

Februari 2018

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Brosur Kemasan



Pengujian IFN- γ darah utuh untuk menghitung respons terhadap antigen peptida Cytomegalovirus pada manusia



Untuk penggunaan diagnostik in vitro



0350-0201



QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, AMERIKA SERIKAT +1-800-426-8157



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
JERMAN

1075110ID Rev. 01



www.QuantiFERON.com



Daftar Isi

Penggunaan yang Ditujukan	5
Ringkasan dan Penjelasan	5
Prinsip Prosedur.....	6
Waktu yang diperlukan untuk melakukan uji kadar	7
Materi yang Disediakan	8
Isi kit.....	8
Materi Diperlukan tetapi Tidak Tersedia	9
Peringatan dan Pencegahan	9
Informasi keselamatan	11
Penyimpanan dan Penanganan Reagen	12
Pengambilan dan Penanganan Spesimen	13
Prosedur	16
Tahap 1: Inkubasi darah dan pengambilan plasma.....	16
Tahap 2: QuantiFERON-CMV ELISA untuk IFN- γ manusia.....	17
Penghitungan dan Interpretasi Pengujian	22
Pembuatan kurva standar (jika QF-CMV Analysis Software tidak digunakan).....	22
Kendali mutu pengujian	23
Interpretasi Hasil.....	24
Batasan.....	25
Nilai yang Diharapkan	25
Karakteristik Kinerja.....	28
Kinerja klinis.....	28

Ambang batas uji kadar	29
Studi Klinis.....	29
Kekhususan	29
Sensitivitas.....	30
Studi yang menyoroti manfaat klinis	30
Pedoman konsensus internasional mengenai pengelolaan cytomegalovirus dalam transplantasi organ padat	35
Karakteristik Kinerja Uji Kadar	36
Informasi Teknis.....	38
Hasil tak pasti.....	38
Sampel plasma membeku.....	38
Panduan Pemecahan Masalah	39
Referensi.....	41
Simbol.....	43
Informasi Kontak.....	44
Ringkasan Prosedur Pengujian ELISA.....	45
Tahap 1: Inkubasi darah.....	45
Tahap 2: IFN- γ ELISA	45
Riwayat Revisi Buku Manual	48

Penggunaan yang Ditujukan

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) adalah uji kadar *in vitro* yang menggunakan koktail peptida yang menstimulasi protein cytomegalovirus (CMV) manusia yang merangsang sel pada darah utuh heparin. Pendeteksian interferon-gamma (IFN- γ) oleh enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (uji kadar imunosorben terangkai enzim) digunakan untuk menghitung respons *in vitro* terhadap antigen peptida tersebut terkait dengan kontrol imun infeksi CMV. Berkurangnya fungsi imun dapat dikaitkan dengan tumbuhnya penyakit CMV. Tujuan penggunaan QF-CMV adalah untuk memonitor kadar imunitas anti-CMV pada pasien.

QF-CMV bukan pengujian untuk menentukan infeksi CMV dan tidak boleh digunakan untuk meniadakan infeksi CMV.

Ringkasan dan Penjelasan

CMV adalah virus herpes yang menginfeksi antara 50–85% orang dewasa dalam suatu populasi. Hal ini merupakan komplikasi yang sering terjadi pada immunosupresi, terutama setelah transplantasi, dan dapat berkontribusi secara signifikan terhadap morbiditas dan mortalitas penerima transplantasi. Terapi immunosupresif terkini yang digunakan untuk mencegah penolakan organ yang ditransplantasi memiliki efek yang merugikan pada limfosit T dan respons imunitas seluler (cell-mediated immune - CMI), menyebabkan peningkatan kerentanan terhadap infeksi virus pasca-transplantasi. Pentingnya fungsi sel T dalam menekan replikasi CMV juga disorot dengan fakta bahwa limfosit T sitotoksik (CTLs) CD8⁺ khusus CMV dapat memberikan perlindungan terhadap patogenesis yang terkait dengan virus. Enumerasi CTLs CD8⁺ khusus CMV pada pasien immunosupresi dan produksi IFN- γ dapat meramalkan risiko perkembangan penyakit CMV. Produksi IFN- γ dapat menjadi pengganti fungsi untuk identifikasi CTLs khusus CMV.

QF-CMV adalah uji kadar untuk respons CMI terhadap antigen peptida yang menstimulasi protein CMV. Peptida CMV dirancang untuk menysasar sel T CD8⁺, termasuk haplotipe A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60, dan Cw6 (A30, B13) HLA Kelas I yang meliputi >98% populasi manusia. Pasien yang terinfeksi dengan CMV biasanya memiliki limfosit CD8⁺ dalam darahnya yang mengenali antigen ini. Proses pengenalan ini melibatkan generasi dan sekresi sitokin, IFN- γ . Pendeteksian dan penghitungan IFN- γ yang berikutnya membentuk dasar pengujian.

Prinsip Prosedur

Pengujian QF-CMV dilakukan dalam dua tahap. Pertama, darah utuh dimasukkan ke dalam masing-masing Tabung Penampung Darah QF-CMV yang terdiri atas tabung Kontrol Nil, tabung CMV Antigen, dan tabung Mitogen.

Tabung Mitogen digunakan dalam pengujian QF-CMV sebagai kontrol positif. Hal ini diperlukan terutama saat ada keraguan mengenai status imun pasien. Tabung Mitogen juga dapat berfungsi sebagai kontrol untuk penanganan dan inkubasi darah secara tepat.

Tabung harus diinkubasi pada suhu 37 °C sesegera mungkin, dan dalam kurun waktu 16 jam dari pengambilan darah. Setelah masa inkubasi selama 16–24 jam, tabung disentrifugasi, plasma disingkirkan, dan jumlah IFN- γ (IU/ml) dihitung oleh QF-CMV ELISA.

Jumlah IFN- γ dalam sampel plasma dari tabung Antigen CMV dan Mitogen terkadang dapat melebihi batas atas sebagian besar pembacaan ELISA, bahkan jika pasien mengalami immunosupresi sedang. Untuk hasil kualitatif, gunakan nilai yang dihitung untuk plasma murni. Untuk hasil kuantitatif, yaitu saat diperlukan nilai IU/ml aktual, sampel plasma harus diencerkan 1/10 dalam Pengencer Hijau dan dilakukan uji kadar dalam ELISA bersama dengan plasma murni.

Catatan: Untuk sampel yang berada di dalam rentang QF-CMV ELISA (yaitu hingga 10 IU/ml), hasil yang didapatkan dengan sampel plasma murni harus digunakan. Untuk konsentrasi IFN- γ tersebut, nilai yang didapatkan menggunakan pengenceran 1/10 sampel plasma dapat tidak akurat.

Suatu pengujian dianggap reaktif untuk sebuah respons IFN- γ saat tabung CMV Antigen mencatatkan nilai yang secara signifikan berada di atas nilai IU/ml IFN- γ pada tabung Nil. Sampel plasma yang distimulasi oleh Mitogen berguna sebagai kontrol positif IFN- γ untuk setiap spesimen yang diuji. Respons rendah terhadap Mitogen mengindikasikan hasil yang tidak pasti ketika sampel darah juga memiliki respons nonreaktif terhadap antigen CMV. Pola ini dapat terjadi dengan limfosit yang tidak memadai, aktivitas limfosit yang berkurang akibat penanganan spesimen yang tidak tepat, pengisian/pencampuran tabung Mitogen yang tidak tepat, atau ketidakmampuan limfosit pasien untuk menghasilkan IFN- γ – seperti pada pasien yang baru saja menjalani transplantasi. Sampel Nil mengukur IFN- γ latar belakang atau nonspesifik dalam sampel darah. Kadar IFN- γ pada tabung Nil dikurangi dari kadar IFN- γ untuk tabung CMV Antigen dan tabung Mitogen (lihat “Interpretasi Hasil” di halaman 24 pada Brosur Kemasan ini untuk ringkasan mengenai cara hasil QF-CMV diinterpretasi).

Waktu yang diperlukan untuk melakukan uji kadar

Perkiraan waktu yang diperlukan untuk melakukan uji kadar QF-CMV adalah sebagai berikut; waktu pengujian beberapa sampel dalam batch juga tertera:

inkubasi 37 °C tabung darah:	16–24 jam
ELISA:	Sekitar 3 jam untuk satu pelat ELISA
	Kurang dari 1 jam kerja
	Tambahkan 10–15 menit untuk masing-masing pelat tambahan

Materi yang Disediakan

Isi kit

Tabung Penampung Darah (Pak Pasien Tunggal)	
No. katalog	0192-0301
Jumlah penyiapan	1
Kontrol QuantiFERON Nil (tutup abu-abu)	1 tabung
QuantiFERON CMV Antigen (tutup biru)	1 tabung
QuantiFERON Mitogen Control (tutup ungu)	1 tabung
Brosur Kemasan QF-CMV Blood Collection Tubes	1

QuantiFERON-CMV ELISA	Kit ELISA 2 Pelat
No. katalog	0350-0201
Microplate strips (strip pelat mikro) (12 x 8 sumuran) dilapisi dengan antibodi monoklonal IFN- γ anti-manusia tikus	2 set strip pelat mikro 12 x 8 sumuran
Human IFN- γ Standard (Standar IFN- γ Manusia), terliofilisasi (mengandung rekombinan IFN- γ manusia, kasein sapi, 0,01% w/v Thimerosal)	1 x vial (8 IU/ml saat dilarutkan)
Green Diluent (Pengencer Hijau) (mengandung kasein sapi, serum tikus normal, 0,01% w/v Thimerosal)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate (Konjugat 100x Konsentrat), terliofilisasi (HRP IFN- γ anti-manusia pada tikus, mengandung 0,01% w/v Thimerosal)	1 x 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (Dapar Pencuci 20x Konsentrat) (pH 7,2, mengandung 0,05% v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Larutan Substrat Enzim) (mengandung H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' Tetrametilbenzindin)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Larutan Penghenti Enzim) (mengandung 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
Brosur Kemasan QF-CMV ELISA	1

* Mengandung asam sulfur. Lihat halaman 9 untuk pencegahan.

Materi Diperlukan tetapi Tidak Tersedia

Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi selengkapnya, baca lembar data keselamatan (safety data sheet/SDS) yang sesuai, tersedia dari pemasok produk.

- Inkubator 37 °C; CO₂ tidak diperlukan
- Pipet variabel volume terkalibrasi untuk pemuatan 10–1000 µl dengan ujung sekali pakai
- Pipet multisaluran terkalibrasi mampu memuat 50 dan 100 µl dengan ujung sekali pakai
- Pengocok pelat mikro
- Air deionisasi atau air distilasi, 2 liter
- Pencuci pelat mikro (dianjurkan pencuci otomatis)
- Pembaca pelat mikro yang dipasang filter 450 nm dan filter referensi 620 nm hingga 650 nm

Peringatan dan Pencegahan

Untuk penggunaan diagnostik in vitro

Saat bekerja dengan bahan kimia, selalu kenakan jas lab yang sesuai, sarung tangan sekali pakai, dan kacamata pelindung. Untuk informasi lebih lanjut, silakan lihat lembar data keamanan yang sesuai (safety data sheets, SDS). Panduan tersedia online dalam format PDF yang mudah dan praktis di www.qiagen.com/safety. Di sana Anda dapat menemukan, melihat, dan mencetak SDS untuk setiap kit dan komponen kit QIAGEN®.

PERHATIAN



Tangani darah manusia seolah-olah darah tersebut berpotensi menularkan penyakit. Perhatikan pedoman yang relevan tentang menangani darah.

Pernyataan bahaya dan pencegahan berikut ini berlaku untuk komponen-komponen QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Mengandung asam sulfur. Peringatan! Dapat bersifat korosif pada logam. Menyebabkan iritasi kulit. Menyebabkan iritasi serius pada mata. Kenakan kacamata pelindung/pakaian pelindung/pelindung mata/pelindung wajah.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Peringatan! Menyebabkan iritasi ringan pada kulit. Kenakan kacamata pelindung/pakaian pelindung/pelindung mata/pelindung wajah.

QuantiFERON Green Diluent



Mengandung trinitrium 5-hidroksi-1-(4-sulfofenil)-4-(4-sulfofenilazo)pirazol-3-karboksilat. Mengandung tartrazina. Peringatan! Dapat menyebabkan reaksi alergi kulit. Kenakan kacamata pelindung/pakaian pelindung/pelindung mata/pelindung wajah.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Mengandung: ProClin 300. Berbahaya bagi kehidupan air dengan efek jangka panjang. Hindari pelepasan ke lingkungan.

Informasi keselamatan

Informasi lebih lanjut

- Tindakan yang menyimpang dari Brosur Kemasan QF-CMV dapat memberikan hasil yang salah. Harap baca petunjuk dengan saksama sebelum menggunakan.
- Jangan gunakan kit jika ada botol reagen yang menunjukkan tanda-tanda kerusakan atau kebocoran sebelum digunakan.
- Penting: Cek vial sebelum digunakan. Jangan gunakan vial Konjugat atau IFN- γ Standar yang menunjukkan tanda-tanda kerusakan atau jika karet penyegel telah rusak. Jangan gunakan vial yang rusak. Lakukan tindakan pencegahan yang tepat untuk membuang vial secara aman. Saran: Gunakan penjepit vial untuk membuka vial Konjugat atau IFN- γ Standar untuk mengurangi risiko cedera dari gerigi logam pada tutup.
- Jangan mencampur atau menggunakan Strip Pelat Mikro, Standar IFN- γ Manusia, Pengencer Hijau, atau Konjugat 100x Konsentrat dari batch kit QF-CMV yang berbeda. Reagen lain (Dapar Pencuci 20x Konsentrat, Larutan Substrat Enzim, dan Larutan Penghenti Enzim) dapat dipertukarkan antar-kit, asalkan reagen berada dalam masa kedaluwarsa masing-masing dan rincian lot dicatat.
- Buang reagen dan sampel biologis yang tidak digunakan sesuai dengan regulasi setempat, negara, dan federal.
- Jangan gunakan kit QF-CMV Blood Collection Tubes atau QF-CMV ELISA setelah tanggal kedaluwarsa.
- Pastikan peralatan laboratorium seperti pencuci dan pembaca pelat telah dikalibrasi/divalidasi untuk penggunaan.

Penyimpanan dan Penanganan Reagen

Tabung penampung darah

- Simpan QF-CMV Blood Collection Tubes pada suhu 4–25 °C.
- QF-CMV Blood Collection Tubes harus berada pada suhu antara 17–25 °C pada saat diisi darah.
- Masa penyimpanan QF-CMV Blood Collection Tubes adalah selama maksimal 15 bulan setelah tanggal produksi, jika disimpan pada suhu 4–25 °C.

Reagen kit ELISA

- Simpan kit pada suhu 2–8 °C.
- Selalu jauhkan Larutan Substrat Enzim dari sinar matahari langsung.

Reagen yang tidak dilarutkan dan tidak digunakan

Untuk petunjuk cara melarutkan reagen, lihat “Tahap 2: QuantiFERON-CMV ELISA untuk IFN- γ manusia” (langkah 3 dan 5 di halaman 17 dan 19).

- Standar IFN- γ Manusia yang dilarutkan dapat disimpan hingga 3 bulan jika disimpan pada suhu 2–8 °C.
Catat tanggal proses pelarutan Standar IFN- γ Manusia.
- Setelah dilarutkan, Konjugat 100x Konsentrat yang tidak digunakan harus dikembalikan ke penyimpanan pada suhu 2–8 °C dan harus digunakan dalam kurun waktu 3 bulan.
Catat tanggal proses pelarutan konjugat.
- Konjugat berkekuatan kerja harus digunakan dalam kurun waktu 6 jam setelah disiapkan.
- Dapar Pencuci berkekuatan kerja dapat disimpan pada suhu ruang (22 °C \pm 5 °C) hingga 2 minggu.

Pengambilan dan Penanganan Spesimen

QF-CMV menggunakan tabung penampung darah berikut:

- Kontrol Nil (tutup abu-abu)
- CMV Antigen (tutup biru)
- Kontrol Mitogen (tutup ungu)

Antigen dikeringkan pada bagian dalam dinding tabung penampung darah, sehingga penting bahwa isi tabung dicampur secara menyeluruh dengan darah. Tabung harus dipindah ke inkubator bersuhu 37 °C sesegera mungkin dan dalam kurun waktu 16 jam setelah pengambilan darah.

Prosedur berikut harus dipatuhi untuk mendapatkan hasil yang optimal:

1. Ambil 1 ml darah dari setiap pasien melalui tusukan vena (venipuncture) langsung ke dalam masing-masing QF-CMV Blood Collection Tubes. Prosedur ini harus dilakukan oleh flebotomis terlatih.

QF-CMV Blood Collection Tubes dapat digunakan hingga ketinggian 810 meter.

Jika Anda menggunakan QF-CMV Blood Collection Tubes pada ketinggian lebih dari 810 meter, atau jika volume pengambilan darah terlalu rendah, darah dapat diambil menggunakan alat suntik, dan langsung pindahkan 1 ml darah ke ketiga tabung. Untuk alasan keselamatan, hal ini sebaiknya dilakukan dengan melepas jarum suntik, memastikan prosedur keselamatan yang tepat, melepas tutup dari ketiga QF-CMV Blood Collection Tubes, dan menambahkan 1 ml darah ke masing-masing tabung (hingga tanda hitam di sisi label tabung). Pasang kembali tutup dengan aman dan campur seperti yang dijelaskan di bawah ini. Karena tabung 1 ml mengalirkan darah dengan cukup pelan, tahan tabung pada jarum selama 2–3 detik setelah tabung tampak selesai terisi guna menjamin perolehan volume yang tepat.

Tanda hitam di sisi tabung menandakan volume pengisian 1 ml. QF-CMV Blood Collection Tubes telah divalidasi untuk rentang volume dari 0,8 hingga 1,2 ml. Jika level darah di salah satu tabung tidak mendekati tanda indikator, sampel darah baru harus diambil.

Jika jarum suntik kupu-kupu digunakan untuk mengambil darah, tabung "pembuangan" harus digunakan untuk memastikan bahwa tabung dipenuhi dengan darah sebelum QF-CMV Blood Collection Tubes digunakan.

Sebagai alternatif, darah dapat diambil dalam tabung penampung darah generik tunggal yang mengandung litium heparin sebagai antikoagulan lalu dipindahkan ke QF-CMV Blood Collection Tubes. Hanya gunakan litium heparin sebagai antikoagulan darah karena antikoagulan lain bertentangan dengan uji kadar. Isi tabung penampung darah (volume minimum 5 ml) dan campur perlahan dengan menjungkirbalikkan tabung beberapa kali untuk melarutkan heparin. Prosedur ini harus dilakukan oleh flebotomis terlatih. Darah harus disimpan pada suhu ruang ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) sebelum dipindahkan ke QF-CMV Blood Collection Tubes untuk inkubasi, yang harus dilakukan dalam kurun waktu 16 jam dari pengambilan darah.

2. Segera setelah QF-CMV Blood Collection Tubes terisi, kocok tabung dengan cukup kuat sebanyak 10 kali untuk memastikan bahwa seluruh permukaan bagian dalam tabung terlapisi dengan darah guna melarutkan antigen pada dinding tabung.

Tabung harus disimpan pada suhu $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ saat pengisian darah.

Kocokan yang terlalu kuat dapat menyebabkan kerusakan gel dan dapat menyebabkan hasil yang menyimpang.

Jika darah ditampung dalam tabung litium heparin, sampel harus dicampur merata sebelum dipindahkan ke dalam QF-CMV Blood Collection Tubes. Pastikan bahwa darah tercampur secara menyeluruh dengan menjungkirbalikkan tabung secara perlahan tepat sebelum darah dikeluarkan. Keluarkan 1 ml alikuot (satu per QF-CMV Blood Collection Tubes) ke dalam tabung Nil, CMV Antigen, dan Mitogen. Proses ini harus dilakukan secara aseptik, memastikan prosedur keselamatan yang tepat, melepas tutup dari ketiga QF-CMV Blood Collection Tubes, dan menambahkan 1 ml darah ke masing-masing tabung

(hingga tanda hitam di sisi label tabung). Pasang kembali tutup dengan aman dan campur seperti yang dijelaskan di atas.

3. Labeli tabung dengan tepat.

Pastikan masing-masing tabung (Nil, CMV Antigen, Mitogen) dapat diidentifikasi melalui labelnya atau cara lain.

4. Setelah terisi, dikocok, dan dilabeli, tabung harus dipindahkan ke inkubator $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ sesegera mungkin, dan dalam kurun waktu 16 jam setelah pengambilan darah. Sebelum inkubasi, simpan tabung pada suhu ruang ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Jangan mendinginkan atau membekukan sampel darah.

Prosedur

Tahap 1: Inkubasi darah dan pengambilan plasma

1. Inkubasi tabung dalam posisi TEGAK LURUS pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 16–24 jam. Inkubator tidak memerlukan CO_2 atau humidifikasi.

Penting: Jika darah tidak langsung diinkubasi setelah diambil, campur kembali dengan menjungkirbalikkan tabung 10 kali sebelum inkubasi.

Setelah inkubasi, tabung penampung darah dapat disimpan pada suhu $4\text{--}27\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama hingga 3 hari sebelum sentrifugasi.

2. Setelah tabung diinkubasi pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pengambilan plasma dibantu dengan memusingkan tabung selama 15 menit pada 2000–3000 RCF (*g*). Gumpalan gel akan memisahkan sel dari plasma. Jika hal ini tidak terjadi, tabung harus disentrifugasi ulang.

Anda dapat mengambil plasma tanpa sentrifugasi, namun, diperlukan penanganan tambahan untuk memisahkan plasma tanpa mengganggu sel.

3. Setelah sentrifugasi, hindari menyedot dan mengeluarkan atau mencampur plasma dengan cara apa pun sebelum plasma diambil. Selalu berhati-hatilah untuk tidak mengganggu material pada permukaan gel.

Penting: Sampel plasma hanya boleh diambil menggunakan pipet.

Sampel plasma dapat dimuat langsung dari tabung penampung darah yang telah disentrifugasi ke dalam pelat QF-CMV ELISA, termasuk ketika stasiun kerja ELISA otomatis digunakan.

Sampel plasma dapat disimpan dalam QF-CMV Blood Collection Tubes yang telah disentrifugasi selama hingga 28 hari pada suhu $2\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ atau, jika diambil, di bawah $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (lebih baik kurang dari $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) untuk waktu yang lama.

Untuk sampel pengujian yang memadai, ambil setidaknya 150 μl plasma.

Tahap 2: QuantiFERON-CMV ELISA untuk IFN- γ manusia

Lihat "Isi kit", halaman 8 dan "Materi Diperlukan tetapi Tidak Tersedia", halaman 9, untuk material yang diperlukan untuk melakukan ELISA.

1. Semua sampel plasma dan reagen, kecuali Konjugat 100x Concentrate, harus dibawa ke suhu ruang ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) sebelum digunakan. Beri waktu setidaknya 60 menit untuk menyeimbangkan.
2. Lepas strip pelat ELISA yang tidak diperlukan dari rangka, segel kembali dalam kantong foil dan kembalikan ke lemari pendingin untuk disimpan hingga diperlukan.

Gunakan setidaknya satu strip untuk Standar QF-CMV ELISA dan strip yang cukup untuk jumlah pasien yang akan diuji. Setelah digunakan, simpan rangka dan penutup untuk digunakan dengan strip yang tersisa.

3. Larutkan Standar IFN- γ Manusia dengan volume air deionisasi atau air distilasi yang tertera pada label vial. Campur perlahan untuk mengurangi terbentuknya buih dan memastikan pelarutan ulang secara menyeluruh. Pelarutan Standar IFN- γ hingga ke volume yang tepat akan menghasilkan larutan dengan konsentrasi 8,0 IU/ml.

Catatan: Volume pelarutan Standar IFN- γ Manusia (standar kit) akan berbeda antar batch.

Dengan menggunakan standar yang dilarutkan, siapkan rangkaian pengenceran empat konsentrasi IFN- γ dalam Pengencer Hijau (Green Diluent - GD) (Gambar 1, halaman berikutnya). S1 (Standar 1) mengandung 4,0 IU/ml, S2 (Standar 2) mengandung 1,0 IU/ml, S3 (Standar 3) mengandung 0,25 IU/ml, dan S4 (Standar 4) mengandung 0 IU/ml (GD saja). Standar harus diuji kadar setidaknya rangkap dua. Siapkan pengenceran baru untuk standar kit untuk masing-masing sesi ELISA.

Tabel 1. Persiapan konjugat berkekuatan kerja

Jumlah strip	Volume Konjugat 100x Konsentrat	Volume Pengencer Hijau
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

5. Untuk sampel plasma yang diambil dari tabung penampung darah yang kemudian dibekukan atau disimpan selama lebih dari 24 jam sebelum uji kadar, campur secara menyeluruh sampel sebelum ditambahkan ke sumuran ELISA.

Penting: Jika sampel plasma harus ditambahkan secara langsung dari QF-CMV Blood Collection Tubes yang disentrifugasi, percampuran plasma harus dihindari. Selalu berhati-hatilah untuk tidak mengganggu material pada permukaan gel.

6. Jika diperlukan hasil kuantitatif, encerkan plasma CMV dan Mitogen 1/10 ke Pengencer Hijau (10 µl plasma + 90 µl GD). Plasma Nil tidak boleh diencerkan.

Dianjurkan untuk menguji sampel berikut secara paralel:

Nil, CMV Antigen, Mitogen, CMV Antigen (1/10), Mitogen (1/10)

Namun, opsi sampel pasien berikut juga didukung oleh Perangkat Lunak Analisis QuantiFERON-CMV:

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

7. Tambahkan 50 µl konjugat berkekuatan kerja yang baru disiapkan ke sumuran ELISA yang diperlukan menggunakan pipet multisaluran.
8. Tambahkan 50 µl sampel plasma pengujian ke sumuran yang sesuai. Kemudian, tambahkan 50 µl masing-masing Standar 1 hingga 4 ke sumuran yang sesuai. Standar harus diuji kadar setidaknya rangkap dua.
9. Tutup pelat ELISA dan campur konjugat dan sampel plasma/standar secara menyeluruh menggunakan pengocok pelat mikro selama 1 menit pada 500 hingga 1000 rpm. Hindari terjadinya percikan.
10. Tutup pelat ELISA dan inkubasi pada suhu ruang ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) selama 120 ± 5 menit. Pelat tidak boleh terpapar sinar matahari langsung selama proses inkubasi. Suhu yang menyimpang dari rentang suhu yang ditentukan dapat menyebabkan hasil yang salah.
11. Selama inkubasi, siapkan dapar pencuci berkekuatan kerja. Encerkan satu bagian Dapar Pencuci 20x Konsentrat dengan 19 bagian air deionisasi atau air distilasi dan campur secara menyeluruh. Dapar Pencuci 20x Konsentrat yang memadai telah disediakan untuk menyiapkan 2 liter dapar pencuci berkekuatan kerja.
12. Saat inkubasi pelat ELISA selesai, cuci sumuran dengan 400 µl dapar pencuci berkekuatan kerja selama setidaknya enam siklus. Disarankan untuk menggunakan pencuci pelat otomatis.

Penting: Pencucian secara menyeluruh sangat penting bagi kinerja uji kadar. Pastikan masing-masing sumuran terisi penuh dengan dapar pencuci hingga ke atas sumuran untuk setiap siklus pencucian. Disarankan untuk melakukan perendaman setidaknya selama 5 detik di antara setiap siklus.

Disinfektan laboratorium standar harus ditambahkan ke reservoir efluen, dan prosedur yang telah ditetapkan dipatuhi untuk dekontaminasi material yang berpotensi menular.
13. Ketuk pelat menghadap ke bawah ke handuk penyerap bebas serat untuk menghilangkan sisa dapar pencuci. Tambahkan 100 µl Larutan Substrat Enzim ke masing-masing sumuran, tutup pelat dengan penutup dan campur secara menyeluruh selama 1 menit pada 500 hingga 1000 rpm menggunakan pengocok pelat mikro.

14. Tutupi masing-masing pelat dan inkubasi pada suhu ruang ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) selama 30 menit.

Pelat tidak boleh terpapar sinar matahari langsung selama proses inkubasi.

15. Setelah inkubasi 30 menit, tambahkan 50 μl Larutan Penghenti Enzim ke masing-masing sumuran dalam urutan yang sama seperti ketika substrat ditambahkan, lalu campur secara menyeluruh pada 500 hingga 1000 rpm menggunakan pengocok pelat mikro.

16. Ukur nilai absorbansi (Optical Density, OD) masing-masing dalam kurun waktu 5 menit dari penghentian reaksi menggunakan pembaca pelat mikro yang dipasang filter 450 nm dan filter referensi 620 nm hingga 650 nm. Nilai OD digunakan untuk menghitung hasil.

Penghitungan dan Interpretasi Pengujian

QuantiFERON-CMV Analysis Software, untuk menganalisis data mentah dan penghitungan hasil, tersedia dari QIAGEN di www.QuantiFERON.com. Pastikan Anda menggunakan QF-CMV Analysis Software versi terbaru.

Perangkat lunak ini melakukan penilaian Kendali Mutu uji kadar, membuat kurva standar, dan memberikan hasil pengujian untuk masing-masing pasien seperti yang dijelaskan pada "Interpretasi Hasil" di halaman 24. Perangkat lunak melaporkan pengenceran terendah yang mengeluarkan hasil di dalam rentang QF-CMV ELISA, dengan memperhitungkan faktor pengenceran.

Sebagai alternatif dalam menggunakan QF-CMV Analysis Software, hasil dapat ditentukan menurut metode berikut.

Pembuatan kurva standar (jika QF-CMV Analysis Software tidak digunakan)

Tentukan nilai OD rata-rata dari ulangan Standar Kit pada masing-masing pelat.

Buat kurva standar $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ dengan menggambar $\log_{(e)}$ OD rata-rata (sumbu y) terhadap $\log_{(e)}$ konsentrasi IFN- γ standar dalam IU/ml (sumbu x), menghilangkan standar nol dari penghitungan ini. Hitung garis yang paling cocok untuk kurva standar dengan analisis regresi.

Gunakan kurva standar untuk menentukan konsentrasi IFN- γ (IU/ml) untuk masing-masing sampel plasma pengujian, menggunakan nilai OD masing-masing sampel.

Penghitungan ini dapat dilakukan menggunakan paket perangkat lunak yang tersedia dengan pembaca pelat mikro, dan spreadsheet standar atau perangkat lunak statistik (seperti Microsoft® Excel®). Dianjurkan untuk menggunakan paket ini untuk menghitung analisis regresi, koefisien variasi (%CV) untuk standar, koefisien korelasi (r) kurva standar.

Hasil yang dilaporkan harus diambil dari pengenceran terendah yang mengeluarkan hasil dalam rentang QF-CMV ELISA, pastikan faktor pengenceran diperhitungkan jika sesuai.

Kendali mutu pengujian

Akurasi hasil pengujian tergantung pada pembuatan kurva standar yang akurat. Oleh karena itu, hasil yang berasal dari standar harus diperiksa sebelum hasil sampel pengujian dapat diinterpretasi.

Agar ELISA valid:

- Nilai OD rata-rata untuk Standar 1 harus $\geq 0,600$.
- %CV untuk nilai OD ulangan Standar 1 dan Standar 2 harus $< 15\%$.
- Nilai OD ulangan untuk Standar 3 dan 4 tidak boleh berbeda lebih dari 0,040 unit absorbansi dari rata-ratanya.
- Koefisien korelasi (r) yang dihitung dari nilai absorbansi rata-rata standar harus $\geq 0,98$.

QF-CMV Analysis Software menghitung dan melaporkan parameter kendali mutu tersebut. Jika kriteria di atas tidak terpenuhi, pelaksanaan akan tidak valid dan harus diulang.

Nilai OD rata-rata untuk Standar Nol (Pengencer Hijau) harus $\leq 0,150$. Jika nilai OD rata-rata $> 0,150$, prosedur pencucian pelat harus diinvestigasi.

Interpretasi Hasil

Hasil QuantiFERON-CMV diinterpretasikan menggunakan kriteria dalam Tabel 2.

Tabel 2. Interpretasi hasil QuantiFERON-CMV

Nil (IU/ml)	CMV minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	Hasil QF-CMV	Laporan/Interpretasi
≤8,0	≥0,20 dan ≥25% Nil	Apa pun	Reaktif [†]	Imunitas anti-CMV terdeteksi
	<0,20 ATAU ≥0,20 dan <25% Nil	≥0,5	Nonreaktif	Imunitas anti-CMV TIDAK terdeteksi
		<0,5	Tidak pasti [‡]	Hasil tidak menentukan responsif CMV
>8,0 [§]	Apa pun	Apa pun	Tidak pasti [‡]	Hasil tidak menentukan responsif CMV

* Respons terhadap kontrol positif Mitogen (dan sesekali CMV antigen) biasanya dapat berada di luar rentang pembaca pelat mikro. Hal ini tidak berpengaruh pada hasil pengujian.

[†] Saat infeksi cytomegalovirus tidak dicurigai, mulanya hasil reaktif dapat dikonfirmasi dengan pengujian ulang sampel plasma asli dalam duplikat pada QF-CMV ELISA. Jika pengujian ulang salah satu atau kedua ulangan positif, masing-masing harus dianggap sebagai reaktif pengujian.

[‡] Lihat "Panduan Pemecahan Masalah" (halaman 39) untuk kemungkinan penyebab.

Dalam studi klinis (1), hasil tak pasti di antara pasien transplantasi organ padat, saat seorang donor reaktif untuk CMV tetapi kontrol Mitogen di bawah 0,5 IU/ml, telah terbukti relevan secara klinis. Pasien tersebut memiliki risiko tertinggi atas berkembangnya CMV.

[§] Dalam studi klinis, kurang dari 0,25% pasien memiliki kadar IFN- γ >8,0 IU/ml untuk nilai Nil.

Catatan: Kadar IFN- γ terukur harus digunakan berkaitan dengan gejala klinis, riwayat medis, dan evaluasi diagnostik lain saat menetapkan respons imun terhadap CMV antigen. QF-CMV bukan pengujian untuk menentukan infeksi CMV dan tidak boleh digunakan untuk meniadakan infeksi CMV.

Batasan

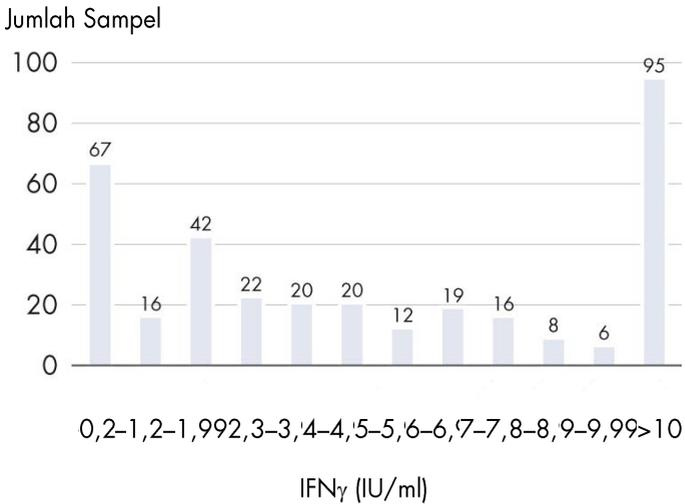
Hasil pengujian QuantiFERON-CMV harus digunakan berkaitan dengan riwayat epidemiologis, kondisi medis terkini, dan evaluasi diagnostik lain masing-masing pasien.

Hasil yang tidak dapat diandalkan atau tidak pasti dapat terjadi karena:

- Penyimpangan dari prosedur yang dijelaskan pada Brosur Kemasan QuantiFERON-CMV ELISA
- Kadar IFN- γ dalam tabung kontrol berlebih
- Lebih dari 16 jam antara pengambilan spesimen darah dengan inkubasi pada 37 °C.

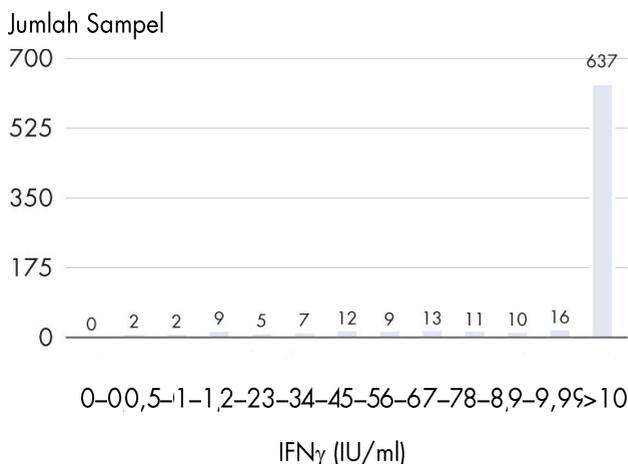
Nilai yang Diharapkan

Nilai IFN- γ yang diharapkan menggunakan QuantiFERON-CMV didapatkan dengan menguji 591 sampel dari pasien yang sehat. 343 sampel teruji seropositif dan 248 sampel teruji seronegatif terhadap CMV IgG. Status serologi CMV belum diketahui saat pengujian QF-CMV. Dalam 248 sampel pasien seronegatif CMV, 100% (248/248) sampel yang diuji nonreaktif pada QF-CMV ELISA menghasilkan respons IFN- γ <0,2 IU/ml ke tabung CMV Antigen (dikurangi Nil). Penyebaran respons IFN- γ terhadap tabung CMV Antigen (dikurangi Nil) untuk 343 pasien CMV seropositif terbukti (Gambar 2).



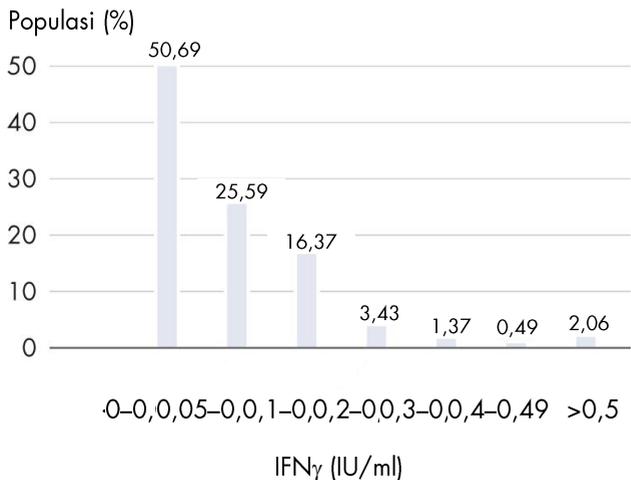
Gambar 2. Penyebaran respons QF-CMV IFN- γ (dikurangi Nil) pada pasien seropositif yang sehat (n = 343).

Penyebaran respons IFN- γ terhadap Mitogen (dikurangi Nil) ditentukan menggunakan 733 sampel dari pasien dewasa yang sehat menggunakan QF-CMV ELISA, terlepas dari serologi CMV IgG (Gambar 3). Hasil Mitogen (dikurangi Nil) yang kurang dari 0,5 IU/ml mengindikasikan kegagalan pengujian atau pasien mengalami gangguan sistem imun (immunocompromised). Dalam populasi yang sehat, hanya 2/733 hasil masuk dalam kategori ini.



Gambar 3. Penyebaran respons Mitogen-IFN- γ (dikurangi Nil) pada pasien yang sehat (n = 733).

Penyebaran respons IFN- γ terhadap tabung Nil ditentukan menggunakan 1020 sampel plasma dari pasien yang sehat menggunakan QF-CMV ELISA, terlepas dari serologi CMV IgG (Gambar 4).



Gambar 4. Penyebaran respons Nil IFN- γ pada pasien yang sehat (n = 1020) ditampilkan sebagai persentase populasi.

Karakteristik Kinerja

Kinerja klinis

Ambang batas pengujian untuk mendeteksi paparan CMV sebelumnya menggunakan QF-CMV ditentukan setelah analisis hasil dari sekelompok pasien yang sehat ($n = 223$) di mana hasil QF-CMV dibandingkan dengan hasil serologis CMV IgG. Analisis ROC menetapkan bahwa ambang batas pengujian 0,04 IU/ml (setelah pengurangan Nil) memberikan nilai prediktif positif dan negatif optimal untuk QF-CMV (area di bawah kurva = 0,9679 [95%CI: 0,9442–0,9915, $p < 0,0001$]), dengan demikian mewakili ambang batas di mana uji kadar ini berkinerja paling efektif sesuai dengan tujuan penggunaannya pada populasi yang sehat.

Kinerja uji kadar QF-CMV dibandingkan dengan pengujian serologi SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). Uji kadar QF-CMV menunjukkan 95% (294/310 orang) kesesuaian dengan pengujian serologi CMV IgG pada pasien yang sehat, serta tidak ada satu pun dari 149 donor seronegatif menunjukkan suatu reaktivitas pada QF-CMV. 145 dari 161 donor seropositif menunjukkan respons reaktif QF-CMV. Keseluruhan kesesuaian positif adalah 90% dengan nilai kesesuaian negatif sebesar 100%. Tingkat kesesuaian pada pasien yang sehat antara respons QF-CMV dan status serologi CMV IgG tertera di Tabel 3.

Tabel 3. Kesesuaian antara pengujian serologi QuantiFERON-CMV dan CMV IgG pada pasien yang sehat

		Serologi CMV		Total
		Positif	Negatif	
QuantiFERON-CMV	Reaktif	145	0	145 (46,8%)
	Nonreaktif	16	149	165 (53,2%)
	Total	161 (51,9%)	149 (48,1%)	310 (100%)

Ambang batas uji kadar

Ambang batas pengujian klinis yang dianjurkan untuk uji kadar ini adalah 0,2 IU/ml dalam tabung CMV Antigen (dikurangi Nil), walaupun ambang batas yang berbeda dapat divalidasi untuk pengaturan klinis yang berbeda.

Studi Klinis

Karena tidak ada standar pasti untuk mengonfirmasi atau meniadakan diagnosis infeksi cytomegalovirus, perkiraan sensitivitas dan kekhususan untuk QF-CMV tidak dapat dievaluasi secara praktis. Kekhususan dan sensitivitas QF-CMV dihitung dengan mengevaluasi tingkat kesesuaian antara respons QF-CMV dan status serologi CMV IgG pasien yang sehat.

Kekhususan QF-CMV dihitung dengan mengevaluasi nilai positif palsu (respons reaktif QF-CMV) pada sampel donor yang sehat tanpa adanya paparan CMV sebelumnya (pasien seronegatif CMV IgG). Sensitivitas dihitung dengan mengevaluasi responsif QF-CMV pada sampel donor yang sehat dengan adanya paparan CMV sebelumnya (pasien seropositif CMV IgG). QF-CMV menggunakan sejumlah besar epitop khusus CMV dari berbagai protein CMV, dengan demikian memberikan cakupan luas pada populasi dengan beragam haplotipe HLA Kelas I (sekitar 98% populasi). Karena haplotipe HLA pasien yang diuji terhadap serologi CMV belum diketahui, sebagian kecil pasien positif serologi diharapkan tidak responsif terhadap QF-CMV Blood Collection Tubes.

Kekhususan

Dalam sebuah studi 591 sampel dari pasien yang sehat, tidak ada hasil QF-CMV positif palsu terdeteksi pada pasien yang diuji seronegatif untuk CMV IgG, dengan 248/248 pengujian sampel nonreaktif pada QF-CMV ELISA dan negatif pada pengujian serologi CMV IgG. Oleh karena itu, hasil yang didapatkan menggunakan QF-CMV dan pengujian serologi CMV IgG menunjukkan kesesuaian 100%.

Di semua evaluasi kekhususan lain yang dilakukan pada penerima transplantasi organ padat (1–8), penerima transplantasi sel punca hematopoietik (9,10), dan pasien yang terinfeksi HIV (11), kesesuaian antara QF-CMV dan serologi CMV IgG juga menunjukkan hasil 100%.

Sensitivitas

Dalam sebuah studi yang dilakukan pada 343 sampel dari pasien yang sehat untuk menguji seropositif CMV IgG, tingkat kesesuaian antara hasil respons QF-CMV dan serologi CMV IgG adalah 80,5% dengan 276/343 pengujian sampel reaktif terhadap QF-CMV dan positif terhadap pengujian serologi CMV IgG. Ketidaksesuaian yang muncul dapat disebabkan oleh serologi CMV positif palsu, atau tidak adanya tipe HLA responsif pada pasien yang diuji.

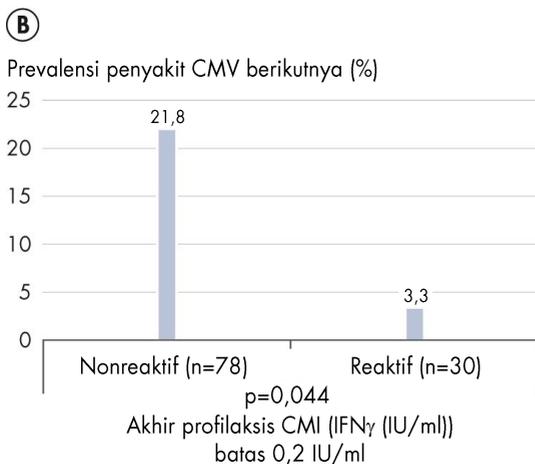
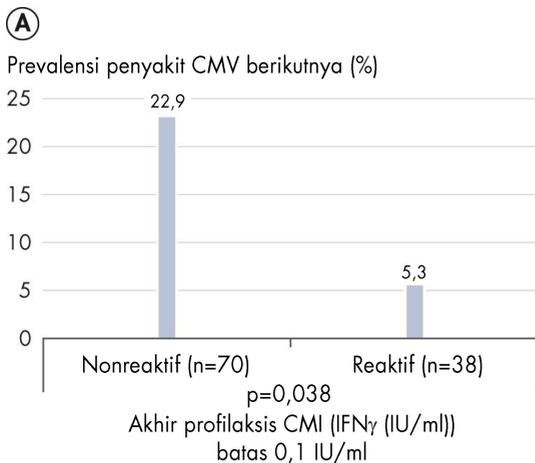
Tingkat kesesuaian pada evaluasi sensitivitas yang dilakukan pada penerima transplantasi organ padat (1–8), penerima transplantasi sel punca hematopoietik (9, 10), dan pasien yang terinfeksi HIV (11) telah terbukti lebih rendah dan dapat disebabkan oleh serologi CMV positif palsu, tidak adanya tipe HLA responsif pada pasien yang diuji, atau tidak adanya sel T reaktif pada pasien karena mengalami immunosupresi.

Studi yang menyoroti manfaat klinis

Baik serologi CMV IgG maupun QF-CMV menjelaskan tujuan penggunaannya sebagai pendeteksi imunitas terhadap CMV. Dalam bidang transplantasi, serologi CMV digunakan secara luas sebelum transplantasi untuk mengetahui risiko komplikasi CMV yang timbul pada penerima pasca-transplantasi, tetapi memiliki nilai terbatas pasca-transplantasi. Secara alternatif, QF-CMV dapat digunakan pada penerima transplantasi untuk mengukur tingkat imunitas CMV pada pasien yang memiliki risiko gejala infeksi dan/atau penyakit CMV yang berkembang akibat immunosupresi (12–15).

Sejumlah studi klinis yang telah dipublikasikan pada berbagai kelompok transplantasi telah menunjukkan manfaat QuantiFERON-CMV (1–11, 15, 16).

Dalam sebuah studi besar pada 108 penerima transplantasi organ padat (4), pasien dengan hasil QF-CMV reaktif pada akhir profilaksis anti-CMV memiliki angka penyakit CMV berikutnya yang lebih rendah secara signifikan (3,3% atau 1/30; menggunakan ambang batas 0,2 IU/ml) dibandingkan dengan pasien yang memiliki hasil QF-CMV nonreaktif (21,8% atau 17/78, $p = 0,044$) (Gambar 5).



Gambar 5. Nilai penyakit CMV onset lambat (late-onset) pada pasien dengan hasil QuantiFERON-CMV reaktif dibandingkan dengan hasil QuantiFERON-CMV nonreaktif di akhir profilaksis. Data berikut ini ditemukan di Kumar et al. (4).

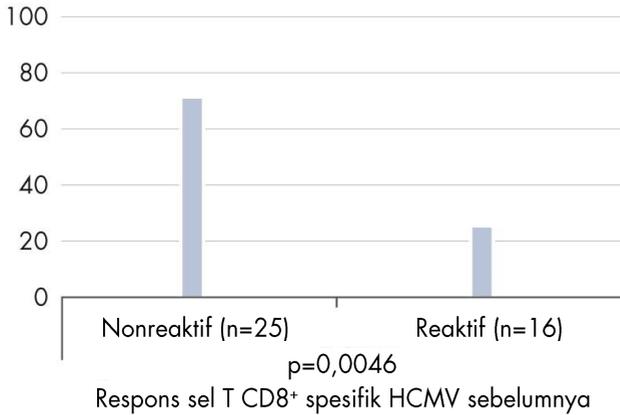
Selain itu, penerima transplantasi seronegatif CMV yang menerima organ dari donor positif CMV (D+R-) dengan hasil QF-CMV reaktif saat akhir profilaksis, sering kali tetap terbebas dari penyakit CMV dalam waktu yang lebih lama, menandakan bahwa QF-CMV dapat digunakan untuk mengidentifikasi pasien yang berisiko terhadap penyakit CMV onset lambat yang berkembang.

Studi ini juga menyoroti bahwa dalam kelompok pasien transplantasi berisiko tertinggi terhadap penyakit CMV (D+/R-) yang berkembang, sebuah hasil reaktif kapan pun pasca-profilaksis dikaitkan dengan peluang yang lebih tinggi untuk tetap terbebas dari penyakit CMV.

Dalam sebuah studi pada 37 pasien transplantasi organ padat (6), penilaian respons CMV spesifik sel-T CD8⁺ pada QF-CMV membantu prediksi pembersihan virus secara spontan dibandingkan dengan perkembangan penyakit CMV, setelah adanya peningkatan viremia CMV. Dalam studi ini, 24/26 pasien (92,3%) dengan hasil QF-CMV reaktif (menggunakan ambang batas pengujian IFN- γ $\geq 0,2$ IU/ml), secara spontan membersihkan virus CMV, sementara hanya 5/11 (45,5%) pasien dengan hasil QF-CMV nonreaktif memiliki hasil yang sama.

Sebuah studi pada 67 penerima transplantasi paru yang mengukur episode viremia CMV pasca-transplantasi (7), tampak bahwa 18/25 (72%) episode viremia CMV diawali dengan hasil QF-CMV nonreaktif, dibandingkan dengan 4/16 (25%) episode yang diawali dengan respons QF-CMV reaktif (pengujian tepat Fisher (Fisher's exact test)), $p = 0,0046$; (Gambar 6).

Episode DNAemia HCMV dengan muatan virus >1000 copies/ml (%)



Gambar 6. Analisis statistik respons sel T CD8⁺ spesifik CMV seperti yang terdeteksi pada QuantiFERON-CMV dan perkembangan viremia CMV (pengujian tepat Fisher, p=0,0046). Data berikut ini ditemukan di Weseslindner et al (7).

Dalam sebuah penelitian prospektif multipusat besar pada 127 donor seropositif CMV, pasien penerima transplantasi organ padat seronegatif CMV (8), semua yang menerima profilaksis antivirus menunjukkan bahwa pasien dengan hasil QF-CMV reaktif (menggunakan ambang batas pengujian 0,1 IU/ml) kapan pun setelah akhir profilaksis anti-CMV memiliki angka penyakit onset lambat yang lebih rendah secara signifikan 12 bulan pasca-transplantasi (6,4%), dibandingkan dengan pasien yang memiliki hasil QF-CMV nonreaktif (22,2%) dan hasil tak pasti (58,3%, p < 0,001). Saat mengklasifikasikan hasil tak pasti juga sebagai “nonreaktif”, kejadian penyakit CMV berikutnya adalah 6,4% vs. 26,8%, p = 0,024. Nilai prediktif positif dan negatif QF-CMV untuk perlindungan dari penyakit CMV masing-masing dilaporkan sebesar 0,90 (95% CI 0,74–0,98) dan 0,27 (95% CI 0,18–0,37). Studi ini menemukan bahwa QF-CMV dapat digunakan untuk memprediksi apakah pasien memiliki risiko rendah, sedang, atau tinggi terhadap perkembangan penyakit CMV berikutnya setelah profilaksis.

Dalam sebuah penelitian prospektif pada 55 penerima transplantasi organ padat (8) di mana hubungan antara hasil QF-CMV sebelum transplantasi dan episode ulangan CMV pasca-transplantasi dianalisis, ditemukan bahwa kejadian ulangan CMV pasca-transplantasi yang lebih tinggi tampak pada penerima seropositif CMV dengan hasil QF-CMV sebelum transplantasi nonreaktif (menggunakan ambang batas pengujian 0,2 IU/ml) (7/14 atau 50%), dibandingkan dengan penerima seropositif CMV dengan hasil QF-CMV sebelum transplantasi reaktif (4/30 atau 13,3%, $p = 0,021$).

Studi ini menemukan bahwa penerima dengan respons QF-CMV sebelum transplantasi nonreaktif yang menerima organ dari donor seropositif CMV, memiliki risiko peningkatan ulangan CMV sepuluh kali lipat dibandingkan dengan penerima dengan respons QF-CMV sebelum transplantasi reaktif (OR yang disesuaikan 10,49, 95% CI 1,88–58,46). Oleh karena itu, sebuah uji kadar QF-CMV sebelum transplantasi dapat digunakan untuk memprediksi risiko ulangan CMV setelah transplantasi, dan dengan demikian, memungkinkan individualisasi pengelolaan infeksi CMV setelah transplantasi organ padat.

Sejumlah studi lain yang meneliti pendeteksian respons sel T CD8⁺ khusus CMV pada QF-CMV dalam suatu kohort penerima transplantasi telah dilakukan (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) atau saat ini sedang berlangsung di seluruh dunia.

Pedoman konsensus internasional mengenai pengelolaan cytomegalovirus dalam transplantasi organ padat

Pentingnya pemantauan imun khusus CMV telah diketahui dan dipublikasikan dalam *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (12) (Pedoman Konsensus Internasional Terbaru Mengenai Pengelolaan Cytomegalovirus dalam Transplantasi Organ Padat). Pedoman internasional ini, yang dikembangkan oleh panel pakar CMV dan transplantasi organ padat, yang diselenggarakan oleh Departemen Penyakit Menular (The Infectious Diseases Section) dari Masyarakat Transplantasi (The Transplantation Society), menampilkan pedoman konsensus berbasis bukti dan opini para pakar mengenai pengelolaan CMV, termasuk: diagnostik, imunologi, pencegahan, dan pengobatan.

Pedoman ini menyimpulkan bahwa “Pemantauan imun pada respons sel T khusus CMV dapat memprediksi pasien yang berisiko terkena penyakit CMV pasca-transplantasi dan dapat digunakan dalam melaksanakan terapi profilaksis dan terapi pre-emptive” (12).

Selain itu, pedoman ini juga memberikan rekomendasi mengenai kualitas uji kadar pemantauan imun yang ideal, yang meliputi:

- Kemampuan untuk menilai kuantitas dan fungsi sel T CD4⁺ dan CD8⁺ penerima transplantasi
- Kemampuan untuk mengukur IFN- γ
- Mudah dilakukan, hemat, dan dapat digandakan
- Memiliki waktu penyelesaian yang sangat cepat
- Memungkinkan spesimen untuk diangkut dengan mudah ke laboratorium rujukan khusus

Secara kasatmata, QF-CMV memenuhi semua kriteria yang ditentukan oleh pedoman ini dan mewakili satu-satunya uji kadar pemantauan imun terstandarisasi yang mampu mendeteksi IFN- γ , khususnya untuk CMV.

Karakteristik Kinerja Uji Kadar

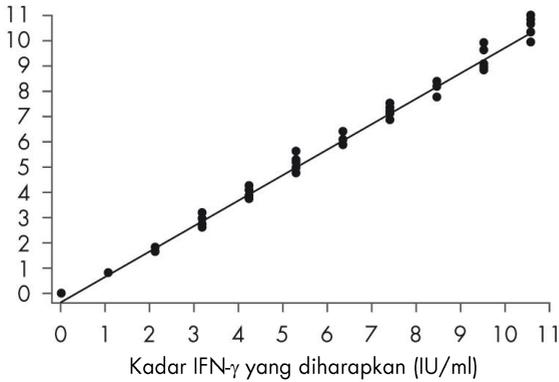
QF-CMV ELISA menggunakan rekombinan standar IFN- γ manusia, yang telah diuji kadar terhadap persiapan IFN- γ acuan (NIH Ref: Gxg01-902-535). Hasil untuk sampel pengujian dilaporkan dalam Satuan Internasional (SI) tergantung pada kurva standar yang disiapkan oleh pengujian pengenceran standar sekunder yang tersedia dengan kit.

Antibodi heterofil (mis. manusia anti-tikus) dalam serum atau plasma pasien tertentu diketahui menyebabkan gangguan pada immunoasai. Efek antibodi heterofil pada QF-CMV ELISA dikurangi dengan menambahkan serum tikus normal ke Pengencer Hijau dan menggunakan fragmen antibodi monoklonal F(ab')₂ sebagai antibodi penangkap IFN- γ yang dilapisi ke sumuran pelat mikro.

Batas pendeteksian QF-CMV ELISA adalah 0,065 IU/ml dan tidak ada bukti efek kait dosis tinggi (prozon) dengan konsentrasi IFN- γ hingga 10.000 IU/ml. Antibodi QF-CMV ELISA terbukti tidak bereaksi menyilang dengan sitokin apa pun yang diuji, termasuk IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10, dan IL12.

QF-CMV ELISA telah terbukti linear dengan meletakkan lima ulangan 11 kelompok plasma konsentrasi IFN- γ yang diketahui secara acak pada pelat ELISA. Garis regresi linear memiliki kemiringan $1,002 \pm 0,011$ dan koefisien korelasi 0,99 (Gambar 7).

Kadar IFN- γ yang ditentukan



Gambar 7. Profil linearitas QF-CMV ELISA ditentukan dari pengujian lima ulangan 11 sampel plasma konsentrasi IFN- γ yang diketahui.

Reproduktibilitas QF-CMV ELISA diperkirakan dengan menguji 20 sampel plasma dengan berbagai konsentrasi IFN- γ dalam tiga ulangan, di tiga laboratorium, dalam tiga hari tidak berurutan, oleh tiga operator. Dengan demikian, masing-masing sampel diuji 27 kali, dalam sembilan pelaksanaan uji kadar independen. Satu sampel merupakan kontrol Nil dan memiliki konsentrasi IFN- γ yang dihitung 0,08 (95% CI 0,07–0,09) IU/ml. Dari 19 sampel plasma sisa, rentang konsentrasinya adalah 0,33 (95% CI 0,31–0,34) hingga 7,7 IU/ml (95% CI 7,48–7,92).

Ketidaktepatan dalam rangkaian (within run) atau intra-uji kadar diperkirakan dengan merata-rata %CV untuk masing-masing plasma pengujian yang mengandung IFN- γ dari masing-masing pelat run ($n = 9$) dan berkisar dari 4,1 hingga 9,1%CV. Rata-rata dalam rangkaian %CV ($\pm 95\%$ CI) adalah 6,6% \pm 0,6%. Plasma IFN- γ nol rata-rata 14,1%CV.

Ketidaktepatan total atau antar-uji kadar ditentukan dengan membandingkan 27 konsentrasi IFN- γ yang dihitung untuk masing-masing sampel plasma dan berkisar dari 6,6 hingga 12,3%CV. Keseluruhan rata-rata %CV ($\pm 95\%$ CI) adalah 8,7% \pm 0,7%. Plasma IFN- γ nol menunjukkan 26,1%CV. Tingkat perbedaan ini diharapkan karena konsentrasi IFN- γ yang dihitung rendah dan variasi di sekitar estimasi konsentrasi yang rendah akan lebih besar dari yang berkonsentrasi lebih tinggi.

Informasi Teknis

Hasil tak pasti

Hasil tak pasti dapat terkait dengan kondisi imun pasien yang diuji, tetapi juga dapat terkait dengan sejumlah faktor teknis:

- Lebih dari 16 jam sejak pengambilan darah ke inkubasi pada suhu 37 °C
- Penyimpanan darah berada di luar rentang suhu yang dianjurkan (22 °C ± 5 °C)
- Pencampuran tabung penampung darah yang kurang memadai
- Pencucian pelat ELISA yang tidak selesai

Jika masalah teknis diduga ada pada pengambilan atau penanganan sampel darah, ulangi seluruh pengujian QF-CMV dengan spesimen darah baru. Pengulangan pengujian ELISA pada plasma yang distimulasi dapat dilakukan jika diduga ada perbedaan prosedural dengan pengujian ELISA. Hasil tak pasti (dari nilai Mitogen yang rendah) tidak diharapkan untuk berubah pada pengulangan, kecuali terdapat kesalahan pada pengujian ELISA.

Sampel plasma membeku

Jika gumpalan fibrin muncul dengan penyimpanan sampel plasma jangka panjang, sentrifugasi sampel untuk mengendapkan material gumpalan dan memudahkan pemipetan plasma.

Panduan Pemecahan Masalah

Panduan pemecahan masalah dapat membantu menyelesaikan masalah yang muncul. Untuk informasi lebih lanjut, lihat juga Informasi Teknis yang tersedia di www.QuantiFERON.com. Untuk informasi kontak, lihat sampul belakang.

Komentar dan saran

Pembacaan absorbansi rendah untuk standar

- | | |
|--|--|
| a) Kesalahan pengenceran standar | Pastikan pengenceran Standar Kit disiapkan dengan tepat menurut Brosur Kemasan QF-CMV ELISA. |
| b) Kesalahan pemipetan | Pastikan pipet dikalibrasi dan digunakan sesuai dengan petunjuk produsen. |
| c) Suhu inkubasi terlalu rendah | Inkubasi ELISA harus dilakukan pada suhu ruang ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| d) Waktu inkubasi terlalu singkat | Inkubasi pelat dengan konjugat, standar, dan sampel harus dilakukan selama 120 ± 5 menit. Larutan Substrat Enzim diinkubasi pada pelat selama 30 menit. |
| e) Filter pembaca pelat yang digunakan tidak tepat | Pelat harus dibaca pada filter 450 nm dengan filter referensi antara 620 dan 650 nm. |
| f) Reagen terlalu dingin | Semua reagen, dengan pengecualian Konjugat 100x Konsentrat, harus dibawa ke suhu ruang sebelum uji kadar dimulai. Hal ini memerlukan waktu sekitar 1 jam. |
| g) Kit/komponen kedaluwarsa | Pastikan bahwa kit digunakan sebelum tanggal kedaluwarsa. Pastikan Standar dan Konjugat 100x Konsentrat yang dilarutkan digunakan dalam kurun waktu 3 bulan setelah tanggal pelarutan. |

Perkembangan warna nonspesifik

- | | |
|---------------------------------------|--|
| a) Pencucian pelat yang tidak selesai | Cuci pelat setidaknya enam kali dengan 400 μl /sumuran dapar pencuci. Mungkin diperlukan lebih dari enam siklus pencucian, tergantung pada pencuci yang digunakan. Waktu perendaman selama setidaknya 5 detik antar-siklus harus digunakan. |
| b) Kontaminasi silang sumuran ELISA | Berhati-hatilah saat memipet dan mencampur sampel untuk mengurangi risiko. |
| c) Kit/komponen kedaluwarsa | Pastikan bahwa kit digunakan sebelum tanggal kedaluwarsa. Pastikan Standar dan Konjugat 100x Konsentrat yang dilarutkan digunakan dalam kurun waktu 3 bulan setelah tanggal pelarutan. |

Komentar dan saran

- | | |
|---|---|
| d) Larutan Substrat Enzim terkontaminasi | Buang substrat jika terdapat warna biru. Pastikan untuk menggunakan reservoir reagen yang bersih. |
| e) Pencampuran plasma dalam tabung sentrifugasi sebelum diambil | Pastikan sampel plasma diambil secara hati-hati dari atas gel tanpa menyedot dan mengeluarkannya, berhati-hatilah untuk tidak mengganggu material pada permukaan gel. |

Latar belakang tinggi

- | | |
|--|--|
| a) Pencucian pelat yang tidak selesai | Cuci pelat setidaknya enam kali dengan 400 µl/sumuran dapar pencuci. Mungkin diperlukan lebih dari enam siklus pencucian, tergantung pada pencuci yang digunakan. Waktu perendaman selama setidaknya 5 detik antar-siklus harus digunakan. |
| b) Suhu inkubasi terlalu tinggi | Inkubasi ELISA harus dilakukan pada suhu ruang ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| c) Kit/komponen kedaluwarsa | Pastikan bahwa kit digunakan sebelum tanggal kedaluwarsa. Pastikan standar dan Konjugat 100x Konsentrat yang dilarutkan digunakan dalam kurun waktu 3 bulan setelah tanggal pelarutan. |
| d) Larutan Substrat Enzim terkontaminasi | Buang substrat jika terdapat warna biru. Pastikan untuk menggunakan reservoir reagen yang bersih. |

Kurva standar nonlinear dan variabilitas ulangan

- | | |
|---|--|
| a) Pencucian pelat yang tidak selesai | Cuci pelat setidaknya enam kali dengan 400 µl/sumuran dapar pencuci. Mungkin diperlukan lebih dari enam siklus pencucian, tergantung pada pencuci yang digunakan. Waktu perendaman selama setidaknya 5 detik antar-siklus harus digunakan. |
| b) Kesalahan pengenceran standar | Pastikan pengenceran standar kit disiapkan dengan tepat menurut Brosur Kemasan. |
| c) Proses pencampuran yang kurang baik | Campur reagen secara menyeluruh dengan menjungkirbalikkan atau memusar perlahan sebelum ditambahkan ke pelat. |
| d) Teknik pipet yang tidak konsisten atau interupsi saat pengaturan uji kadar | Penambahan sampel dan standar harus dilakukan secara terus-menerus. Semua reagen harus disiapkan sebelum uji kadar dimulai. |

Informasi produk dan pedoman teknis tersedia gratis dari QIAGEN, via distributor Anda, atau dengan mengunjungi www.QuantiFERON.com.

Referensi

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

-
- interferon-producing CD8⁺ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 791.
11. Singh, K.P., et al. (2007) Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4⁺ T-cell recovery. *Clin. Immunol.* 124, 200.
 12. Kotton, C.N., et al. (2013) Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant.* 96, 333.
 13. Kotton, C.N. (2010) Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 711.
 14. Torre-Cisneros, J., et al. (2011). GESITRA-SEIMC/REIPI recommendations for the management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant patients. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29, 735.
 15. Giulieri, S., Manuel, O. (2011) QuantiFERON-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 11, 17.
 16. Crough, T., Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76.

Simbol

Simbol berikut mungkin tertera pada kemasan dan label:

Simbol	Definisi simbol
	Berisi reagen yang cukup untuk reaksi <N>
	Gunakan sebelum
	Tanda CE
	Perangkat medis diagnostik in vitro
	Nomor katalog
	Nomor lot
	Nomor materi
	Nomor Item Perdagangan Global
	Batas suhu
	Jangan digunakan kembali
	Jauhkan dari sinar matahari
	Baca petunjuk penggunaan
	Produsen
	Perwakilan resmi di Masyarakat Eropa

Informasi Kontak

Untuk bantuan teknis dan informasi lebih lanjut, silakan lihat Pusat Dukungan Teknis kami di www.qiagen.com/Support, hubungi 00800-22-44-6000, atau hubungi salah satu Departemen Layanan Teknis QIAGEN atau distributor lokal (lihat sampul belakang atau kunjungi www.qiagen.com).

Ringkasan Prosedur Pengujian ELISA

Tahap 1: Inkubasi darah

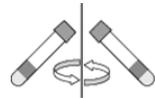
1. Ambil darah pasien ke dalam tabung penampung darah dan campur dengan mengocoknya sepuluh (10) kali dengan cukup kuat guna memastikan bahwa seluruh bagian dalam permukaan tabung telah terlapisi darah untuk melarutkan antigen pada dinding tabung.



2. Inkubasi tabung dalam posisi tegak lurus pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 16 hingga 24 jam.



3. Setelah inkubasi, sentrifugasi tabung selama 15 menit pada 2000–3000 RCF (g) untuk memisahkan plasma dan sel darah merah.



4. Setelah sentrifugasi, hindari menyedot dan mengeluarkan atau mencampur plasma dengan cara apa pun sebelum plasma diambil. Selalu berhati-hatilah untuk tidak mengganggu material pada permukaan gel.



Tahap 2: IFN- γ ELISA

1. Seimbangkan komponen ELISA, kecuali Konjugat 100x Konsentrat, ke suhu ruang selama setidaknya 60 menit.



2. Larutkan Standar Kit hingga 8,0 IU/ml dengan air distilasi atau air deionisasi. Siapkan empat (4) pengenceran standar.



3. Larutkan Konjugat 100x Konsentrat terliofilisasi dengan air distilasi atau air deionisasi.



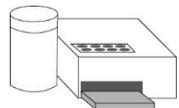
4. Siapkan konjugat berkekuatan kerja pada Pengencer Hijau dan tambahkan 50 µl ke semua sumuran.



5. Tambahkan 50 µl sampel plasma pengujian dan 50 µl standar ke sumuran yang sesuai. Campur menggunakan pengocok.



6. Inkubasi selama 120 menit pada suhu ruang.



7. Cuci sumuran setidaknya 6 kali dengan 400 µl/sumuran dapat pencuci.

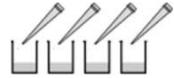


8. Tambahkan 100 µl Larutan Substrat Enzim ke sumuran. Campur menggunakan pengocok.

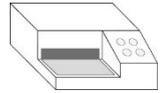


9. Inkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.

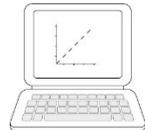
10. Tambahkan 50 μ l Larutan Penghenti Enzim ke semua sumuran.
Campur menggunakan pengocok.



11. Baca hasil pada 450 nm dengan filter referensi
620 hingga 650 nm



12. Analisis hasil.



Riwayat Revisi Buku Manual

Dokumen	Perubahan	Tanggal
L1075110-R5	Tambahan pada informasi keselamatan terkait vial yang rusak Pembaruan pada Tabel 2, Interpretasi hasil QF-CMV, halaman 24.	Februari 2018
L1075110-R5	Pembaruan informasi GHS, halaman 10.	Februari 2018

Halaman ini sengaja dikosongkan

Halaman ini sengaja dikosongkan

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

Perjanjian Lisensi Terbatas untuk QuantiFERON-CMV ELISA

Penggunaan produk ini menyatakan perjanjian pembeli atau pengguna produk dengan ketentuan berikut:

1. Produk hanya boleh digunakan sesuai dengan protokol yang disediakan bersama produk dan buku pegangan ini dan hanya digunakan dengan komponen yang terdapat di dalam panel saja. QIAGEN tidak memberikan lisensi apa pun berdasarkan kekayaan intelektualnya untuk menggunakan atau menggabungkan komponen yang tersedia dengan panel ini dengan komponen apa pun yang tidak termasuk dalam panel ini kecuali sebagaimana dijelaskan dalam protokol yang disediakan dengan produk, buku pegangan ini, dan protokol tambahan yang tersedia di www.qiagen.com. Beberapa protokol tambahan ini telah disediakan oleh pengguna QIAGEN bagi pengguna QIAGEN. Protokol-protokol tersebut belum diuji secara menyeluruh atau dioptimalkan oleh QIAGEN. QIAGEN tidak menggaransi atau menjamin bahwa protokol tersebut tidak melanggar hak-hak pihak ketiga.
2. Selain lisensi yang dinyatakan secara tegas, QIAGEN tidak membuat jaminan bahwa panel ini dan/atau penggunaannya tidak melanggar hak-hak pihak ketiga.
3. Panel ini serta komponennya dilisensikan untuk penggunaan satu kali dan tidak boleh digunakan kembali, diperbarui, atau dijual kembali.
4. QIAGEN secara khusus menyangkal segala lisensi lain, yang dinyatakan secara tegas maupun tersirat selain yang dinyatakan secara tegas di atas.
5. Pembeli dan pengguna panel setuju untuk tidak mengambil atau mengizinkan orang lain mengambil langkah apa pun yang dapat menyebabkan atau mendukung tindakan apa pun yang dilarang di atas. QIAGEN dapat memberlakukan larangan Perjanjian Lisensi Terbatas ini di Pengadilan mana pun, dan akan memulihkan semua biaya investigasi dan Pengadilannya, termasuk biaya pengacara, dalam tindakan apa pun untuk menegakkan Perjanjian Lisensi Terbatas ini atau hak kekayaan intelektualnya yang terkait dengan panel dan/atau komponennya.

Untuk ketentuan lisensi yang diperbarui, lihat www.qiagen.com.

Feb-18 © 2018 QIAGEN, hak cipta dilindungi undang-undang.

Pemesanan www.qiagen.com/shop | Dukungan Teknis support.qiagen.com | Situs Web www.qiagen.com