

QuantiFERON[®]-CMV

Prospektüs 2 x 96

İnsan Sitomegalovirüs peptid antijenlerine yanıtı ölçmede kullanılan tam kan interferon-gamma testi

IVD

CE

REF

0350-0201



Cellestis, a QIAGEN Company

Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre

1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148, Australia

Telefon: (Avustralya) +613-9840-9800, (Avrupa) +49-2103-29-12000

EC REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1

40724 Hilden, ALMANYA

1075110TR Rev. 01



İçindekiler

Kullanım Amacı	5
Giriş	5
Test Prensipleri	6
Testi Gerçekleştirmek için Gereken Süre	6
Reaktifler ve Saklama	7
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler	8
Saklama ve Kullanma	8
Uyarılar ve Önlemler	9
Numune Toplama ve Kullanımı	10
Kullanım Talimatları	11
1. Aşama — Kanın inkübasyonu ve plazmanın toplanması	11
2. Aşama — İnsan IFN-γ için QuantiFERON-CMV ELISA	11
Hesaplamalar ve Testin Yorumlanması	14
Sonuçların Yorumlanması	15
Sınırlamalar	15
Beklenen Değerler	16
Performans Özellikleri	17
Karşılaştırma Testi	17
Test eşik değeri	18
Klinik Çalışmalar	18
Özgüllük	18
Hassasiyet	19
Klinik faydaları öne çıkaran çalışmalar	19
Katı organ transplantında sitomegalovirüsün yönetimi hakkındaki uluslararası konsensus kılavuzu	22
Test Performans Özellikleri	22
Teknik Bilgiler	24
Şüpheli Sonuçlar	24
Sorun Giderme Kılavuzu	25

Kaynakça	26
Teknik Servis	27
Kısaltılmış Test Prosedürü	30
1. Aşama — kan inkübasyonu	30
2. Aşama — IFN- γ ELISA	30

Kullanım Amacı

QuantiFERON-CMV (QF-CMV) heparinize tam kandaki hücreleri stimüle etmek için insan sitomegalovirüs (CMV) proteinlerini simüle eden bir peptid kokteyli kullanan bir in vitro testtir. Enzime Bağlı İmmünoSorbent Testi (ELISA) vasıtasıyla interferon-gamma (IFN- γ) tespiti, CMV enfeksiyonunun immün kontrolü ile ilgili bu peptid antijenlerine in vitro yanıtların miktarını belirlemek için kullanılır. İmmün fonksiyonu kaybı, CMV hastalığının gelişmesi ile ilgili olabilir. QF-CMV, bir hastanın anti-CMV immünite seviyesini izleme amacıyla kullanılır.

QF-CMV, CMV enfeksiyonunu tespit etmek için kullanılan bir test değildir ve CMV enfeksiyonunu ekarte etmek için kullanılmamalıdır.

Giriş

CMV, yetişkin nüfusun %50 ila 85'inde görülen bir herpes virüsüdür. Özellikle transplantasyon sonrasındaki immüno-supresyonun sıkça görülen bir komplikasyonudur ve transplant alıcılarında morbidite ve mortalite oranlarının artışında önemli pay sahibi olabilir. Nakledilen bir organın reddedilmesini önlemek için kullanılan güncel immüno-supresif tedavilerin T-lenfositler ve hücreye bağımlı immün (CMI) yanıtları üzerinde nakil sonrası viral enfeksiyonlara duyarlılığın artmasıyla sonuçlanan olumsuz etkileri bulunmaktadır. CMV replikasyonunu baskılamada T hücre fonksiyonunun önemi, CD8⁺ CMV'ye özgü sitotoksik T-lenfositlerin (CTL'ler) virüsle ilgili patojeneze karşı koruma sağlamasıyla da vurgulanmaktadır. İmmüno-supresyon uygulanan hastalarda CD8⁺ CMV'ye özgü CTL'lerin sayımı ve IFN- γ oluşumu, CMV hastalığının gelişme riskinin tespitinde belirleyici olabilir. IFN- γ oluşumu, CMV'ye özgü CTL'lerin tespitine yönelik fonksiyonel bir etmen olabilir.

QF-CMV, CMV proteinlerini simüle eden peptid antijenlere karşı CMI yanıtlarına yönelik bir testtir. CMV peptidleri; A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 ve insan nüfusunun %98'inden fazlasını kapsayan Cw6 (A30, B13) HLA I. Sınıf haplotipleri dahil olmak üzere, CD8⁺ T hücrelerini hedef alacak şekilde tasarlanmıştır. CMV ile enfekte bireylerin kanında genellikle bu antijenleri tanıyan CD8⁺ lenfositleri bulunur. Bu tanıma işlemi, sitokin, IFN- γ 'nin oluşumu ve sekresyonunu içerir. IFN- γ 'nin tespiti ve sonrasında miktar tayini, bu testin temelini oluşturur.

Test Prensipleri

QF-CMV testi 2 aşamada gerçekleştirilir. Öncelikle, bir Nil Kontrol tüpü, CMV Antijen tüpü ve bir Mitojen tüpünden oluşan QF-CMV kan alma tüplerinin her birine tam kan alınır.

Mitojen tüpü QF-CMV testinde pozitif kontrol olarak kullanılır. Bireyin immün durumuna ilişkin şüphe bulunan durumlarda bu özellikle garanti edilebilir.

Tüplerin 37°C'de, olabildiğince çabuk şekilde ve alındıktan sonraki 16 saat içinde inkübe edilmesi gerekir. 16 ila 24 saatlik bir inkübasyon süresinin ardından, tüpler santrifüj edilir, plazma çıkarılır ve QF-CMV ELISA aracılığıyla IFN- γ (IU/ml) miktarı ölçülür.

CMV Antijen ve Mitojen tüplerinden alınan plazma numunelerindeki IFN- γ miktarı, bireylerin immünosupresyonu orta düzeyde olduğunda bile, çoğu ELISA okuyucusunun üst sınırının üzerinde olabilir. Miktar **tayini** sonuçları için, seyreltilmemiş plazma için hesaplanan değerleri kullanın. IU/ml değerleri gereken **kantitatif** sonuçlar için, plazma örnekleri Yeşil Seyrelticide 1/10 oranında seyreltilmeli ve seyreltilmemiş plazma ile birlikte ELISA'da test edilmelidir.

Not: QF-CMV ELISA aralığı dahilinde (10 IU/ml'ye kadar) olan örnekler için, seyreltilmemiş plazma örneği ile elde edilen sonuç kullanılmalıdır. Bu tip IFN- γ konsantrasyonları için, 1/10 oranında seyreltilmiş plazma örnekleri kullanılarak elde edilen değerler hatalı olabilir.

CMV Antijen tüpü değeri, Nil IFN- γ IU/ml değerinin çok üzerinde olduğunda, bir IFN- γ yanıtına yönelik test reaktif sayılır. Mitojen ile stimüle edilen plazma örneği, test edilen her bir numune için bir IFN- γ pozitif kontrolü olarak işlev görür. Mitojene düşük yanıt alınması, kan örneği aynı zamanda CMV antijenlerine reaktif olmayan bir yanıt veriyorsa, alınan sonucun belirleyici olmadığını gösterir. Bu durum, yetersiz lenfosit, hatalı numune kullanımına bağlı düşük lenfosit aktivitesi, Mitojen tüpünün yanlış doldurulması/karıştırılması veya yeni transplant uygulanmış hastalarda olduğu gibi, hastanın lenfositlerinin IFN- γ üretmemesi halinde görülebilir. Nil örneği, kan örneklerinde spesifik olmayan IFN- γ veya arkaplana göre ayarlanır. Nil tüpünün IFN- γ seviyesi, CMV Antijen tüpü ve Mitojen tüpünün IFN- γ seviyesi değerinden çıkarılır (QF-CMV sonuçlarının nasıl yorumlanacağına dair genel bilgiler için bu Prospektüsün 15. sayfasındaki "Sonuçların Yorumlanması" bölümüne bakın).

Testi Gerçekleştirmek için Gereken Süre

QF-CMV testini gerçekleştirmek için gereken tahmini süre aşağıda belirtilmiştir; gruplandırılmış birden çok örneğin test süresi de ayrıca gösterilmiştir:

Kan tüplerinin 37°C'de inkübasyonu:	16 ila 24 saat
ELISA:	1 ELISA plakası için yaklaşık 3 saat
	1 saatten az işçilik
	Her bir ekstra plaka için 10 ila 15 dakika eklenmelidir

Reaktifler ve Saklama

CMV and Control Antigen Blood Collection Tubes (Single Patient Pack) (CMV ve Kontrol Antijen Kan Alma Tüpleri (Tek Hasta Paketi))

Katalog no. 0192-0301

Prep sayısı 1

QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON Nil Kontrol) (gri kapaklı) 1 tüp

CMV Antigen (CMV Antijen) (mavi kapaklı) 1 tüp

QuantiFERON Mitogen Control
(QuantiFERON Mitojen Kontrol) (mor kapaklı) 1 tüp

Prospektüs 1

QuantiFERON-CMV ELISA Components (QuantiFERON-CMV ELISA Bileşenleri)

Katalog no. 0350-0201

Mikroplaka şeritleri 24 x 8 kuyu şeridi

Human IFN- γ Standard (İnsan IFN- γ Standart), liyofilize 1 x şişe

Green Diluent (Yeşil Seyreltici) 1 x 30 ml

QuantiFERON Conjugate 100X Concentrate
(QuantiFERON Konjugat 100X Konsantre), liyofilize 1 x 0,3 ml

QuantiFERON Wash Buffer 20X Concentrate
(QuantiFERON Yıkama Tamponu 20X Konsantre) 1 x 100 ml

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution
(QuantiFERON Enzim Substrat Solüsyonu) 1 x 30 ml

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution
(QuantiFERON Enzim Durdurma Solüsyonu) 1 x 15 ml

Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler

- 37°C inkübatör; CO₂ gerekmez
- 10 µl ila 1000 µl uygulama için kalibre edilmiş değişken hacimli pipetler ve tek kullanımlık uçları
- 50 µl ila 100 µl uygulama kapasiteli, kalibre edilmiş çok kanallı pipetler ve tek kullanımlık uçları
- Mikroplaka çalkalayıcı
- 2 litre deiyonize veya damıtılmış su
- Mikroplaka yıkayıcı (otomatik yıkayıcı tavsiye edilir)
- 450 nm filtrelili ve 620 nm ila 650 nm referans filtrelili mikroplaka okuyucu

Saklama ve Kullanma

Kan Alma Tüpleri

- Kan alma tüplerini 4°C ila 25°C'de saklayın.
- QuantiFERON-CMV kan alma tüpleri 4°C ila 25°C'de saklandığında, tüplerin maksimum raf ömrü imalat tarihinden itibaren 15 aydır.

ELISA Kiti Reaktifleri

- Kiti 2°C ila 8°C'de saklayın.
- Enzim Substrat Solüsyonu daima doğrudan güneş ışığından koruyun.

Yeniden Hazırlanmış ve Kullanılmamış Reaktifler

Reaktiflerin nasıl yeniden hazırlanacağına yönelik talimatlar için lütfen “Kullanım Talimatları — 2. Aşama” kısmına bakın (Sayfa 11 ve 12'deki 3. ve 5. adım).

- Yeniden hazırlanan Kit Standardı, 2°C ila 8°C'de saklandığı takdirde 3 aya kadar muhafaza edilebilir. Kit Standardının yeniden hazırlandığı tarihi kaydedin.
- Yeniden hazırlandığında, kullanılmamış QuantiFERON Konjugat 100X Konsantresi 2°C ila 8°C'de saklanmaya devam edilmeli ve 3 ay içinde kullanılmalıdır. Konjugatın yeniden hazırlandığı tarihi kaydedin.
- Kullanıma hazır konjugat, hazırlanmasından itibaren 6 saat içinde kullanılmalıdır.
- Kullanıma hazır Yıkama Tamponu oda sıcaklığında (17°C ila 27°C) 2 haftaya kadar saklanabilir.

Uyarılar ve Önlemler

İn Vitro Tanı Amaçlı Kullanım İçindir.

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDSs) başvurun. Bunlar, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz www.qiagen.com/safety adresinde çevrimiçi olarak uygun ve kompakt PDF biçiminde mevcuttur.



DİKKAT: İnsan kanını kullanırken potansiyel enfeksiyöz olarak değerlendirin. İlgili kan kullanımı yönergelerine uyun.

Aşağıdaki risk ve güvenlik önlemleri QF-CMV ELISA Kiti bileşenleri için geçerlidir.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution (QuantiFERON Enzim Durdurma Solüsyonu)



Sülfürik asit içerir: Tahrişe neden olur. Risk ve güvenlik önlemleri:* R36/38, S26-36/37/39

■ **Yeşil Seyreltici** normal fare serumu ve kazein içerir. Bu maddeler alerjik reaksiyonu tetikleyebilir; ciltle temasından kaçının.

Kimyasal Acil Durumlarda

Dökülme, Sızıntı, Maruz Kalma veya Kaza Durumlarında

CHEMTREC'i günün her saatinde arayabilirsiniz

ABD ve Kanada'da: 1-800-424-9300

ABD ve Kanada dışında: +1-703-527-3887 (ödemeli aramalar kabul edilir)

Daha fazla bilgi

Güvenlik Veri Sayfaları: www.qiagen.com/safety

* R36/38: Gözlerde ve ciltte tahrişe neden olur; S26: Gözle temas etmesi durumunda derhal bol suyla yıkayın ve tıbbi yardım alın; S36/37/39: Uygun koruyucu giysiler, eldiven ve göz/yüz koruyucu ekipman kullanın.

Numune Toplama ve Kullanımı

Başlamadan önce dikkat edilmesi gereken önemli noktalar:

QF-CMV prospektüsünden farklı işlemler, hatalı sonuçlara yol açabilir. Lütfen kullanmadan önce talimatları dikkatlice okuyun.

- Kullanım öncesinde bir reaktif şişesinde hasar veya akma ibaresi görülüyorsa, kiti kullanmayın.
- Farklı QF-CMV ELISA kit gruplarından alınan ELISA reaktiflerini karıştırmayın veya kullanmayın.
- Artan reaktifleri ve biyolojik numuneleri Yerel, Ulusal ve Federal düzenlemelere uygun şekilde imha edin.
- QF-CMV kan alma tüplerini veya QF-CMV ELISA kitlerini son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.

QF-CMV'de aşağıdaki kan alma tüpleri kullanılır:

1. Nil Control (Nil Kontrol) (gri kapaklı)
2. CMV Antigen (CMV Antijen) (mavi kapaklı)
3. Mitogen Control (Mitojen Kontrol) (mor kapaklı)

Antijenler kuruyup kan alma tüplerinin iç yüzeyine yapışmıştır, bu yüzden tüplerin içindeki maddelerin kanla iyice karıştırılması çok önemlidir. Kan alımını takip eden 16 saat içinde, tüpler mümkün olduğunca hızlı bir şekilde 37°C'lik inkübatöre transfer edilmelidir.

En iyi sonuçları elde etmek için aşağıdaki prosedürler izlenmelidir:

1. **Her hasta için, venipunktür ile doğrudan her bir QF-CMV kan alma tüpüne 1 ml kan alın.**
 - 1 ml'lik tüpler diğer tüplere göre kanı biraz yavaş aldığından, tüp tamamen dolduğunda, doğru hacimde kanın tüpe alındığından emin olmak için, tüpü 2-3 saniye iğnenin üzerinde bekletin.
Tüpün yanındaki siyah işaret, 1 ml'lik dolum hacmini gösterir. QF-CMV kan alma tüpleri, 0,8 ila 1,2 ml arasındaki hacimler için onaylanmıştır. Herhangi bir tüpte kan seviyesi belirteç çizgisine yakın değilse, başka bir kan örneği alınması tavsiye edilir.
 - QF-CMV kan alma tüpleri, 810 metre rakıma kadar, 0,8 ila 1,2 ml arasında kan alma için onaylanmıştır. Bu rakımın üzerinde işlem yapılırken kullanıcılar her bir tüpe bu sınırlar dahilinde kan alındığından emin olmalıdır. Tüpe alınan kan hacmi düşükse, kan bir şırınga kullanılarak alınabilir ve her 3 tüpe de 1'er ml transfer edilebilir. Emniyet nedeniyle, bu işlemi yaparken şırınga iğnesini çıkarın, ilgili güvenlik prosedürlerini uygulayarak, üç QF-CMV tüpünün de kapaklarını çıkarın ve her birine 1 ml kan ekleyin (tüpün etiketinin yanındaki siyah işarete kadar). Kapakları sıkıca kapatın ve aşağıda anlatıldığı gibi karıştırın.
 - Kan alımı için "kelebek iğne" kullanılıyorsa, kullanılan QF-CMV kan alma tüplerinden önce, hortumun kanla dolduğundan emin olmak için bir "tahliye" tüpü kullanılmalıdır.
2. **Tüpler doldurulduktan hemen sonra tüpleri on (10) kez sallayın; antijenlerin tüp duvarlarında çözünmesi amacıyla tüpün iç yüzeyinin tamamen kanla kaplanmasına yetecek kadar güçlü bir şekilde sallayın.**
 - Kan doldurma sırasında tüpler 17°C-25°C arasında tutulmalıdır.
 - Aşırı güçlü sallama jel bozunumuna ve anormal sonuçların alınmasına neden olabilir.
3. **Tüpleri uygun şekilde etiketleyin.**
4. **Kan alımını takip eden 16 saat içinde, tüpler mümkün olduğunca çabuk 37°C ± 1°C 'lik inkübatöre transfer edilmelidir. Kan örneklerini buzdolabına koymayın veya dondurmayın.**

Kullanım Talimatları

1. Aşama — Kanın inkübasyonu ve plazmanın toplanması

1. Kan, alımından sonra hemen inkübe edilmeyecekse, inkübasyondan hemen önce, önceki kısmın 2. Adımında açıklanan şekilde tüpleri karıştırma işlemi tekrarlanmalıdır.
2. Tüpleri 37°C sıcaklıkta 16 ila 24 saat süresince DİK olarak inkübe edin. İnkübatörün CO₂ içermesi veya nemli olması gerekli değildir.
3. İnkübasyondan sonra, kan alma tüpleri, bir sonraki adımdan önce, 2°C ila 27°C'de 3 güne kadar saklanabilir. Tüplerin 37°C'de inkübasyonundan sonra, tüpleri 15 dakika 2000 ila 3000 RCF (g)'de santrifüj edin. Jel tıpası, hücreleri plazmadan ayırır. Bu işlem olmazsa, tüpler daha yüksek bir hızda tekrar santrifüj edilmelidir.
 - Santrifüj yapılmadan da plazmayı almak mümkündür, ancak hücreleri bozmadan plazmayı ayırmak için ekstra dikkat edilmesi gereklidir.
4. Santrifüj yaptıktan sonra, plazmayı toplamadan önce aşağı ve yukarı doğru pipetleme yapmaktan veya herhangi bir yolla plazmayı karıştırmaktan kaçının. İşlemin her aşamasında, jel üzerindeki materyali bozmamaya dikkat edin.
 - Plazma örnekleri yalnızca pipet ile toplanmalıdır.
 - Plazma örnekleri doğrudan santrifüj edilmiş kan toplama tüplerinden QF-CMV ELISA plakasına yüklenebilir. Bu durum, otomatik ELISA platformları kullanıldığında da geçerlidir.
 - Plazma örnekleri 2°C ila 8°C'de 28 güne kadar saklanabilir veya toplanmışlarsa, tüplerde veya plazma saklama kaplarında -20°C'nin altında (tercihen -70°C altında) saklanabilir.

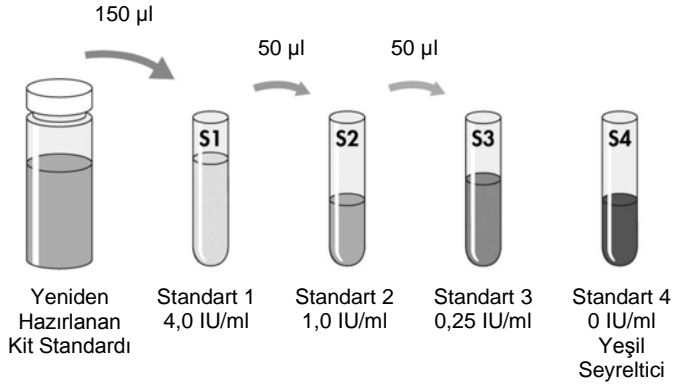
2. Aşama — İnsan IFN-γ için QuantiFERON-CMV ELISA

1. Tüm plazma numuneleri ve reaktifler, Konjugat 100X Konsantre hariç, kullanmadan önce oda sıcaklığına (17°C ila 27°C) getirilmelidir. Dengeleme için en az 60 dakika bekletilmelidir.
2. Kullanılmayacak şeritleri çerçeveden çıkarın, ambalajına geri koyun ve gerektiğinde kullanılmak üzere saklamak için buzdolabına geri koyun.

QF-CMV ELISA Standartları için en az bir şerit ve test edilen hastalar için gereken sayıda şerit bulundurun. Kullanımdan sonra, kalan şeritlerin kullanımı için plak çerçevesini ve kapağı saklayın.
3. Dondurularak kurutulmuş Kit Standardını, Standart şişesinin etiketinde belirtilen miktarda deiyonize veya distile su ile çözün. Köpürmesini azaltmak ve tamamen çözüldüğünden emin olmak için, hafifçe karıştırın. Belirtilen hacimde Standardın çözülmesi ile 8,0 IU/ml konsantrasyonunda solüsyon elde edilir.
4. Standart Eğri, Kit Standardının 3 seyreltisi ve Standart 4 (0 IU/ml) olarak tek başına Yeşil Seyreltici kullanılarak hazırlanır.

Çözülmüş Kit Standardını, 3'lü IFN-γ konsantrasyonu dilüsyon serisi hazırlamak için kullanın. Kit Yeşil Seyrelticide (GD) seyreltin (bkz. sonraki sayfadaki Şekil 1). Standartlar en azından çift olarak test edilmelidir; aşağıdaki adımlar bunun için gerekli hacmi oluşturur.

 - a. 4 tüpü "S1", "S2", "S3", "S4" olarak etiketleyin.
 - b. 4 tüpe 150 µl Yeşil Seyreltici ekleyin (S1-S4).
 - c. S1'e 150 µl Kit Standardı koyun ve iyice karıştırın.
 - d. S1'den 50 µl alıp S2'ye koyun ve iyice karıştırın.
 - e. S2'den 50 µl alıp S3'e koyun ve iyice karıştırın.
 - f. Yeşil Seyreltici tek başına sıfır standardı olarak işlev görür (S4).



Şekil 1. Standart Eğrinin Hazırlanışı. Her ELISA seansı için Kit Standardının dilüsyonlarını taze olarak hazırlayın.

5. Dondurularak kurutulmuş QuantiFERON Konjugat 100X Konsantre'yi 0,3 ml deiyonize veya distile su ile çözün. Köpürmesini azaltmak ve Konjugat'ın tamamen çözüldüğünden emin olmak için, hafifçe karıştırın.
6. Kullanıma hazır konjugat, Tablo 1 — Konjugat Hazırlama'da belirtildiği gibi, gereken miktarda çözülmüş Konjugat 100X Konsantre'nin Yeşil Seyreltici ile seyreltilmesiyle hazırlanır.
 - Köpürmesini engellemek için hafifçe ama iyice karıştırın.
 - Kullanımdan hemen sonra, kalan açılmamış Konjugat 100X Konsantre'yi 2°C ila 8°C'de muhafaza etmek üzere kaldırın.
 - Sadece Yeşil Seyreltici kullanın.

Tablo 1. Konjugat hazırlama

Şerit sayısı	Konjugat 100X Konsantre Hacmi	Yeşil Seyreltici Hacmi
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. **Teste başlamadan önce, IFN- γ 'nin her bir örnek içinde eşit dağıldığından emin olmak için, plazmalar çalkalanmalıdır. Ayrıca kantitatif sonuçlar gerekiyorsa, CMV ve Mitojen plazmalarını Yeşil Seyreltici (GD) kullanarak 1/10 oranında (10 μ l plazma ile 90 μ l GD karıştırılır) seyreltin. Nil plazması seyreltilmemelidir.**

Aşağıdaki örneklerin test edilmesi önerilir:

- Nil, CMV Antijen, Mitojen, CMV Antijen (1/10), Mitojen (1/10)

Ancak, aşağıdaki hasta örnek opsiyonları da QuantiFERON-CMV Analiz Yazılımı tarafından desteklenir:

- Nil, CMV Antijen, Mitojen
- Nil, CMV Antijen (1/10), Mitojen (1/10)
- Nil, CMV Antijen, Mitojen, CMV Antijen (1/10)
- Nil, CMV Antijen (1/10), Mitojen

8. **Çok kanallı pipet kullanarak, gerekli ELISA kuyularına 50 μ l taze hazırlanmış kullanıma hazır konjugat ekleyin.**
9. **Çok kanallı pipet kullanarak, uygun kanallara plazma örneklerinden 50 μ l ekleyin. Son olarak, 1 ila 4 arası Standartların her birine 50 μ l ekleyin.**
10. **Mikroplaka çalkalayıcı kullanarak, konjugat ve plazma örnekleri/standartlarını 1 dakika boyunca iyice karıştırın.**
11. **Her plakayı kapak ile kapatın ve oda sıcaklığında (17°C ila 27°C) 120 \pm 5 dakika inkübe edin.**
- Plakalar inkübasyon sırasında doğrudan güneş ışığına maruz kalmamalıdır.
12. **İnkübasyon sırasında, bir birim Yıkama Tamponu 20X Konsantreyi 19 birim deiyonize veya distile su ile seyreltin ve iyice karıştırın. Mevcut Yıkama Tamponu 20X Konsantre, 2 litre kullanıma hazır yıkama solüsyonu hazırlamak için yeterlidir.**
- İnkübasyondan sonra kuyuları 400 μ l yıkama solüsyonu ile en az 6 kez yıkayın. Otomatik bir plaka yıkayıcı kullanılması tavsiye edilir.
- Testin performansı için düzgün bir yıkama yapılması çok önemlidir. Her kuyunun, **her yıkama aşamasında**, yıkama solüsyonu ile tamamen dolu olduğundan emin olun. Her yıkama adımı arasında en az 5 saniye bekleme periyodu olması tavsiye edilir.
 - Atık kabına standart laboratuvar dezenfektanı eklenmelidir ve potansiyel enfektif materyallerinin dekontaminasyonu için gerekli prosedürler uygulanmalıdır.
13. **Plakaların üzerinde kalan yıkama solüsyonunu gidermek için plakaları emici bir havlu üzerinde ters çevirin ve arkasına vurun. Her kuyuya 100 μ l Enzim Substrat Solüsyonundan ekleyin ve bir mikroplaka çalkalayıcı kullanarak iyice karıştırın.**
14. **Her plakayı kapak ile kapatın ve oda sıcaklığında (17°C ila 27°C) 30 dakika inkübe edin.**
- Plakalar inkübasyon sırasında doğrudan güneş ışığına maruz kalmamalıdır.
15. **30 dakikalık inkübasyonu takiben, her kuyuya 50 μ l Enzim Durdurma Solüsyonu ekleyin ve karıştırın.**
- Enzim Durdurma Solüsyonu, 13. adımdaki substrat ile aynı sıra ile ve yaklaşık aynı hızda kuyulara eklenmelidir.
16. **450 nm'lik bir filtresi ve 620 nm ila 650 nm'lik referans filtresi bulunan bir mikroplaka okuyucu kullanarak, reaksiyonu durdurduktan sonraki 5 dakika içinde her bir kuyunun Optik Dansitesini (OD) ölçün. OD değerleri sonuçların hesaplanmasında kullanılır.**

Hesaplamalar ve Testin Yorumlanması

Ham verilerin analizi ve sonuçların hesaplanmasında kullanılan QuantiFERON-CMV Analiz Yazılımı, QIAGEN'den www.QuantiFERON.com adresinden edinilebilir.

Yazılım, Sonuçların Yorumlanması bölümünde detaylı şekilde anlatıldığı gibi, testin kalite kontrol değerlendirmesini gerçekleştirir, bir standart eğri oluşturur ve her hasta için bir test sonucu sunar.

QF-CMV Analiz Yazılımını kullanmak yerine, sonuçlar aşağıdaki metoda göre hesaplanabilir.

Standart Eğrinin Çizilmesi

Her plakadaki Kit Standardı tekrarlamalarından ortalama OD değerlerini hesaplayın.

Ortalama OD $\log_{(e)}$ 'sine (y eksen) karşı standartların IU/ml cinsinden IFN- γ konsantrasyonu $\log_{(e)}$ 'si (x eksen) çizerek bir $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ standart eğrisi oluşturun; sıfır standardını bu hesaplamalara katmayın. Standart eğrinin en iyi çizimini regresyon analizi ile hesaplayın.

Her bir örneğin OD değerini kullanarak, her bir test plazma örneğinin IFN- γ konsantrasyonu (IU/ml) belirlemek için standart eğriyi kullanın.

Bu hesaplamalar, mikroploka okuyucularla gelen yazılım paketleri ve standart çalışma sayfası veya istatistik yazılımları (Microsoft® Excel® gibi) kullanılarak da yapılabilir. Bu paketlerin, regresyon analizinin, standartların değişim katsayısının (%CV) ve standart eğrinin doğruluk katsayısının (r) hesaplanmasında kullanılması tavsiye edilir.

Testin Kalite Kontrolü

Test sonucunun kesinliği, doğru bir standart eğrinin oluşturulmasına bağlıdır. Bu yüzden, test örneği sonuçları yorumlanmadan önce standartlardan edinilen sonuçlar gözden geçirilmelidir.

ELISA'nın geçerli olması için:

- Standart 1'in ortalama OD değeri $\geq 0,600$ olmalıdır.
- Standart 1 ve Standart 2'nin tekrarlarının OD değerleri arasındaki %CV ≤ 15 olmalıdır.
- Standart 3 ve Standart 4'ün tekrarlamalarının OD değerleri ile ortalamaları arasında 0,040 optik dansite değerinden fazla fark olmamalıdır.
- Standartların ortalama absorbans değerlerinden hesaplanan korelasyon katsayısı (r) $\geq 0,98$ olmalıdır.

Yukarıdaki kriterler karşılanmıyorsa, çalışma geçersiz kabul edilmeli ve tekrarlanmalıdır.

Sıfır Standardının (Yeşil Seyreltici) ortalama OD değeri $\leq 0,150$ olmalıdır. Eğer ortalama OD değeri $> 0,150$ ise plaka yıkama prosedürü gözden geçirilmelidir.

Sonuçların Yorumlanması

QuantiFERON-CMV sonuçları aşağıdaki kriterler kullanılarak yorumlanır:

CMV eksi Nil (IU/ml)*	Mitojen eksi Nil (IU/ml)	QF-CMV sonucu	Rapor/Yorumlama
< 0,2	≥ 0,5	Reaktif olmayan	Anti-CMV immünite tespit EDİLMEDİ
≥ 0,2	Tümü	Reaktif	Anti-CMV immünite tespit edildi
< 0,2	< 0,5	Şüpheli [†]	CMV yanıt verebilirliği sonucu şüphelidir

* CMV Antijen ve Mitojen pozitif kontrole oluşan IFN- γ cevapları sık sık mikroplaka okuyucuların okuma aralığının dışında olabilir. Bu durum test sonuçlarına herhangi bir etki oluşturulmaz.

[†] Olası nedenleri için Sorun Giderme kısmına bakın.

Sınırlamalar

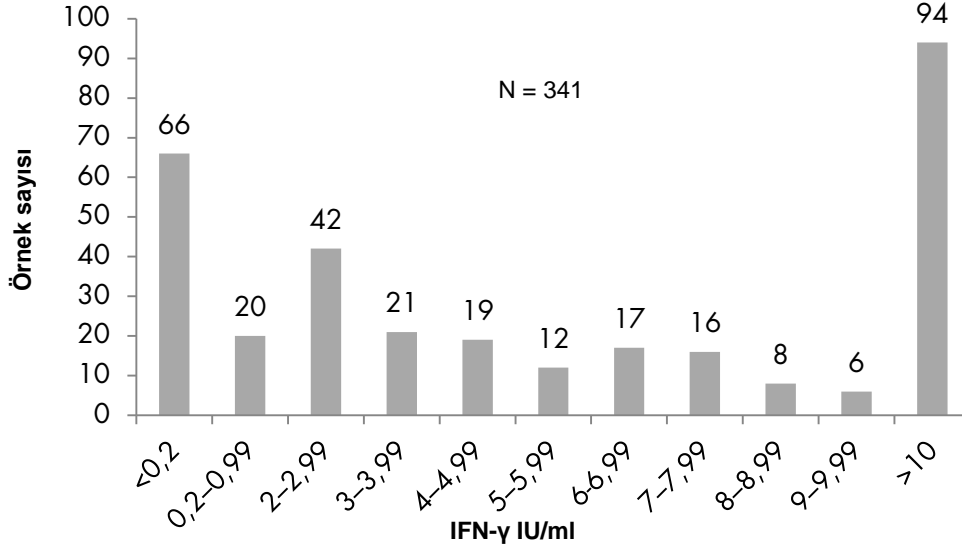
QuantiFERON-CMV test sonuçları, her bireyin kendi epidemiyolojik geçmişi, mevcut medikal durumu ve diğer teşhis değerlendirmelerinin bir birleşimi ile birlikte kullanılmalıdır.

Aşağıdakilere bağlı olarak emin olunmayan veya şüpheli sonuçlar elde edilebilir:

- Paket Prospektüsünde anlatılan prosedürün tam uygulanmaması.
- Nil tüpündeki IFN- γ seviyesinin aşırı yüksek olması.
- Kan numunelerinin 37°C'deki inkübasyonunun 16 saatten fazla olması.

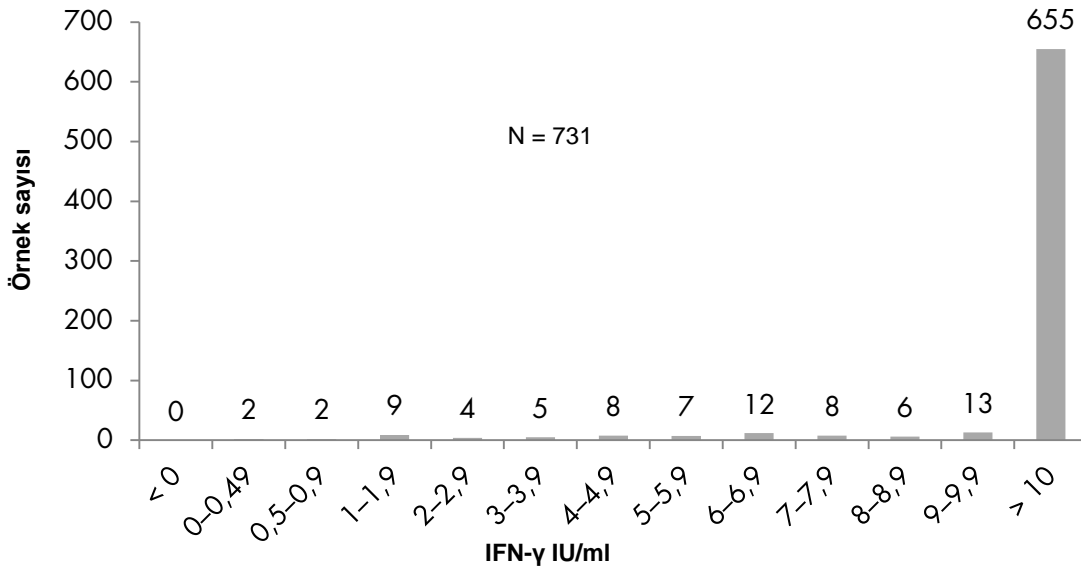
Beklenen Değerler

QuantiFERON-CMV kullanıldığında beklenen IFN- γ değerleri, sağlıklı yetişkinler arasından seçilen, 341'i CMV seropozitif; 250'si seronegatif olan 591 örnek üzerinde yapılan testlerden elde edilmiştir. Anti-CMV serolojisi tarafından CMV enfeksiyonu bulunmadığı tespit edilen 250 (CMV seronegatif) sağlıklı yetişkin arasından %100'ü CMV Antijen tüpüne (eksi Nil) < 0,2 IU/ml değerinde IFN- γ yanıtı vermiştir. Anti-CMV serolojisi tarafından CMV enfeksiyonu bulunduğu tespit edilen 341 (CMV seropozitif) sağlıklı kişi için CMV Antijen tüpü (eksi Nil) dağılımı Şekil 2'de gösterilmiştir.



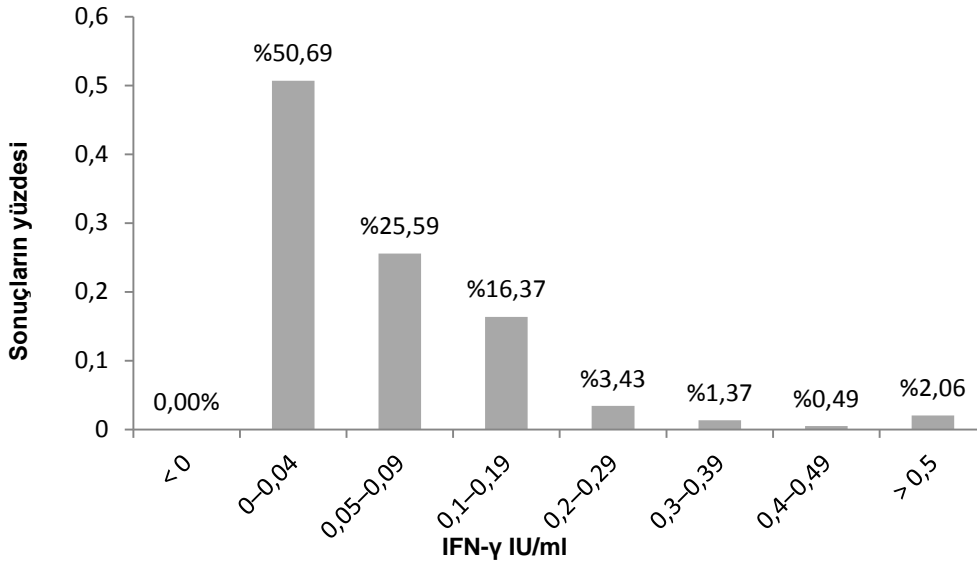
Şekil 2. Seropozitif sağlıklı kişilerde CMV-Nil IFN- γ yanıtlarının dağılımı (n=341).

Sağlıklı yetişkin kişilerden alınan 731 normal kan örneğinde, bilinen CMV enfeksiyonu olup olmadığından bağımsız olarak, Mitojen (eksi Nil arkaplan) sonuçlarının dağılımı Şekil 3'de gösterilmiştir. 0,5 IU/ml altındaki Mitojen (eksi Nil) sonuçları, ya testin başarısız olduğunu ya da kişinin immünokompromize durumda olduğunu gösterir. Sağlıklı bir toplumda, 731 sonucun yalnızca 2'si bu kategoriye girer.



Şekil 3. Sağlıklı yetişkin kişilerde Mitojen-Nil IFN- γ yanıtlarının dağılımı (n = 731).

Nil tüpleri için beklenen değerler Şekil 4'te gösterilmiştir. Veriler, QuantiFERON-CMV ELISA kullanılarak sağlıklı yetişkin kişilerden alınan 1020 plazma örneğinden elde edilmiştir.



Şekil 4. Sağlıklı yetişkin kişilerde Nil IFN-γ yanıtlarının dağılımı (nüfusun %'si olarak ifade edilmiştir) (n = 1020).

Performans Özellikleri

Karşılaştırma Testi

QF-CMV sonuçlarının CMV serolojik sonuçlarla kıyaslandığı bir grup sağlıklı kişiden (n=223) alınan sonuçların analiz edilmesinin ardından, QF-CMV kullanılarak daha önce CMV'ye maruz kalınıp kalınmadığının tespitine yönelik bir test eşiği oluşturuldu. Bir ROC analizi, 0,04 IU/ml (nil çıkarıldıktan sonra) değerindeki bir test eşiğinin, QF-CMV için optimal pozitif ve negatif tahmini değerleri sağladığını tespit etmiş (eğrinin altındaki alan = 0,9679 [%95 CI = 0,9442 ila 0,9915, $p < 0,0001$]) ve bu nedenle bu testin gerçekleştirildiği sağlıklı bir toplulukta amaçlanan kullanımını en etkili şekilde yerine getirdiği durumdaki eşiği temsil etmiştir.

Karşılaştırma testinde, QF-CMV'nin performansı SeraQuest CMV IgG seroloji testi (Quest International) ile kıyaslanmıştır. QF-CMV testi, sağlıklı bireylerde uygulanan anti-HCMV seroloji karşılaştırma testi ile %95 oranında (310 bireyden 294'ü) mutabık kalmış; 149 seronegatif donörün hiçbiri QF-CMV ile bir reaktivite göstermemiş, 161 seropozitif donörün 145'i reaktif bir IFN-γ yanıtı sergilemiştir. Toplamda alınan pozitif sonuçların %90'unda, negatif sonuçların ise %100'ünde tutarlılık sağlanmıştır. QF-CMV tarafından ölçüldüğü şekilde sağlıklı gönüllülerde CMV peptidlerine verilen IFN-γ yanıtları ile SeraQuest CMV IgG seroloji testi kullanan nesnelerin anti-CMV seroloji durumları arasındaki tutarlılık seviyesi, Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Sağlıklı kişilerde QuantiFERON-CMV ile CMV IgG seroloji testi arasındaki tutarlılık.

		CMV Serolojisi		Toplam
		Pozitif	Negatif	
QuantiFERON-CMV	Reaktif	145	0	145 (%46,8)
	Reaktif olmayan	16	149	165 (%53,2)
	Toplam	161 (%51,9)	149 (%48,1)	310 (%100)

Test eşik değeri

Bu test için tavsiye edilen klinik test eşik değeri CMV Antijen tüpünde (eksi Nil) 0,2 IU/ml'dir, ancak farklı klinik ayarlarda farklı eşik değerleri doğrulanabilir. Buradaki mantık, normal bir test popülasyonu ile testin klinik olarak faydalı kabul edildiği popülasyonlar (immünosupresyon nedeniyle semptomatik CMV enfeksiyonu ve/veya hastalığı geliştirme riski taşıyan ve özellikle immünosupresyon uygulanan kişiler) arasındaki temel immünolojik farklılıklara dayanır. Bu tip yüksek risk grubundaki kişilerde, QF-CMV'nin klinik faydaları, immünite eksikliği CMV hastalığı gelişimiyle bağlantılı olabileceğinden, bu kişilerdeki anti-CMV immünite seviyesinin tam olarak tespit edilmesine dayanır (1-5, 7, 8, 11-16).

Klinik Çalışmalar

Sitomegalovirüs enfeksiyonu tanısını onaylamaya veya ekarte etmeye yönelik kesin bir standart bulunmadığı için, QF-CMV testinin tahmini hassasiyeti veya özgüllüğüne yönelik bir tahmin pratik olarak değerlendirilemez. QF-CMV testinin özgüllüğü ve hassasiyeti, sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan QF-CMV ile ölçülen değerlere göre CMV peptidlerine verilen IFN- γ yanıtları ile bu kişilerin CMV IgG seroloji testi kullanılarak tespit edilen anti-CMV seroloji durumları arasındaki tutarlılık seviyesi değerlendirilerek yaklaşık olarak tahmin edilebilir.

QF-CMV'nin özgüllüğü, daha önce CMV'ye maruz kalma belirtisi göstermeyen sağlıklı gönüllülerdeki (CMV seronegatif bireylerdeki) yalancı pozitif oranların (QF-CMV Reaktif yanıtı) değerlendirilmesiyle yaklaşık olarak tahmin edilebilir. Hassasiyet, daha önce CMV'ye maruz kalma belirtisi gösteren sağlıklı gönüllülerin (CMV seropozitif bireyler) değerlendirilmesiyle yaklaşık olarak tahmin edilebilir. QF-CMV testinin farklı CMV proteinlerinden alınan çok sayıda CMV'ye özgü epitop kullanmasına ve bu sayede çok çeşitli HLA I. Sınıf haplotiplere sahip geniş bir yelpazedeki popülasyona geniş bir klinik uygulama sağlamasına rağmen, bu peptidlerin kapsamı %100 değildir. CMV serolojisi testine tabi tutulan kişilerin HLA haplotipleri bilinmediği için, seroloji pozitif bireylerin küçük bir kısmının QF-CMV tüplerine yanıt vermemesi beklenmiştir.

Özgüllük

Daha önce CMV'ye maruz kalma belirtisi göstermeyen sağlıklı kişiler (n = 250 olan CMV seronegatif bireyler) üzerinde yapılan bir çalışmada, QF-CMV ile ölçülen CMV peptidlerine verilen IFN- γ yanıtları ile anti-CMV seroloji bilgileri arasındaki tutarlılık oranının %100 olduğu görülmüştür.

Katı organ nakli alıcılarında (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), hematopoietik kök hücre transplantı alıcılarında (7, 13) ve HIV-enfekte hastalarda (2) yapılan diğer tüm özgüllük değerlendirmelerinde, QF-CMV ile ölçülen CMV peptidlerine verilen IFN- γ yanıtları ile anti-CMV seroloji arasındaki tutarlılık oranının sürekli olarak %100 olduğu görülmüştür.

Hassasiyet

Daha önce CMV'ye maruz kalma belirtisi gösteren sağlıklı kişiler (n = 341 olan CMV seropozitif bireyler) üzerinde yapılan bir çalışmada, QF-CMV ile ölçülen CMV peptidlerine verilen IFN- γ yanıtları ile anti-CMV seroloji bilgileri arasındaki tutarlılık oranının %80,6 olduğu görülmüştür (341 kişinin 275'i). Gözlenen tutarsızlık, daha yüksek bir test eşik değeri kullanılması (0,2 IU/ml), yalancı pozitif CMV serolojisi veya kişilerin testte bulunan CMV peptidlerine yanıt vermemesine bağlı olabilir.

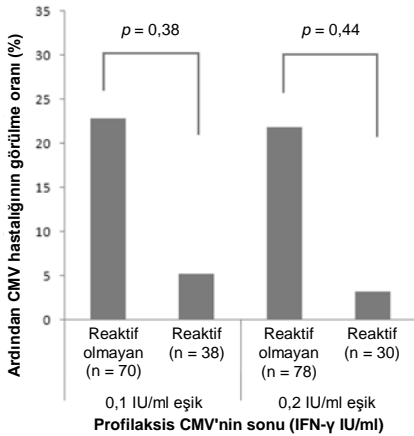
Katı organ nakli alıcılarında (1, 3, 4, 8, 12, 14-16), hematopoietik kök hücre transplantı alıcılarında (7, 13) ve HIV-enfekte hastalarda (2) yapılan hassasiyet değerlendirmelerinde, QF-CMV ile ölçülen CMV peptidlerine verilen IFN- γ yanıtları ile bu hastalardaki CMV seropozitif yanıtlar arasında biraz daha düşük oranda tutarlılık görülmüştür. Düşük tutarlılık oranının nedeni, yalancı pozitif CMV serolojisi, hastaların testte bulunan CMV peptidlerine yanıt vermemesi veya immünosupresyonları nedeniyle bu hastalarda reaktif T hücreleri bulunmaması olabilir.

Klinik faydaları öne çıkaran çalışmalar

Hem seroloji hem de QF-CMV'nin kullanım amacı, CMV'ye immünitenin tespit edilmesini sağlamak olarak açıklanmıştır. Bir transplant ortamında, CMV serolojisi transplantasyon öncesinde alıcıda transplantasyon sonrası meydana gelebilecek CMV komplikasyonları riskini tespit etmek için geniş çaplı şekilde kullanılır; ancak transplantasyon sonrasında sınırlı değere sahip olur. Bunun yerine, transplant alıcılarında, immünosupresyon nedeniyle semptomatik CMV enfeksiyonu ve/veya hastalığı geliştirme riski bulunan bu hastaların CMV immünte seviyelerini değerlendirmek için QF-CMV kullanılabilir (6, 9-11).

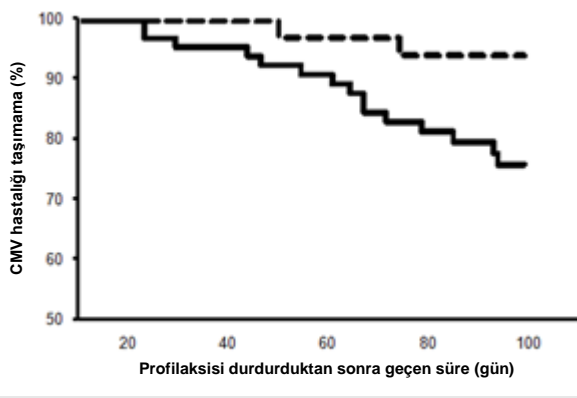
Çeşitli transplant vakalarıyla ilgili olarak yayınlanmış bir dizi klinik çalışma, QuantiFERON-CMV'nin faydalarını gözler önüne sermektedir (1-5, 7, 8, 11-16).

108 katı organ transplantı alıcılarını kapsayan geniş kapsamlı bir çalışmada (4), anti-CMV profilaksisin tamamlanmasında QF-CMV Reaktif sonucu elde edilen hastaların, QF-CMV reaktif olmayan sonuç elde edilen hastalara kıyasla geç başlayan hastalık oranının çok daha düşük olduğu görülmüştür (sırasıyla %5,3 ve %22,9, $p = 0,044$) (Şekil 5).



Şekil 5. QuantiFERON-CMV Reaktif sonucu olan hastalarda geç başlayan CMV hastalığı oranı ile profilaksis sonunda QuantiFERON-CMV Reaktif olmayan sonuç elde edilen hastaların oranı kıyaslaması. Veriler Kumar et al.'den elde edilmiştir (4)

Ayrıca, profilaksisin tamamlanması üzerine reaktif QF-CMV test sonucu alınan hastalarda CMV hastalığına yakalanmama oranı daha yüksek ve daha uzun sürelidir (Şekil 6), bu da QF-CMV testinin geç bağlayan CMV hastalığı geliştirme riski olan kişilerin tespit edilmesinde kullanılabileceğini gösterir.

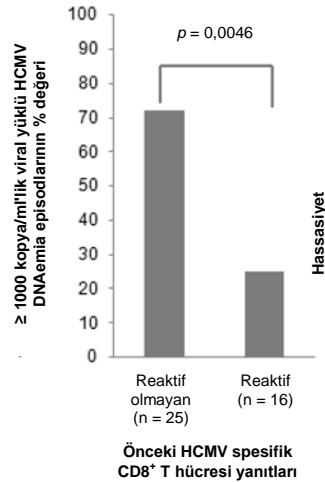


Şekil 6. Profilaksisi sonunda QuantiFERON-CMV Reaktif sonucu (noktalı çizgi ile gösterilir) alınan hastalara kıyasla QuantiFERON-CMV Reaktif olmayan sonucu (düz çizgi ile gösterilir) alınan hastalarda CMV hastalığının gelişme süresi. Veriler Kumar et al.'den elde edilmiştir (4)

Bu çalışma aynı zamanda, CMV hastalığı geliştirme riski en yüksek olan transplantasyon hastaları kohortunda (CMV seropozitif bir donörden bir organ alan CMV seronegatif transplantasyon alıcıları, yani D+/R-) profilaksisi sonrası herhangi bir zamanda alınan bir QF-CMV Reaktif sonucun CMV hastalığı taşıyımama şansının %90 olmasıyla ilgili olduğunu göstermiştir.

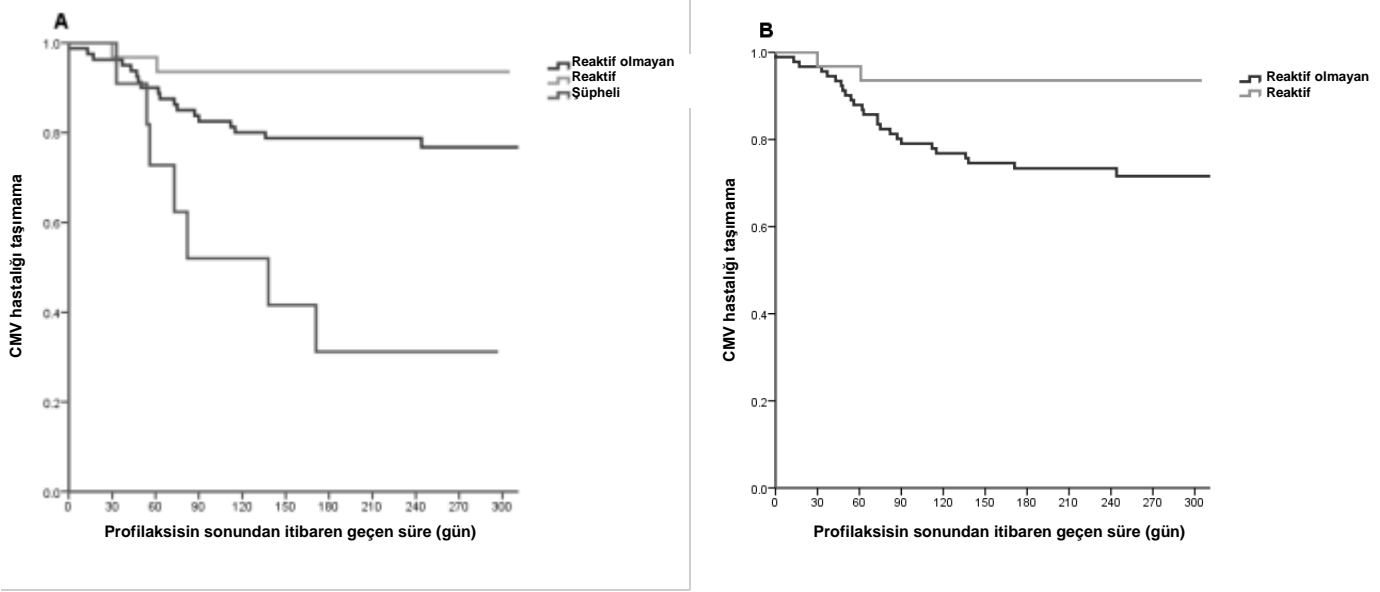
37 katı organ transplantı hastasında (12) gerçekleştirilen bir çalışmada, QF-CMV testi aracılığıyla CMV'ye özgü CD8⁺ T hücreleri yanıtlarının değerlendirilmesi, CMV vireminin artmasının ardından CMV hastalığının ilerlemesine kıyasla spontan viral klerans tahmininde yardımcı olmuştur. Bu çalışmada, QF-CMV Reaktif sonucu alınan 26 hastanın 24'ü (%92,3'ü) spontane olarak CMV virüsünü temizlerken, QF-CMV Reaktif olmayan sonuç alınan 11 hastanın yalnızca 5'i (%45,5'i) aynı sonucu elde etmiştir.

Transplant sonrası CMV viremi episodlarını değerlendiren ve 67 Akciğer Transplant alıcısı üzerinde yapılan bir çalışmada (14), 25 hastanın 18'inde (%72) CMV viremi episodları öncesinde Reaktif olmayan QF-CMV sonucu alınmış; buna karşılık, 16 hastanın 4'ünde (%25) öncesinde Reaktif bir QF-CMV yanıtı alınmıştır (Fisher tam testi, $p = 0,0046$, bkz. Şekil 7).



Şekil 7. QuantiFERON-CMV testi ile tespit edilen CMV'ye özgü CD8⁺ T hücre yanıtları ve CMV viremi gelişiminin istatistiksel analizi (Fisher tam testi, $p = 0,0046$). Veriler Weseslindtner et al'den elde edilmiştir (14).

Tamamı antiviral profilaksis alan 127 D+/R- katı organ transplantı alıcısını kapsayan geniş ve çok merkezli prospektif bir çalışmada (15), QF-CMV Reaktif sonucu alınan hastaların (0,1 IU/ml'lik test eşiği kullanılarak) anti-CMV profilaksisin tamamlanmasının ardından herhangi bir zamanda transplant sonrası 12 ayda geç hastalık başlangıcı oranı QF-CMV Reaktif olmayan ve şüpheli sonuç alınan hastalara kıyasla çok daha düşük olmuştur (Sırasıyla %6,4 ve %22,2'ye karşı %58,3, $p < 0,001$). Şüpheli sonuçlar aynı zamanda "Reaktif olmayan" olarak sınıflandırıldığında, ardından CMV hastalığının görülme oranı %6,4'e karşılık %26,8 olarak tespit edilmiştir $p = 0,024$ (bkz. Şekil 8). CMV hastalığından korunmaya yönelik pozitif ve negatif QF-CMV tahmini verileri sırasıyla 0,90 (%95 CI 0,74-0,98) ve 0,27 (%95 CI 0,18-0,37) olmuştur; bu da post-profilaksis döneminde herhangi bir zamanda alınan QuantiFERON-CMV Reaktif sonucunun %90 ihtimalle CMV hastalığı taşıyama şansı ile ilgili olduğunu gösterir. Bu çalışma, hastaların profilaksis sonrasında CMV hastalığı gelişimi riskinin düşük, orta veya yüksek düzeyde olduğunu tahmin etmede QF-CMV testinin faydalı olabileceğini göstermektedir.



Şekil 8. QF-CMV testi sonuçlarına göre CMV hastalığı görülme olasılığı Kaplan-Meier eğrisi.

A Reaktif - Reaktif olmayan - Şüpheli QF-CMV sonuçları karşılaştırması (log derecelendirme testi, $p < 0,001$).

B Reaktif - Reaktif olmayan karşılaştırması; şüpheli sonuçlar "Reaktif olmayan" olarak kabul edilmiştir (log derecelendirme testi, $p = 0,024$).

55 katı organ transplantı alıcısı üzerinde yapılan ve transplant öncesi QF-CMV sonuçları ile transplant sonrası CMV replikasyon episodları arasındaki ilişkinin analiz edildiği prospektif bir çalışmada (16), QF-CMV Reaktif sonucu alınan R(+) organ alıcılarına (4/30 veya %13,3) kıyasla, transplant öncesi QF-CMV Reaktif olmayan sonucu alınan R(+) organ alıcılarında (7/14 veya %50), transplant sonrası CMV replikasyonu görülme olasılığının daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma, CMV seropozitif bir donörden bir organ alan ve QF-CMV Reaktif olmayan pretransplant alıcılarının CMV replikasyonu riskinin QF-CMV Reaktif sonucu alan pretransplant alıcılarına kıyasla on kat daha yüksek olduğunu (ayarlı RO 10,49, %95 CI 1,88-58,46) ve transplant öncesi bir QF-CMV testinin transplant sonrası CMV replikasyonu riskini tahmin etmede faydalı olabileceğini ve bu sayede katı organ transplantasyonu sonrasında CMV enfeksiyonu yönetiminin kişiselleştirilebileceğini göstermiştir.

Transplant alıcıları kohortunda QF-CMV testi ile CMV'ye özgü CD8⁺ T hücreleri yanıtlarının tespitini araştıran bir dizi başka çalışma da tamamlanmış (1, 3, 5, 7, 8, 11, 13) veya dünya çapında halen devam etmektedir.

Katı organ transplantında sitomegalovirüsün yönetimi hakkındaki uluslararası konsensus kılavuzu

CMV'ye özgü immün izlemenin önemi, "Katı organ transplantında sitomegalovirüsün yönetimi hakkındaki uluslararası konsensus kılavuzu" adlı çalışmada kabul edilmiş ve yayınlanmıştır (6). CMV ve katı organ transplantı konusundaki uzmanların katıldığı bir panelde geliştirilen ve The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society tarafından iletilen bu uluslararası kılavuz; tanı, immünoloji, önleme ve tedavi konuları dahil olmak üzere, CMV yönetimi hakkında uzman görüşüne dayalı ortak kılavuz bilgileri ve kanıtları sunar.

Bu kılavuz, "CMV'ye özgü T hücresi yanıtlarının immün takibi, transplant sonrası CMV hastalığına yakalanma riski taşıyan bireyleri tahmin edebilir ve profilaksis ve pre-emptiv tedavilerin yönlendirilmesinde faydalı olabilir" sonucuna varmıştır (6).

Ayrıca, bu kılavuzda aşağıdakileri içeren ideal immün izleme testinin özelliklerine ilişkin tavsiyeler de bulunmaktadır:

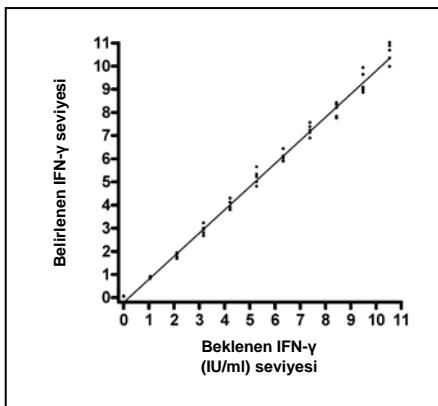
- Transplant alıcılarının CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin miktarını ve fonksiyonunu değerlendirme becerisi
- IFN- γ değerini ölçebilme
- Uygulaması kolay, düşük maliyetli ve tekrarlanabilir olması
- Sonuçların kısa sürede alınması
- Numunelerin uzmanlaşmış hakem laboratuvarlara kolayca gönderilmesi

QF-CMV testi, bu kılavuzda belirtilen hemen hemen tüm kriterleri karşılamakta ve CMV'ye özgü IFN- γ 'yi tespit edebilen tek standart, immün izleme testi olma özelliği taşımaktadır.

Test Performans Özellikleri

IFN- γ konsantrasyonunun QF-CMV ELISA ile ölçülme metodu, sıfırdan 10 IU/ml'ye, doğrusal olarak gösterilmiştir (Şekil 9). ELISA plakasına bilinen IFN- γ konsantrasyonlarının 11 plazma havuzunun 5 replikası rasgele yerleştirilerek doğrusallık çalışması yapılmıştır.

QF-CMV ELISA, 100.000 IU/ml'ye kadar IFN- γ konsantrasyonunda yüksek doz kanca (prozon) etkisi kanıtı göstermemiştir.



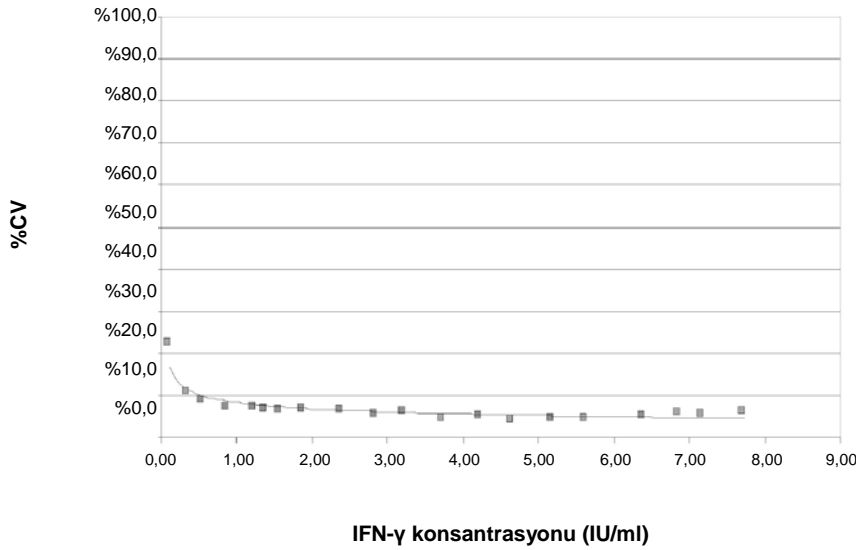
Şekil 9. QF-CMV ELISA'nın doğrusallık profili, bilinen IFN- γ konsantrasyonlarının 11 plazma örneğinden 5'inin replikası test edilerek kanıtlanmıştır. Doğrusal regresyon hattı $1,002 \pm 0,011$ 'lik eğime sahip olup, korelasyon katsayısı 0,99'dur.

QF-CMV ELISA'nın Intra- ve inter-test hata payı (%CV), çeşitli IFN- γ konsantreleri ile 20 plazma örneğinin 3'erli olarak, 3 laboratuarda, ardışık olmayan 3 günde ve 3 operatör tarafından test edilmesiyle tahmin edilmiştir. Böylece her örnek 9 ayrı test çevriminde, 27 kez test edilmiştir. Örneklerden Nil kontrol olan birisinin hesaplanan IFN- γ konsantrasyon değeri 0,08 (%95 CI 0,07-0,09) IU/ml olarak tespit edilmiştir. Kalan 19 plazma örneğinden, konsantrasyon değeri aralığı 0,33 (0,31-0,34) ile 7,7 IU/ml (7,48-7,92) arasındadır.

Çevrim içinde veya intra-test hata payı işletilen (n=9) her plakadan IFN- γ içeren her bir test plazması için %CV'lerin ortalaması alınarak tahmin edilmiştir ve elde edilen değer %4,1 ila 9,1 CV arasında çıkmıştır. Ortalama değer %CV (\pm %95 CI) %6,6 \pm %0,6 olarak tespit edilmiştir. Sıfır IFN- γ plazma ortalaması %14,1 CV olarak tespit edilmiştir.

Toplam veya inter test hata payı, her bir plazma örneği için hesaplanan 27 IFN- γ konsantrasyonu kıyaslanarak tespit edilmiştir ve elde edilen değer %6,6 ila 12,3 CV arasındadır. Genel ortalama %CV (\pm %95 CI) %8,7 \pm %0,7 olarak tespit edilmiştir. Sıfır IFN- γ plazma değeri %26,1 CV olarak tespit edilmiştir. Bu düzeyde bir değişkenlik bekleniyordu, çünkü hesaplanan IFN- γ konsantrasyonu düşüktü ve düşük bir konsantre tahminindeki değişkenlik, daha yüksek konsantrasyona kıyasla daha fazla olur.

QF-CMV ELISA testinin hassaslık profili Şekil 10'da gösterilmektedir ve daha yüksek IFN- γ konsantrasyonlarında hata payının artmadığı görülmektedir.



Şekil 10. QF-CMV ELISA'nın hata payı profili, 20 plazma örneğinin üçerli olarak, 3 laboratuarda, ardışık olmayan 3 günde ve 3 operatör tarafından test edilmesiyle tespit edilmiştir. Eğilim doğrusu, en az karenin sığıdığı hesaplamadır.

CMV statüsü bilinmeyen 8 kişiden alınan kan örnekleri kullanılarak QF-CMV testinin tekrarlanabilirliği üzerine bir çalışma yapılmıştır. Her kişinin kanı, üç set QF-CMV tüpüne alınmıştır (3 x Nil, 3 x CMV, ve 3 x Mitojen). Üç tüp seti daha sonra, Prospektüste de açıklandığı gibi, üç farklı alanda inkübe edilmiştir (her alanda birer set Nil, CMV ve Mitojen). 16 ila 24 saatlik inkübasyonun ardından, tüpler santrifüjlenmiş ve plazma toplanmıştır.

ELISA'lar ardından üç sitenin her birinde üçer kez gerçekleştirilmiş; her alandaki her bir kişi için üç QF-CMV sonucu elde edilmiştir (tüm alanlarda toplam 9 sonuç). Her alanda farklı operatör kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan plakalar aynı lot numarasından olmamakla beraber, hepsi de kullanım tarihi dahilindedir.

Her bir kan örneği için hem tanı durumu (Reaktif, Reaktif olmayan veya Şüpheli) hem de sayısal değer açısından tekrarlanabilirlik sağlanmıştır. Sayısal değerlerin tekrarlanabilirliği yalnızca reaktif örneklerde değerlendirilmiştir (%CV cinsinden ifade edildi), çünkü "reaktif olmayan" örneklerdeki IFN- γ seviyeleri, anlamlı bir hassaslık tahmini sağlayamayacak kadar küçüktür.

Sonuç olarak toplamda 8 gönüllünün QF-CMV tanı durumuna ilişkin tüm alanlarda, tüm durumlarda, şüpheli örnekler raporlanmadan, tanı tekrarlanabilirliği %100 olarak belirlenmiştir. Reaktif örneklerin tekrarlanabilirliği alan içinde ve alanlar arasında kabul edilebilir bir değer olarak tespit edilmiştir. Her bir test alanı için ortalama %CV, %4,5 (Site 1), %5,9 (Site 2) ve %7,3 (Site 3) olarak belirlenmiştir. Toplamda, siteler arası %CV, 5 reaktif örneğin tamamı için %5,9 olarak tespit edilmiştir. %10'un altındaki değişken değerlerin yüzde katsayısı mükemmel olarak değerlendirilmiştir.

Teknik Bilgiler

Şüpheli Sonuçlar

Şüpheli sonuçlar test edilen kişinin immün durumuyla ilgili olabileceği gibi, bir dizi teknik faktöre de bağlı olabilir:

- 37°C'deki kan alma ile inkübasyon arası sürenin 16 saatten fazla olması.
- Kanın önerilen sıcaklık aralığı (17°C ila 27°C) dışında saklanması.
- Kan alma tüplerinin yeterince çalkalanmaması.

Kan örneklerinin alınması veya kullanılmasında teknik sorunlardan şüpheleniliyorsa, QF-CMV testinin tamamı yeni kan numuneleri ile tekrarlanmalıdır. Stimüle edilen plazmaların ELISA testinin tekrarlanması, ELISA testinde herhangi bir prosedür sapmasından şüphelenilmediği takdirde yapılabilir. Şüpheli sonuçların (düşük Mitojen değerleri) ELISA testinde bir hata olmadığı sürece tekrarlama sırasında da değişmesi beklenemez.

Sorun Giderme Kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu ortaya çıkabilecek sorunların çözümünde yardımcı olabilir. Daha fazla bilgi için, aşağıdaki adreste verilen Teknik Bilgilere başvurabilirsiniz: www.QuantiFERON.com. İletişim bilgileri için bkz. sayfa 27 ve arka kapak.

ELISA sorun giderme

Standartların Düşük Optik Dansite Okumaları

Olası neden	Çözüm
a) Standartların dilüsyon hatası	Kit standardının prospektüste anlatıldığı şekilde hazırlandığından emin olun.
b) Pipetleme hatası	Pipetlerin üreticilerinin belirttiği gibi kalibre edildiğinden ve kullanıldığından emin olun.
c) İnkübasyon sıcaklığının çok düşük olması	ELISA'nın inkübasyonu oda sıcaklığında (17°C ila 27°C'de) yapılmalıdır.
d) İnkübasyon süresinin çok kısa olması	Plakanın konjugat, standartlar ve numuneler ile inkübasyonu 120 ± 5 dakika olmalıdır. Enzim Substrat Solüsyonu plakta 30 dakika inkübe edilmelidir.
e) Hatalı plak okuyucu filtresi kullanılması	Plaka ana filtre olarak 450 nm'de, referans filtre olarak da 620 ila 650 nm arasında okunmalıdır.
f) Reaktiflerin çok soğuk olması	Konjugat 100X Konsantre hariç, tüm reaktifler, teste başlamadan önce mutlaka oda sıcaklığına getirilmelidir. Bu işlem yaklaşık 1 saat sürer.
g) Kitin/bileşenlerin son kullanma tarihinin geçmesi	Kullanılan kitin son kullanma tarihinin geçmediğinden emin olun. Çözülen Standardın ve Konjugat 100X Konsantrenin çözüldüğü tarihten sonraki 3 ay için kullanıldığından emin olun.

Belirgin olmayan renk kullanımı / yüksek arkaplan

Olası neden	Çözüm
a) Yetersiz plaka yıkaması	Plağı en az 6 kez 400 µl/kuyu yıkama solüsyonu ile yıkayın. Kullanılan yıkayıcıya bağlı olarak 6 yıkamadan fazlası gerekli olabilir. Her yıkama adımı arasında en az 5 saniye bekleme periyodu olmalıdır.
b) İnkübasyon sıcaklığının çok yüksek olması	ELISA'nın inkübasyonu oda sıcaklığında (17°C ila 27°C) yapılmalıdır.
c) Kitin/bileşenlerin son kullanma tarihinin geçmesi	Kullanılan kitin son kullanma tarihinin geçmediğinden emin olun. Çözülen Standardın ve Konjugat 100X Konsantrenin çözüldüğü tarihten sonraki üç ay için kullanıldığından emin olun.
d) Enzim Substrat Solüsyonunun kontamine olması	Mavi renklenme mevcutsa substratı kullanmayın. Temiz reaktif kapları kullanıldığından emin olun.
e) Toplama öncesinde santrifüj tüplerinde plazma karışımı	Plazma örneklerinin aşağı yukarı pipetleme yapılmadan, üst jelden materyali bozmamaya dikkat edilerek toplandığından emin olun.

Kaynakça

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).

Teknik Servis

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

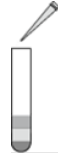
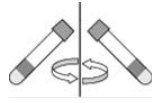
Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır.

Kısaltılmış Test Prosedürü

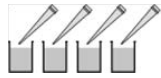
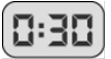
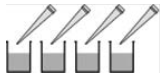
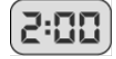
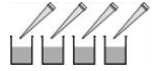
1. Aşama — kan inkübasyonu

1. Hastanın kanını kan alma tüplerine alın ve duvardaki antijenleri iyice çözmek için tüplerin tüm iç yüzeyinin kanla kaplandığından emin olacak şekilde, on (10) kez yavaş bir şekilde çalkalayın.
2. Tüpleri dik olarak $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 16 ila 24 saat süresince inkübe edin.
3. İnkübasyondan sonra, plazma ve eritrositlerin ayrılması için 15 dakika, 2000 ila 3000 RCF'de (g) santrifüj edin.
4. Santrifüj yaptıktan sonra, plazmayı almadan önce aşağı ve yukarı doğru pipetleme yapmaktan veya herhangi bir yolla plazmayı karıştırmaktan kaçının. İşlemin her aşamasında, jel üzerindeki materyali bozmamaya dikkat edin.



2. Aşama — IFN- γ ELISA

1. Konjugat 100X Konsantre hariç, ELISA reaktiflerini çalışma sıcaklığına getirmek için, oda sıcaklığında en az 60 dakika bekletin.
2. Kit standardını 8,0 IU/ml olacak şekilde distile veya deiyonize su ile çözün. Dört (4) standart dilüsyonunu hazırlayın.
3. Dondurularak kurutulmuş Konjugat 100X Konsantre'yi distile veya deiyonize su ile çözün.
4. Çalışma konjugatını Yeşil Seyreltici ile hazırlayın ve her kuyuya 50 μl ekleyin.
5. İlgili kuyulara 50 μl test plazma örneği ve 50 μl standartları ekleyin. Çalkalayıcı kullanarak karıştırın.
6. Oda sıcaklığında 120 dakika inkübe edin.
7. Kuyuları en az 6 kez 400 μl /kuyu Yıkama Tamponu ile yıkayın.
8. Kuyulara 100 μl Enzim Substrat Solüsyonu ekleyin. Çalkalayıcı kullanarak karıştırın.
9. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edin.
10. Kuyulara 50 μl Enzim Durdurma Solüsyonu ekleyin. Çalkalayıcı kullanarak karıştırın.
11. Sonuçları 450 nm ana filtre ve 620 ila 650 nm referans filtre kullanarak okuyun.
12. Sonuçları analiz edin.



Ticari markalar: QIAGEN®, QuantiFERON® (QIAGEN Group); Microsoft®, Excel® (Microsoft).

QuantiFERON-CMV ELISA Kit için Sınırlı Lisans Anlaşması

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün yalnızca ürünle ve bu el kitabında verilen protokollere uygun olarak kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN bu Kit'in kapalı bileşenlerinin Ek Kitabında ve www.qiagen.com adresinden ulaşılabilen protokollerde belirtilenlerin dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez. www.qiagen.com. Bu ek protokollerden bazıları QIAGEN kullanıcıları tarafından QIAGEN kullanıcıları için sağlanmıştır. Bu protokoller QIAGEN tarafından kapsamlı şekilde denenmemiş veya optimize edilmemiştir. QIAGEN bu protokollerin üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Bu kitin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisine izin vermeyeceğini kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya kit ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans koşulları için bkz. www.qiagen.com.

© 2012 Cellestis, a QIAGEN Company, tüm hakları saklıdır.

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

E-mail: quantiferon@cellestis.com

