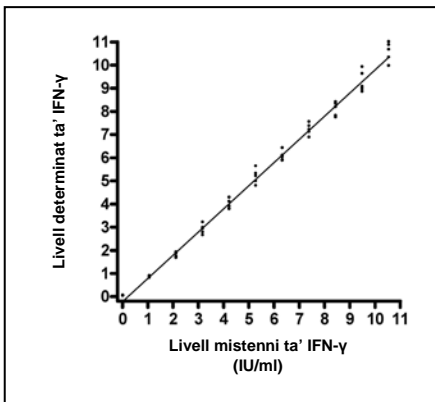


Figura 9. Profil ta' linearità ta' QF-CMV ELISA li sar billi ġew testjati 5 replikati ta' 11-il kollezzjoni ta' plażma ta' konċentrazzjonijiet magħrufa ta' IFN- γ . Il-linja ta' rigressjoni lineari għandha inklinazzjoni ta' 1.002 ± 0.011 u koeffiċjent ta' korelazzjoni ta' 0.99.

Impreċizzjoni fi u bejn l-assaġġi (%CV) ta' QF-CMV ELISA kienet stmata billi ġew ittestjati 20 kampjun ta' plażma b'konċentrazzjonijiet varji ta' IFN- γ f'replikati ta' 3 fi 3 laboratorji, fi 3 ijiem mhux konsekuttivi, minn 3 operaturi. Għalhekk kull kampjun kien ittestjat 27 darba, f'9 ċikli ta' analiżi indipendenti. Kampjun wieħed kien kontrol Nil u kull konċentrazzjoni kkalkulata ta' IFN- γ ta' 0.08 (95% CI 0.07 - 0.09) IU/ml. Mid-19 il-kampjun ta' plażma li fadal, il-firxa ta' konċentrazzjonijiet kienet minn 0.33 (0.31 - 0.34) sa 7.7 IU/ml (7.48 - 7.92).

Impreċizzjoni fi ħdan ċiklu jew fi ħdan assaġġ kienet stmata billi ttieħdet il-medja tal-%CV għal kull plażma 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-impreċizzjoni totali jew bejn assaġġ u ieħor kienet stabbilita billi ġew mqabbla s-27 konċentrazzjoni kkalkulata ta' IFN- γ għal kull kampjun ta' plażma 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 minħabba li l-koncentrazzjoni kkalkulata ta' IFN- γ hija baxxa u l-varjazzjoni madwar stima baxxa ta' koncentrazzjoni tkun akbar minn dik għal koncentrazzjonijiet ogħla.

Il-profil ta' preċiżjoni għal QF-CMV ELISA huwa muri f'Figura 10 u jindika li l-impreċiżjoni ma jiżdiedx b'koncentrazzjonijiet ogħla ta' IFN- γ .

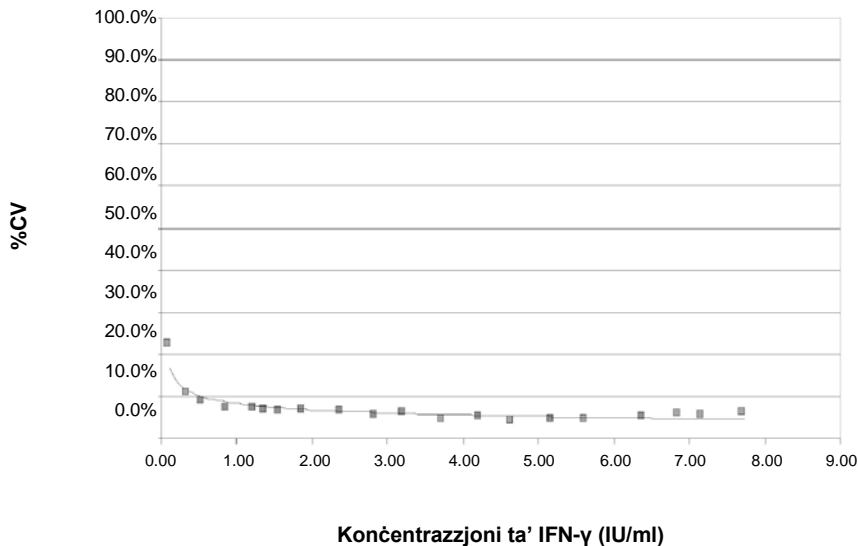


Figura 10. Profil ta' preċiżjoni ta' QF-CMV ELISA determinat minn ittestjar għal tliet darbiet ta' 20 kampjun tal-plażma, fi 3 ijiem mhux konsekuttivi, fi 3 laboratorji u minn 3 operaturi.

Il-linja skematika hija kalkolazzjoni ta' l-inqas kwadri mqegħda.

Kien sar studju sabiex jistabilixxi r-reproduċibilità tat-test ta' QF-CMV permezz ta' kampjuni tad-demem minn 8 individwi bi stat mhux magħruf ta' CMV. Id-demem għal kull suġġett kien miġbur fi tliet setts ta' tubi QF-CMV (3 x Nil, 3 x CMV, u 3 x Mitogen). It-tliet settijiet ta' tubi kienu mbagħad inkubati fit-tliet siti differenti (sett wieħed ta' Nil, CMV u Mitogen f'kull sit), kif muri fil-Fuljett tal-Pakkett. Wara 16-24 siegħa inkubazzjoni, it-tubi kienu ċentrifugati u l-plażma maħsud.

Sussegwentement saret ELISA tliet darbiet f'kull wieħed mit-tliet siti, li għalihom ġew iġġenerati tliet riżultati ta' QF-CMV għal kull suġġett f'kull sit (total ta' 9 riżultati mis-siti kollha). Kull sit impjega operatur differenti. Il-platti użati għall-istudju mhux neċessarjament kienu mill-istess numru ta' lott, imma lkoll kienu sew fi ħdan id-data ta' skadenza rispettiva tagħhom.

Ir-reproduċibilità, f'termini kemm ta' stat dijanjostiku (Reattiv, Mhux Reattiv, jew Inkonklussiv) u valur numeriku, kien stabbilit għal kull kampjun ta' demm. Ir-reproduċibilità tal-valur numeriku ġie assessjat biss fil-kampjuni reattivi (mfissra bħala %CV) peress li l-livelli ta' IFN- γ f'kampjuni "Non-Reactive" kien żgħir wisq biex jipprovdi stima elokwenti ta' preċiżjoni.

Globalment, ir-reproduċibilità dijanjostika kienet ta' 100% fejn l-istat dijanjostiku ta' QF-CMV tat-8 voluntiera kollha kien riprodott fis-siti kollha fl-okkażjonijiet kollha, b'ebda kampjun rapportat li kien inkonklussiv. Ir-reproduċibilità ta' kampjuni Reactive kien aċċettabbli kemm fi ħdan is-sit u anke bejn is-siti. Il-%CV medju għal kull wieħed mis-siti tat-test kien ta' 4.5% (Sit 1), 5.9% (Sit 2), u 7.3% (Sit 3). Globalment, il-%CV ta' bejn is-siti kien ta' 5.9% għal kull wieħed mill-5 kampjuni reattivi. Valuri perċentwali tal-koeffiċjent ta' varjanza taħt l-10% kienu kkonsidrati eċċellenti.

Informazzjoni Teknika

Riżultati Inkonklussivi

Riżultati inkonklussivi 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 sakemm tqiegħed fl-inkubazzjoni f'temperatura ta' 37°C.
- Il-ħażna tad-demem barra mill-firxa tat-temperatura rakkomandata (17°C sa 27°C).
- Taħlit insuffiċjenti tat-tubi ta' ġbir tad-demem.

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

Gwida għal meta Jinqalgħu Problemi

Din il-gwida ta' meta jinqalgħu problemi tista' tkun utli biex issolvi problemi li jistgħu jinħolqu. Għal aktar tagħrif, ara wkoll l-Infommazzjoni Teknika pprovduta fuq: www.QuantiFERON.com. Għal infommazzjoni dwar kuntatti, ara paġna 26 u l-qoxra ta' wara.

Problemi li Jistgħu Jinqalgħu b'ELISA

Standards b'valuri baxxi għad-densità ottika.

Kawża possibbli	Soluzzjoni
a) Errur fid-dilwazzjoni tal-istandard	Iżgura li d-dilwazzjonijiet tal-Kitt Standard jiġu preparati korrettament skont il-Fuljett tal-Pakkett.
b) Errur fl-ippipettar	Iżgura li l-pipetti huma kkalibrati u użati skont l-istruzzjonijiet tal-manifattur.
c) Temperatura ta' inkubazzjoni baxxa wisq	L-inkubazzjoni ta' ELISA għandu jsir f'temperatura ambjentali tal-kamra (17°C sa 27°C).
d) Ħin ta' inkubazzjoni żgħir wisq	L-inkubazzjoni tal-platt bil-konjugat, l-iistandards u l-kampjuni għandu jkun għal 120 ± 5 minuti. L-Enzyme Substrate Solution hu inkubat fuq il-platt għal 30 minuta.
e) Filter żbaljat għar-reader tal-platt użat	Il-platt għandu jinqara b'filter ta' 450 nm b'filter ta' riferiment ta' bejn 620 u 650 nm.
f) Reaġenti kesħin wisq	Ir-reaġenti kollha bl-eċċezzjoni tal-Conjugate 100X Concentrate, għandhom jingiebu għat-temperatura ambjentali tal-kamra qabel jibda l-assaġġ. Dan jieħu madwar siegħa.
g) Il-kitt/komponenti jkunu skadew	Iżgura li l-kitt jintuża qabel id-data ta' skadenza. Iżgura li l-iStandard u l-Conjugate 100X Concentrate rikostitwiti jiġu użati fi żmien 3 xhur mid-data ta' rikostituzzjoni.

Żvilupp ta' kulur mhux speċifiku / sfond għoli

Kawża possibbli	Soluzzjoni
a) Tlaħliħ mhux komplut tal-platt	Laħlaħ il-platt tal-anqas 6 darbiet b'400 µl/toqba ta' bafer ta' tlaħliħ. Aktar minn 6 ċikli ta' tlaħliħ jistgħu jkunu meħtieġa skont il-washer li qed jintuża. Għandu jintuża ħin ta' tgħaddis għal tal-anqas 5 sekondi bejn ċiklu u ieħor.
b) Temperatura t'inkubazzjoni għolja wisq	L-inkubazzjoni tal-ELISA għandu jsir f'temperatura ambjentali tal-kamra (17°C sa 27°C).
ċ) Kitt/komponenti jkunu skadew	Iżgura li l-kitt jintuża qabel id-data ta' skadenza. Iżgura li l-iStandard u l-Conjugate 100X Concentrate rikostitwiti jiġu użati fi żmien tliet xhur mid-data ta' rikostituzzjoni.
d) Enzyme Substrate Solution huwa kontaminat	Armi s-sottostrat jekk ikun hemm kolorazzjoni blu. Iżgura li r-riżervwars tar-reaġent ikunu nodfa.
e) Taħlit ta' plazma fit-tubi taċ-ċentrifugar qabel il-ħsad	Iżgura li l-kampjuni ta' plazma jiġi maħsuba mill-gell ta' fuq mingħajr pipettar mill-ġdid 'il fuq u 'l isfel, billi tingħata attenzjoni biex ma jiġix disturnat il-materjal li jinsab fil-wiċċ tal-gell.

Biblijografija

1. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* **9**, 165.
2. Singh, K.P., Howard, J.L., Wild, S.P., Jones, S.L., Hoy, J., Lewin, S.R. (2007) Human cytomegalovirus (HCMV)-specific CD8+ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of HCMV disease despite CD4+ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* **124**, 200.
3. Westall, G.P., Mifsud, N., Kotsimbos, T. (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. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22(1)**, 76.
6. Kotton, C.N., et al. (2010) International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplantation* **89**, 779.
7. 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.
8. Lachmanova, A.I., et al. (2010) Quantiferon-CMV Test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* **42(9)**, 3574.
9. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* advance online publication 26 October 2010; doi:10.1038/nrneph.2010.
10. 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(10)**, 735-11.
11. Giulieri, S, Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **11(1)**, 17.
12. Lisboa, L.F., Kumar, D., Wilson, L.E., Humar, A. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplantation* **93(2)**, 195.
13. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detecting and estimating the magnitude and functionality of the CMV-specific IFN- γ CD8+ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* Online ahead of print 29 February 2012; doi: 10.1128/CVI.05633-111.
14. 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(8)**, 2172.
15. Manuel, O., et al. (2012) 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.* (Manuscript accepted November 2012).
16. Cantisán, S., et al. (2012) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8+ T-cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* (Manuscript accepted November 2012).

Servizz Tekniku

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific ■ techservice-ap@qiagen.com

Europe ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

Middle East/Africa ■ techserviceQFT-eu@qiagen.com

USA/Canada ■ techservice-na@qiagen.com

Latin America (not including Brazil or Mexico) ■ techservice-latam@qiagen.com

Mexico ■ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ■ techsebr@qiagen.com

Din il-paġna intenzjonalment miżmuma vojta.

Din il-paġna intenzjonalment miżmuma vojta.

Din il-paġna intenzjonalment miżmuma vojta.

Proċedura tat-Test fil-Qosor

Stadju 1 — inkubazzjoni tad-demm

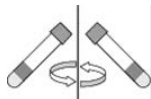
1. Iġbor id-demm tal-pazjenti f'tubi tal-ġbir tad-demm u ħallat billi tħawwadhom għaxar (10) darbiet biżżejjed biex tiżgura li l-wiċċ sħiħ ta' ġewwa tat-tubu ikun ġie miksi bid-demm sabiex jiġu maħlula l-antigeni minn fuq is-superfiċje tat-tubu.



2. Inkuba t-tubi weqfin f'temperatura ta' 37°C ±1°C għal 16-il siegħa sa 24 siegħa.



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



4. Wara ċ-centrifugazzjoni, 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, bl-eċċezzjoni tal-Conjugate 100X Concentrate, f'temperatura ambjentali tal-kamra għal tal-anqas 60 minuta.



2. Irrikostitwixxi l-Kitt Standard għal 8.0 IU/ml b'ilma distillat jew dejjonizzat. Ipprepara erba' (4) dilwazzjonijiet standard.

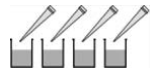


3. Irrikostitwixxi il-Konjugat iffrizzat imnixxef ta' 100X Concentrate b'ilma distillat jew dejjonizzat.

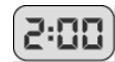
4. Ipprepara l-konjugat b'qawwa li s-soltu taħdem biha fil-Green Diluent u žid 50 µl lit-toqob kollha.



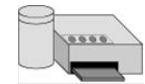
5. Žid 50 µl ta' kampjuni ta' plażma tat-test u standards ta' 50 µl lit-toqob xierqa. Ħallat bix-shaker.



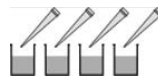
6. Inkuba għal 120 minuta f'temperatura tal-kamra.



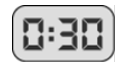
7. Laħlaħ it-toqob tal-anqas 6 darbiet b'400 µl/toqba ta' Wash Buffer (bafer ta' tlaħliħ).



8. Žid 100µl Enzyme Substrate Solution ġot-toqob. Ħallat bix-shaker.



9. Inkuba għal 30 minuta f'temperatura tal-kamra.



10. Žid 50µl Enzyme Substrate Solution ġot-toqob.kollha. Ħallat bix-shaker.



11. Aqra r-riżultati b'filter ta' 450 nm b'filter ta' riferiment ta' 620 sa 65 nm.



12. Analizza r-riżultati



Marki reġistrati QIAGEN[®], QuantiFERON[®] (QIAGEN Group); Microsoft[®], Excel[®] (Microsoft).

Qbil dwar Liċenzja Limitata għal Kit ta' QuantiFERON-CMV ELISA

L-użu ta' dan il-prodott jfisser il-qbil ta' kull xerrej jew utent tal-prodott għall-patti li ġejjin:

- 1 Il-prodott jista' jintuża biss b'mod konformi mal-protokollu provduti mal-prodott u dan il-manwal u għall-użu b'komponenti li jinsabu fil-kitt biss. QIAGEN ma tipprovdi l-ebda liċenzja taht l-ebda proprjetà intelletwali tagħha għall-użu jew inkorporazzjoni tal-komponenti meħmuża f'dan il-kitt ma' komponenti oħra mhux inkluzi fi hdan dan il-kitt kif deskritt fil-protokollu provduti mal-prodott, dan il-manwal, u protokollu addizzjonali provduti disponibbli fuq www.qiagen.com. Xi wħud minn dawn il-protokollu addizzjonali ġew provduti minn utenti ta' QIAGEN għal utenti ta' QIAGEN. Dawn il-protokollu ġew ittestjati b'mod sħiħ jew ġew ottimizzati minn QIAGEN QIAGEN la tiggarrantihom u lanqas ma tiggarrantixxi li ma jiksrux id-drittijiet ta' terzi.
2. Għajr għal liċenzji dikjarati espressivament, QIAGEN ma tiggarrantixxi li dan il-kitt u/jew l-utent(i) tiegħu ma jiksrux id-drittijiet ta' terzi.
3. Dan il-kitt u l-komponenti tiegħu huma liċenzjati għal użu ta' darba biss u ma jistgħix jiġu użati mill-ġdid, jiġu arrangati mill-ġdid jew mibjugħa mill-ġdid.
- 4 QQIAGEN speċifikament jirrinunzja liċenzji oħra, mfissra jew implikati għajr dawk espressament dikjarati.
- 5 Ix-xerrej u l-utent tal-kitt jaqblu li ma jhallu lil hadd jew ma jagħtu permess lil hadd ieħor jieħu passi li jistgħu jwasslu għal jew jiffacilitaw kull att projbit hawn fuq. QIAGEN tista' tinforza l-projbizzjonijiet ta' dan il-Qbil dwar Liċenzja Limitata fi kwalunkwe Qorti, u għandha tirkupra kull spiża investigattiva u tal-Qorti, li tinkludi l-flasjiet għal avukati fi kwalunkwe azzjoni sabiex jiġi inforzat dan il-Qbil dwar il-Liċenzja Limitata jew kwalunkwe wieħed mid-drittijiet ta' proprjetà marbuta mal-kitt u/jew xi komponent minn tiegħu.

Għal patti aggornati tal-liċenzja, ara www.qiagen.com

© 2012 Cellestis, a QIAGEN Company, kull dritt riżervat.

Phone: (Australia) +613- 9840-9800, (Europe) +49-2103-29-12000, (USA) 1-800-362-7737

E-mail: quantiferon@cellestis.com

