

2018 년 2 월

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

제품 첨부 설명서



사람 세포 사이토메갈로바이러스 펩티드 항원에 대한 반응을 측정하는 전혈 IFN- γ 검사

IVD 체외 진단용



REF 0350-0201



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

EC **REP** QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

1075110KO 개정 01 판



www.QuantiFERON.com



목차

용도.....	5
요약 및 설명.....	5
절차의 원리.....	6
분석항목을 수행하는 데 필요한 시간.....	7
제공되는 재료.....	8
키트 내용물.....	8
필요하지만 제공되지 않는 재료.....	9
경고 및 사전 주의사항.....	9
안전성 정보.....	11
시약 보관 및 취급.....	12
시료 수집 및 취급.....	13
절차.....	15
1 단계: 혈액 배양 및 혈장 수확.....	15
2 단계: 사람 IFN- γ 에 대한 QuantiFERON-CMV ELISA.....	16
계산 및 검사 해석.....	21
표준 곡선 작성(QF-CMV Analysis Software 를 사용하지 않는 경우).....	21
검사의 품질 관리.....	22
결과 해석.....	23
제한 사항.....	24
예상값.....	24
성능 특징.....	27
임상적 성능.....	27

분석항목 임계값	28
임상 연구	28
특이성	28
민감도	29
임상적 유용성을 강조하는 연구.....	29
고형 장기 이식에서 사이토메갈로바이러스 관리에 관한 국제적 합의 지침	34
분석항목 성능 특징	35
기술 정보	37
불확정적 결과	37
응고된 혈장 검체	37
문제 해결 가이드	38
참고 문헌	40
기호.....	42
연락처 정보.....	43
간략한 ELISA 검사 절차.....	44
1 단계: 혈액 배양	44
2 단계: IFN- γ ELISA.....	44
안내서 개정 이력	47

용도

QuantiFERON-CMV ELISA(QF-CMV)는 헤파린 처리된 전혈 내 세포를 자극하기 위해 사람 세포 사이토메갈로바이러스(CMV) 단백질을 시물레이션하는 펩티드 콕테일을 이용하는 체외 분석항목입니다. 효소결합면역흡착측정법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)에 의한 인터페론-감마(IFN- γ) 검출은 CMV 감염의 면역 조절에 관련된 이들 펩티드 항원에 대한 체외 반응을 정량화하는데 사용됩니다. 이 면역 기능의 손실은 CMV 질병 발생과 관련이 있을 수 있습니다. QF-CMV 의 용도는 환자의 항-CMV 면역성 수준을 모니터링하는 것입니다.

QF-CMV 는 CMV 감염을 판별하기 위한 검사가 아니므로 CMV 감염을 배제하기 위해 사용해서는 안 됩니다.

요약 및 설명

CMV 는 성인 인구의 50-85%가 감염되는 헤르페스 바이러스입니다. 이는 특히 이식 후 면역억제의 합병증으로 흔히 발생하며, 이식 수혜자의 이환률과 사망률에 현저하게 기여할 수 있습니다. 이식 장기의 거부반응을 방지하기 위해 현재 사용되는 면역억제 요법은 T 림프구 및 세포 매개 면역(Cell-Mediated Immune, CMI) 반응에 악영향을 끼쳐 이식 후 바이러스 감염에 대한 민감성을 증가시킵니다. 또한 CMV 복제 억제에 있어 T 세포 기능의 중요성은 CD8⁺ CMV 특이 세포독성 T 림프구(Cytotoxic T-Lymphocyte, CTL)로 바이러스 관련 발병기전으로부터 보호할 수 있다는 사실에 의해 강조됩니다. 면역억제 환자에서 CD8⁺ CMV 특이 CTL 의 계수 그리고 IFN- γ 생성은 CMV 질병 발생 위험에 대한 예측 인자가 될 수 있습니다. IFN- γ 생성은 CMV 특이 CTL 확인에 대한 기능적 대리 지표가 될 수 있습니다.

QF-CMV 는 CMV 단백질을 시뮬레이션하는 펩티드 항원에 대한 CMI 반응을 측정하는 분석항목입니다. CMV 펩티드는 인구의 >98%에 해당하는 A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 및 Cw6 (A30, B13) HLA 등급 I 일배체형을 포함하는 CD8⁺ T 세포를 표적으로 하도록 고안되었습니다. CMV 에 감염되는 개인은 대개 혈액 내에 이러한 항원을 인식하는 CD8⁺ 림프구가 있습니다. 이러한 인식 과정에는 사이토카인 IFN γ 의 생성 및 분비가 관련되어 있습니다. IFN γ 의 검출과 그 후의 정량화가 이 검사의 기준이 됩니다.

절차의 원리

QF-CMV 검사는 두 단계로 실시됩니다. 첫째, 각 QF-CMV Blood Collection Tube 에 전혈을 채취하며, 여기에는 Nil 대조군 튜브, CMV Antigen 튜브 및 Mitogen 튜브가 포함됩니다.

Mitogen 튜브는 QF-CMV 검사에서 양성 대조군으로 사용됩니다. 이는 개인의 면역 상태가 의심스러운 경우에 특히 필요합니다. Mitogen 튜브는 또한 올바른 혈액 취급 및 배양을 위한 대조물질 역할을 할 수도 있습니다.

이 튜브들은 가능한 한 빨리, 채혈 16 시간 이내에 37°C 에서 배양해야 합니다. 16-24 시간 배양 기간 후에 튜브를 원심분리하고, 혈장을 제거한 후, IFN γ 의 양(IU/ml)을 QF-CMV ELISA 로 측정합니다.

CMV Antigen 및 Mitogen 튜브의 혈장 검체 내 IFN γ 의 양은 흔히 대부분의 ELISA 리더의 상한보다 높을 수 있으며, 중등도로 면역억제 상태인 개인의 경우에도 그렇습니다. 정성적 결과의 경우, 무용매 혈장에 대해 계산된 값을 사용합니다. 실제 IU/ml 값이 필요한 정량적 결과의 경우, 혈장 검체를 그린 희석제로 1/10으로 희석한 후 무용매 혈장과 함께 ELISA 에서 분석해야 합니다.

참고: QF-CMV ELISA 범위 이내에 있는 검체의 경우(즉, 최대 10 IU/ml)에는 무용매 혈장 검체로 얻은 결과를 사용해야 합니다. 그러한 IFN γ 농도의 경우, 혈장 검체의 1/10 희석을 사용하여 얻은 값은 정확하지 않을 수 있습니다.

CMV Antigen 튜브 값이 Nil IFN- γ IU/ml 값을 훨씬 초과하는 경우, 검사는 IFN- γ 반응에 대해 반응성으로 간주됩니다. Mitogen 시뮬레이션 혈장 검체는 검사하는 각 시료에 대한 IFN- γ 양성 대조군 역할을 합니다. Mitogen 에 대한 낮은 반응은 혈액 검체 또한 CMV Antigen 에 무반응 반응을 보인 경우 불확정적인 결과를 나타냅니다. 이 양상은 불충분한 림프구, 잘못된 시료 취급으로 인한 림프구 활성 감소, 잘못된 Mitogen 튜브의 주입/혼합, 또는 환자 림프구의 IFN- γ 생성 불능(예: 최근 이식 환자의 경우)으로 인해 생길 수 있습니다. Nil 검체는 혈액 검체 내 비특이적 IFN- γ 또는 배경에 맞추어 조절됩니다. Nil 튜브의 IFN- γ 수치를 CMV Antigen 및 Mitogen 튜브에 대한 IFN- γ 수치로부터 뺍니다(QF-CMV 결과 해석 방법에 대한 설명은 본 제품 첨부 설명서 23 페이지의 "결과 해석" 를 참고하십시오).

분석항목을 수행하는 데 필요한 시간

QF-CMV 분석항목을 수행하는 데 필요한 시간은 다음과 같이 추정됩니다. 배치 처리한 경우 여러 검체에 대한 검사 시간 또한 표시되어 있습니다:

혈액 튜브의 37°C 배양:

16-24 시간

ELISA:

한 ELISA 플레이트에 대해 약 3 시간

1 시간 작업 미만

각 추가 플레이트에 대해 10-15 분 추가

제공되는 재료

키트 내용물

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
카탈로그 번호	0192-0301
준비 수	1
QuantiFERON Nil Control(회색 캡)	튜브 1 개
QuantiFERON CMV Antigen(파란색 캡)	튜브 1 개
QuantiFERON Mitogen Control(보라색 캡)	튜브 1 개
QF-CMV Blood Collection Tubes 제품 첨부 설명서	1

QuantiFERON-CMV ELISA	2-플레이트 키트 ELISA
카탈로그 번호	0350-0201
Microplate Strips(마이크로플레이트 스트립)쥐과 항-사람 IFN- γ 단일클론항체로 코팅한 마이크로플레이트 스트립(12 x 8 웰)	12 x 8 웰 마이크로플레이트 스트립 2 세트
Human IFN- γ Standard(동결건조된 사람 IFN- γ 표준)(재조합 사람 IFN- γ , 소 카제인, 0.01% w/v 티메로살 함유)	1 x 바이알 (재구성된 경우 8 IU/ml)
Green Diluent(그린 희석제)(소 카제인, 정상 쥐 혈청, 0.01% w/v 티메로살 함유)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate(동결건조된 접합체 100x 농축액)(쥐과 항-사람 IFN- γ HRP, 0.01% w/v 티메로살 함유)	1 x 0.3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate(세척 완충액 20x 농축액)(pH 7.2, 0.05% v/v ProClin® 300 함유)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution(효소 기질 용액)(H ₂ O ₂ , 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 함유)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution(효소 정지 용액)(0.5 M H ₂ SO ₄ 함유)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA 제품 첨부 설명서	1

* 내용물: 황산. 사전 주의사항은 9 페이지를 참조하십시오.

필요하지만 제공되지 않는 재료

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오.

- 37°C 배양기, CO₂ 필요하지 않음.
- 일회용 팁이 달린 10-1000 µl 를 전달하는 캘리브레이션된 가변형 피펫
- 일회용 팁이 달린 50 µl 및 100 µl 를 전달하는 캘리브레이션된 다채널 피펫
- 마이크로플레이트 셰이커
- 탈이온수 또는 증류수, 2 리터
- 마이크로플레이트 세척기(자동 세척기 권장)
- 450 nm 필터 및 620 nm-650 nm 기준 필터를 갖춘 마이크로플레이트 리더

경고 및 사전 주의사항

체외 진단용

화학물질로 작업할 때 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 적절한 안전 보건 자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오. 안전 보건 자료는 www.qiagen.com/safety 에서 적은 용량의 편리한 PDF 형식으로 제공되며, 여기에서 각 QIAGEN® 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS 를 검색해 보고 인쇄할 수 있습니다.



주의

인체 혈액은 감염 가능성이 있는 것으로 취급하십시오. 관련 혈액 취급 지침을 준수하십시오.

다음의 유해 및 예방조치 문구가 QuantiFERON-CMV ELISA 의 구성요소에 적용됩니다.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



내용물: 황산. 경고! 금속이 부식될 수 있습니다. 피부 자극을 일으킵니다. 심각한 눈 자극을 일으킵니다. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

경고! 약간의 피부 자극을 일으킵니다. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오.

QuantiFERON Green Diluent



내용물: trisodium 5-hydroxy-1-(4-sulphophenyl)-4-(4-sulphophenylazo)pyrazole-3-carboxylate. 내용물: 타트라진. 경고! 알레르기 피부 반응을 일으킬 수 있습니다. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

내용물: ProClin 300. 장기적인 영향으로 수생생물에게 유해함. 환경에 방출되지 않게 하십시오.

안전성 정보

기타 정보

- QF-CMV 제품 첨부 설명서 지침에서 이탈하면 잘못된 결과가 나올 수 있습니다. 사용 전에 주의 깊게 지침을 숙지하십시오.
- 사용 전에 시약 병에 손상 또는 누출 징후가 보이면 키트를 사용하지 마십시오.
- **중요:** 사용하기 전에 바이알을 점검하십시오. 손상 징후가 보이거나 고무 씬이 손상된 경우 접합체 또는 IFN- γ 표준액 바이알을 사용하지 마십시오. 깨진 바이알은 취급하지 마십시오. 적절한 안전 예방조치를 취하여 바이알을 안전하게 폐기하십시오.
권장 사항: 금속 크립프 캡으로 인한 부상을 최소화하려면 바이알 크립프 제거기를 사용하여 접합체, IFN- γ 표준액 바이알을 여십시오.
- 다른 QF-CMV 키트 배치의 마이크로플레이트 스트립, 사람 IFN- γ 표준액, 그린 희석제, 또는 접합체 100x 농축액을 혼합하거나 사용하지 마십시오. 다른 시약(세척 완충액 20x 농축액, 효소 기질 용액, 및 효소 정지 용액)은 키트 간에 서로 교환 가능합니다. 단, 시약이 유효 기간 이내이고 로트 세부 사항을 기록해야 합니다.
- 사용하지 않은 시약과 생물학적 검체는 지역, 국가 및 연방 규정에 따라 폐기하십시오.
- 유효 기간이 지난 QF-CMV Blood Collection Tubes 또는 QF-CMV ELISA 키트는 사용하지 마십시오.
- 플레이트 세척기 및 리더와 같은 실험실 장비가 용도에 맞게 캘리브레이션/검증되었음을 확인하십시오.

시약 보관 및 취급

채혈 튜브

- QF-CMV Blood Collection Tubes 는 4-25°C 에서 보관하십시오.
- 혈액 주입 시 QF-CMV Blood Collection Tubes 는 17-25°C 여야 합니다.
- QF-CMV Blood Collection Tubes 의 사용 기간은 4-25°C 에서 보관하는 경우 제조일로부터 최대 15 개월입니다.

ELISA 키트 시약

- 키트는 2-8°C 에서 보관하십시오.
- 항상 효소 기질 용액을 직사광선으로부터 차광 보호합니다.

재구성 및 미사용 시약

시약 재구성 방법에 대한 지침은 "2 단계: 사람 IFN- γ 에 대한 QuantiFERON-CMV ELISA"를 참조하십시오(16 및 18 페이지의 3 단계 및 5 단계).

- 재구성된 사람 IFN- γ 표준액은 2-8°C 에 보관할 경우 최대 3 개월간 보관할 수 있습니다.
사람 IFN- γ 표준액을 재구성한 날짜를 기록하십시오.
- 재구성한 후, 사용하지 않은 접합체 100x 농축액은 다시 2-8°C 에 보관해야 하며 3 개월 이내에 사용해야 합니다.
접합체를 재구성한 날짜를 기록합니다.
- 사용 강도 접합체는 준비한 후 6 시간 내에 사용해야 합니다.
- 사용 강도 세척 완충액은 실온(22°C \pm 5°C)에서 최대 2 주간 보관할 수 있습니다.

시료 수집 및 취급

QF-CMV 는 다음의 채혈 튜브를 사용합니다:

- Nil 대조군(회색 캡)
- CMV Antigen(파란색 캡)
- Mitogen 대조물질(보라색 캡)

항원이 채혈 튜브의 내벽에 건조되어 있으므로 튜브의 내용물을 혈액과 완전히 혼합하는 것이 중요합니다. 튜브는 가능한 한 빨리, 채혈 16 시간 이내에 37°C 에서 배양해야 합니다.

최적의 결과를 위해 다음 절차를 따라야 합니다:

1. 각 대상자에 대하여 각 QF-CMV Blood Collection Tubes 내에 직접 정맥천자로 1 ml 를 채혈합니다. 교육받은 정맥 채혈사가 이 과정을 수행해야 합니다.

QF-CMV Blood Collection Tubes 는 해발 810 m 의 고도에서까지 사용할 수 있습니다.

810 m 이상의 고도에서 QF-CMV Blood Collection Tubes 를 사용하거나, 채혈량이 적은 경우에는 주사기를 사용하여 채혈하고 1 ml 를 즉시 각각의 세 튜브에 옮길 수 있습니다. 안전상의 이유로 주사기 바늘을 제거하고, 적절한 안전 절차를 따르며, 세 QF-CMV Blood Collection Tubes 에서 캡을 제거하고, 각 튜브에 1 ml 의 혈액을 (튜브 라벨 측면의 검은색 표시 중앙까지) 추가하면 가장 잘 수행됩니다. 아래에 설명한 대로 캡을 안전하게 교체하고 혼합합니다. 1 ml 튜브에서 혈액을 비교적 서서히 끌어당기므로 일단 튜브에서 주입이 완료된 것으로 보이면 튜브를 바늘 위에 2-3 초간 유지하여 정확한 양을 채웁니다.

튜브 측면의 검은색 표시는 1 ml 충전량을 표시합니다. QF-CMV Blood Collection Tubes 는 0.8-1.2 ml 범위의 용량에 대해 검증되었습니다. 튜브 내 혈액 수치가 표시기의 표시선에 가깝지 않은 경우, 새 혈액 검체를 채취해야 합니다.

채혈을 위해 나비형 주사침을 사용하는 경우 QF-CMV Blood Collection Tubes 를 사용하기 전에 튜브에 혈액이 주입되도록 하기 위해 "퍼지" 튜브를 사용하십시오.

또는, 리튬 헤파린을 항응고제로 포함하는 유전자 채혈 튜브 1 개에 혈액을 채취한 다음 QF-CMV Blood Collection Tubes 로 옮길 수 있습니다. 다른 항응고제는 이 분석항목과 간섭 현상이 있기 때문에 리튬 헤파린만 항응고제로 사용해야 합니다. 채혈 튜브를 채우고(최소 용량 5 ml) 튜브를 여러 번 거꾸로 하여 부드럽게 혼합하여 헤파린을 용해시킵니다. 교육받은 정맥 채혈사가 이 과정을 수행해야 합니다. 혈액을 실온($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)으로 유지한 후에 배양을 위해 QF-CMV Blood Collection Tubes 로 전달해야 하며, 이는 반드시 채혈 16 시간 내에 시작되어야 합니다.

2. QF-CMV Blood Collection Tubes 에 채운 직후에 튜브의 내부 표면 전체가 혈액으로 덮이도록 확실하게 10 회 흔들어서 튜브 벽의 항원이 용해되도록 합니다.

혈액 주입 시 튜브는 $17^{\circ}\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 여야 합니다.

너무 심하게 흔들면 젤 분열이 일어나서 비정상적인 결과가 나올 수 있습니다.

리튬 헤파린 튜브에 채혈한 경우, 검체를 균일하게 혼합한 후에 QF-CMV Blood Collection Tubes 로 옮겨야 합니다. 옮기기 직전에 부드럽게 거꾸로 하여 혈액이 완전히 혼합되도록 합니다. 1 ml 분주액(QF-CMV Blood Collection Tubes 당 1 개)을 해당 Nil, CMV Antigen 및 Mitogen 튜브에 분주합니다. 이는 적절한 안전 절차에 따라 3 개의 QF-CMV Blood Collection Tubes 에서 캡을 제거하고, 각 튜브에 1 ml 의 혈액을 (튜브 라벨 측면의 검은색 표시선까지) 추가하여 무균 기법으로 수행해야 합니다. 위에서 설명한 대로 튜브 캡을 안전하게 교체하고 혼합합니다.

3. 튜브를 적절히 라벨 표기합니다.

각 튜브(Nil, CMV Antigen, Mitogen)가 라벨 또는 다른 수단에 의해 식별할 수 있도록 합니다.

4. 주입, 혼합 및 라벨 표기 후에 튜브는 채혈 16 시간 이내에 최대한 빨리 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 배양기로 옮겨야 합니다. 배양 이전에 튜브를 실온($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)으로 유지합니다. 혈액 검체를 냉장 또는 냉동시키지 마십시오.

절차

1 단계: 혈액 배양 및 혈장 수확

1. 튜브를 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 16-24 시간 동안 똑바로 세워 배양합니다. 배양기는 CO_2 또는 가슴이 필요하지 않습니다.

중요: 채혈 직후 배양하지 않는 경우, 배양 전에 튜브를 10 회 거꾸로 하여 다시 혼합하십시오.

배양한 후, 원심분리 전 최대 3 일간 채혈 튜브를 $4\text{--}27^{\circ}\text{C}$ 에서 보관할 수 있습니다.

2. 37°C 에서 튜브를 배양한 후, $2000\text{--}3000 \text{ RCF}(g)$ 에서 15 분간 튜브를 원심분리하여 혈장 수확을 용이하게 합니다. 겔 플러그는 혈장에서 세포를 분리합니다. 이러한 현상이 일어나지 않으면 튜브를 다시 원심분리해야 합니다.

원심분리하지 않고 혈장을 수확할 수 있지만 세포를 건드리지 않으면서 혈장을 제거하려면 추가적인 주의가 필요합니다.

3. 원심분리 후 수확 전에는 위아래로 피펫팅하거나 어떤 식으로든 혈장을 혼합하지 마십시오. 겔 표면의 물질을 교란시키지 않도록 항상 주의하십시오.

중요: 혈장 검체는 피펫을 사용해서만 수확해야 합니다.

자동화된 ELISA 워크스테인션을 사용하는 경우를 포함하여, 혈장 검체를 원심분리된 채혈 튜브에서 QF-CMV ELISA 플레이트로 직접 로드할 수 있습니다.

혈장 검체는 $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ 에서 최대 28 일간, 또는 수확한 경우 -20°C 미만(-70°C 미만 선호)에서 더 오랜 기간 동안 원심분리한 QF-CMV Blood Collection Tubes 에 보관할 수 있습니다.

충분한 검사 검체의 경우 최소 $150 \mu\text{l}$ 의 혈장을 수확하십시오.

2 단계: 사람 IFN- γ 에 대한 QuantiFERON-CMV ELISA

ELISA 수행에 필요한 재료는 8 페이지의 “키트 내용물” 및 9 페이지의 “필요하지만 제공되지 않는 재료”를 참조하십시오.

1. 접합체 100x 농축액을 제외한 모든 혈장 검체 및 시약은 사용 전에 실온($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)에 이르도록 해야 합니다. 실온이 되도록 최소 60 분간 둡니다.
2. 필요하지 않은 ELISA 플레이트 스트립을 프레임에서 꺼내고 포일 파우치로 재밀봉한 후, 필요할 때까지 냉장고에 다시 보관합니다.

QF-CMV ELISA 표준액에 대한 최소 1 개의 스트립 및 검사받는 환자 수에 충분한 스트립을 준비합니다. 사용 후에는, 나머지 스트립에 사용하도록 프레임과 뚜껑을 보관합니다.

3. 바이알 라벨에 표시한 탈염수 또는 증류수의 양으로 사람 IFN- γ 표준액을 재구성합니다. 거품 발생을 최소화하도록 부드럽게 혼합하여 완전히 다시 용해되도록 합니다. 올바른 용량으로 IFN- γ 표준액을 재구성하면 농도 8.0 IU/ml의 용액이 생성됩니다.

참고: 사람 IFN- γ 표준액(키트 표준액)의 재구성 용량은 배치별로 다릅니다.

재구성된 표준액을 사용하여 그린 희석제(Green Diluent, GD)로 4 개의 IFN- γ 농도로 된 희석액 시리즈를 준비합니다(다음 페이지의

그림 1). S1(표준액 1)은 4.0 IU/ml, S2(표준액 2)는 1.0 IU/ml, S3(표준액 3)은 0.25 IU/ml, S4(표준액 4)는 0.1 IU/ml(GD 단독)를 포함합니다. 표준액은 최소 2 회 반복 분석해야 합니다. 각 ELISA 세션에 대한 키트 표준액의 희석액을 새로 준비합니다.

2 회 반복 표준액에 대한 절차의 예

2 회 반복 표준액에 대한 절차의 예	
A	4 개 튜브에 라벨 표기합니다: S1, S2, S3, S4
B	GD 150 μ l 를 S1, S2, S3, S4 에 첨가합니다
C	키트 표준액 150 μ l 를 S1 에 첨가하고 완전히 혼합합니다
D	S1 에서 50 μ l 를 S2 로 옮긴 후 완전히 혼합합니다
E	S2 에서 50 μ l 를 S3 로 옮긴 후 완전히 혼합합니다
F	GD 단독은 영점 표준액(S4) 역할을 합니다

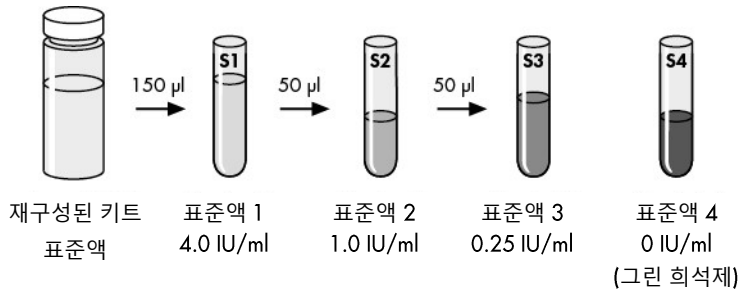


그림 1. 연속 희석에 의한 표준 곡선 준비.

4. 동결건조된 접합체 100x 농축액을 0.3 ml 의 탈이온수 또는 증류수로 재구성합니다. 거품 발생을 최소화하도록 부드럽게 혼합하여 접합체가 완전히 용해되도록 합니다.

재구성된 접합체 100x 농축액의 필요한 양을 그린 희석제로 희석하여 사용 강도 접합체를 준비합니다(다음 페이지의 표 1 참조).

완전히 혼합하되, 거품이 일지 않도록 부드럽게 혼합합니다.

사용한 후 바로, 사용하지 않은 100x 농축액은 2-8°C 에 다시 보관합니다.

그린 희석제만 사용합니다.

표 1. 사용 강도 접합체 준비

스트립 수	접합체 100x 농축액 용량	그린 희석제 용량
2	10 μ l	1.0 ml
3	15 μ l	1.5 ml
4	20 μ l	2.0 ml
5	25 μ l	2.5 ml
6	30 μ l	3.0 ml
7	35 μ l	3.5 ml
8	40 μ l	4.0 ml
9	45 μ l	4.5 ml
10	50 μ l	5.0 ml
11	55 μ l	5.5 ml
12	60 μ l	6.0 ml

5. 채혈 튜브에서 수확한 후 분석하기 전에 24 시간 이상 동결되거나 보관된 혈장 검체의 경우, ELISA 웰에 첨가하기 전에 철저히 혼합합니다.

중요: 혈장 검체를 원심분리된 QF-CMV Blood Collection Tubes 로부터 직접 추가할 경우 혈장이 혼합되지 않도록 해야 합니다. 겔 표면의 물질을 교란시키지 않도록 항상 주의하십시오.

6. 정량 결과가 필요한 경우, CMV 및 Mitogen 혈장을 그린 희석제로 1/10 으로 희석합니다(10 μ l 혈장 + 90 μ l GD). Nil 혈장은 희석하지 않습니다.

다음 검체를 병행하여 검사하는 것이 권장됩니다:

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

단, 다음 환자 검체 옵션 또한 QuantiFERON-CMV Analysis Software 에서 지원합니다.

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. 멀티채널 피펫을 이용하여 새로 준비한 사용 강도 접합체 50 μ l 를 필요한 ELISA 웰에 첨가합니다.
8. 50 μ l 의 검사 혈장 검체를 해당 웰에 첨가합니다. 마지막으로, 각 표준액 1-4 50 μ l 를 해당 웰에 첨가합니다. 표준액은 최소 2 회 반복 분석해야 합니다.
9. ELISA 플레이트 뚜껑을 덮고, 마이크로플레이트 셰이커를 사용하여 접합체와 혈장 검체/표준액을 500-1000 rpm 으로 1 분간 완전히 혼합합니다. 튀지 않도록 합니다.
10. ELISA 플레이트 뚜껑을 덮고 실온($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)에서 120 ± 5 분간 배양합니다.
배양 중 플레이트가 직사광선에 노출되어서는 안 됩니다. 지정된 온도 범위에서 이탈하면 잘못된 결과가 나올 수 있습니다.
11. 배양하는 동안, 사용 강도 세척 완충액을 준비합니다. 세척 완충액 20x 농축액과 탈이온수 또는 증류수를 1:19 로 희석하여 완전히 혼합합니다. 2 리터의 사용 강도 세척 완충액을 준비하기에 충분한 세척 완충액 20x 농축액이 제공되었습니다.
12. ELISA 플레이트 배양이 완료되면, 사용 강도 세척 완충액 400 μ l 로 최소 6 주기 동안 웰을 씻습니다. 자동 플레이트 세척기를 권장합니다.
중요: 분석항목의 성능을 위해 완전히 세척하는 것이 매우 중요합니다. 각 세척 주기마다 세척 완충액이 웰의 상단까지 충분히 채워졌는지 확인합니다. 각 주기 사이에 5 초 이상의 담금 기간을 둘 것을 권장합니다.
표준 검사실 소독제를 배출액 용기에 첨가하고 잠재적 감염성 물질의 오염 제거를 위해 확립된 절차를 따릅니다.
13. 흡수성, 보풀이 일지 않는 타올 위에 플레이트 면을 뒤집어 놓고 두드려서 남은 세척 완충액을 제거합니다. 효소 기질 용액 100 μ l 를 각 웰에 첨가하고 각 플레이트를 뚜껑으로 덮은 후 마이크로플레이트 셰이커를 사용하여 500-1000 rpm 에서 1 분간 완전히 혼합합니다.
14. 각 플레이트 뚜껑을 덮고 실온($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)에서 30 분간 배양합니다.
배양 중 플레이트가 직사광선에 노출되어서는 안 됩니다.
15. 30 분 배양 후, 기질이 첨가된 것과 같은 순서로 각 웰에 효소 정지 용액 50 μ l 를 첨가한 후 마이크로플레이트 셰이커를 사용하여 500-1000 rpm 에서 완전히 혼합합니다.

16. 450 nm 필터 및 620nm–650nm 기준 필터를 갖춘 마이크로플레이트 리더를 사용하여 반응 정지로부터 5 분 내에 각 웰의 광학 밀도(Optical Density, OD)를 측정합니다. OD 값을 사용하여 결과를 계산합니다.

계산 및 검사 해석

원시 데이터 분석항목과 결과 계산을 위해 QuantiFERON-CMV Analysis Software 를 QIAGEN에서 제공합니다(www.QuantiFERON.com). QF-CMV Analysis Software의 가장 최신 버전이 사용되는지 확인합니다.

23 페이지의 “결과 해석”에서 상세히 설명된 대로, 소프트웨어는 분석항목의 품질 관리 평가를 수행하고, 표준 곡선을 생성하며, 각 대상자에 대한 검사 결과를 제공합니다. 이 소프트웨어는 희석 배수를 감안하여 QF-CMV ELISA 범위 이내의 결과를 생성하는 최저 희석률을 보고합니다.

QF-CMV Analysis Software 사용의 대안으로 다음의 방법에 따라 결과를 판별할 수 있습니다.

표준 곡선 작성(QF-CMV Analysis Software 를 사용하지 않는 경우)

각 플레이트에서 키트 표준 복제물의 평균 OD 값을 판별합니다.

IU/ml 단위 표준액의 IFN- γ 농도의 $\log_{(e)}(x$ 축)에 대하여 평균 OD의 $\log_{(e)}(y$ 축) 그래프를 그려 $\log_{(e)}-\log_{(e)}$ 표준 곡선을 구성하되 이 계산에서 영점 표준액은 생략합니다. 회귀 분석으로 표준 곡선에 가장 적합한 선을 계산합니다.

각 검체의 OD 값을 이용하여 각 검사 혈장 검체에 대하여 IFN- γ 농도(IU/ml)를 판별하기 위해 표준 곡선을 이용합니다.

마이크로플레이트 리더, 표준 스프레드시트 또는 통계 소프트웨어(Microsoft® Excel® 등)와 함께 사용할 수 있는 소프트웨어 패키지를 이용하여 이러한 계산을 할 수 있습니다. 회귀 분석, 표준액에 대한 변동 계수(%CV) 및 표준 곡선의 상관 계수(r)를 계산하는 데 이 패키지를 사용할 것을 권장합니다.

보고된 결과는 QF-CMV ELISA 범위 이내의 결과를 생성하는 최저 희석률로부터 가져와서, 해당하는 경우 희석 배수를 고려해야 합니다.

검사의 품질 관리

검사 결과의 정확성은 정확한 표준 곡선의 생성에 달려 있습니다. 그러므로 검사 검체 결과를 해석하기 전에 표준액으로부터 나온 결과를 조사해야 합니다.

ELISA 가 유효하려면:

- 표준액 1 의 평균 OD 값이 ≥ 0.600 이어야 합니다.
- 표준액 1 및 표준액 2 복제물 OD 값에 대한 %CV 가 $\leq 15\%$ 여야 합니다.
- 표준액 3 및 표준액 4 에 대한 복제물 OD 값이 각 평균으로부터 0.040 광학 밀도 단위를 벗어나서는 안 됩니다.
- 표준액의 평균 흡광도 값에서 계산한 상관 계수(r)가 ≥ 0.98 이어야 합니다.

QF-CMV Analysis Software 는 이러한 품질 관리 매개변수를 계산하여 보고합니다. 위의 기준에 부합하지 않으면 실행이 유효하지 않아 다시 실행해야 합니다.

영점 표준액(그린 희석제)의 평균 OD 값은 ≤ 0.150 이어야 합니다. 평균 OD 값이 0.150 를 초과한 경우 플레이트 세척 절차를 조사해야 합니다.

결과 해석

QuantiferON-CMV 결과는 표 2 의 기준을 사용하여 해석합니다.

표 2. QuantiferON-CMV 결과 해석

Nil (IU/ml)	CMV - Nil (IU/ml)	Mitogen - Nil (IU/ml)	QF-CMV 결과	보고/해석
≤8.0	Nil ≥0.20 – ≥25%	임의 값	반응성 [†]	항-CMV 면역성 검출됨
	Nil <0.20 또는 ≥0.20 – <25%	≥0.5	무반응	항-CMV 면역성 검출되지 않음
		<0.5	불확정 [‡]	결과가 CMV 반응성에 대해 불확정적임
>8.0 [§]	임의 값	임의 값	불확정 [‡]	결과가 CMV 반응성에 대해 불확정적임

* Mitogen 양성 대조군(및 때때로 CMV 항원)에 대한 반응은 흔히 마이크로플레이트 리더 범위를 이탈할 수 있습니다. 이는 검사 결과에 영향을 미치지 않습니다.

† 사이토메갈로바이러스감염이 의심되지 않는 경우, 초기 반응성 결과는 QF-CMV ELISA 에서 원래 혈장 검체를 2 회 반복으로 다시 검사하여 확인할 수 있습니다. 1 개 또는 2 개 복제물에 대한 반복 검사가 양성인 경우, 개인은 검사 반응성으로 간주해야 합니다.

‡ 가능한 원인은 "문제 해결 가이드"(38 페이지)을 참조하십시오.

임상 연구(1)에서, 공여자가 CMV 에 대해 반응성이나 Mitogen 대조물질은 0.5 IU/ml 미만이었던 경우 고품 장기 이식 환자에서 관찰되는 불확정적 결과는 임상적으로 의미가 있는 것으로 나타났습니다. 그러한 환자들은 CMV 발생 위험이 가장 높습니다.

§ 임상 연구에서 0.25% 미만의 대상자가 Nil 값에 대해 >8.0 IU/ml 인 IFN-γ 수치를 보였습니다.

참고: CMV Antigen 에 대한 면역 반응을 확정할 때, 측정된 IFN-γ 수치는 임상적 발현, 병력, 그리고 기타 진단 평가와 함께 사용해야 합니다. QF-CMV 는 CMV 감염을 판별하기 위한 검사가 아니므로 CMV 감염을 배제하기 위해 사용해서는 안 됩니다.

제한 사항

QuantiFERON-CMV 검사 결과는 각 대상자의 역학적 이력, 현재 의학적 상태 및 기타 진단 평가와 연계하여 사용해야 합니다.

신뢰할 수 없거나 불확정적인 결과가 나올 수 있는 이유는 다음과 같습니다:

- QuantiFERON-CMV ELISA 제품 첨부 설명서에 설명된 절차로부터 이탈
- 대조물질 튜브 내 과도한 수치의 IFN- γ 존재
- 혈액 시료 채취부터 37°C 배양까지 16 시간 이상 걸림.

예상값

QuantiFERON-CMV 사용 시 예상되는 IFN- γ 값은 건강한 대상자로부터 얻은 591 개의 검체로부터 획득하였습니다. 검사 결과 343 개의 검체가 CMV IgG 에 대해 혈청 양성이었으며 248 개의 검체가 혈청 음성이었습니다. CMV 혈청학 상태는 QF-CMV 검사 시점에 알려지지 않았습니다. CMV 혈청 음성인 대상자에서 얻은 248 개 검체에서 검사한 검체의 100%(248/248)가 QF-CMV ELISA 검사 시 무반응이었으며, CMV Antigen 튜브에 대해 IFN- γ 반응이 <0.2 IU/ml 이었습니다(Nil 을 뺀 값). 343 명의 CMV 혈청 양성 대상자에 대한 CMV Antigen 튜브에 대한 IFN- γ 반응 분포(Nil 을 뺀 값)가 아래 나와 있습니다(그림 2).

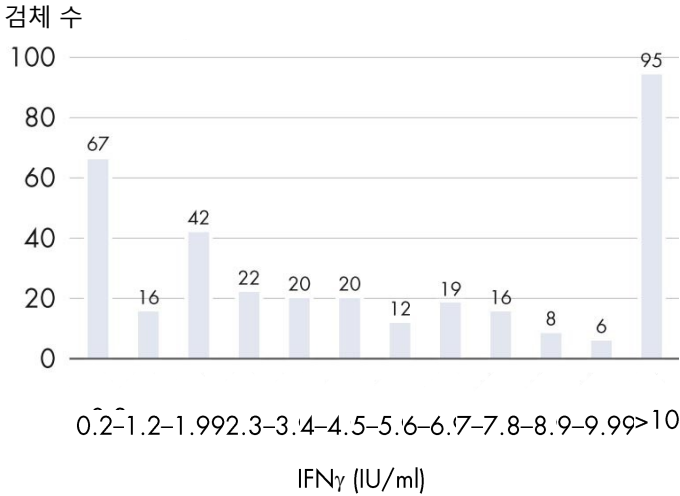


그림 2. 건강한 혈청 양성 대상자에서 QF-CMV IFN- γ 반응 분포(Nil 을 뺀 값)(n = 343).

Mitogen(Nil 을 뺀 값)에 대한 IFN- γ 반응 분포는 CMV IgG 혈청학에 상관 없이 건강한 성인 대상자로부터 얻은 733 개의 검체를 사용하여 QF-CMV ELISA 로 측정하였습니다(그림 3). 0.5 IU/ml 미만의 Mitogen 결과(Nil 을 뺀 값)는 검사에 실패했거나 대상자가 면역저하 상태임을 나타냅니다. 건강한 모집단에서 733 개 중 2 개의 결과만이 이 범주에 해당했습니다.

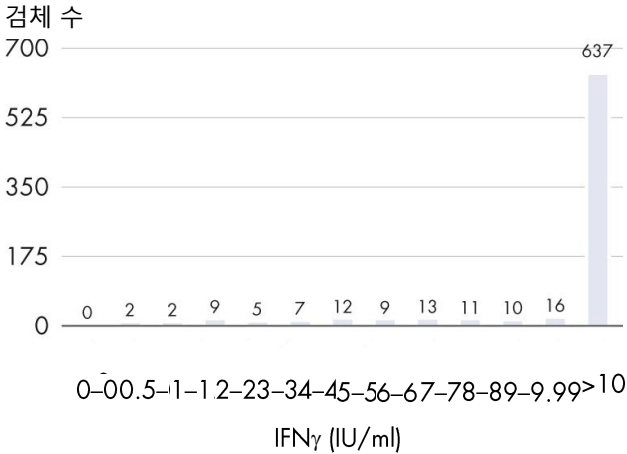


그림 3. 건강한 대상자에서 Mitogen IFN- γ 반응 분포(Nil을 뺀 값)(n = 733).

Nil 튜브에 대한 IFN- γ 반응 분포는 CMV IgG 혈청학에 상관 없이 건강한 성인 대상자로부터 얻은 1020 개의 혈장 검체를 사용하여 QF-CMV ELISA 로 측정하였습니다(그림 4).

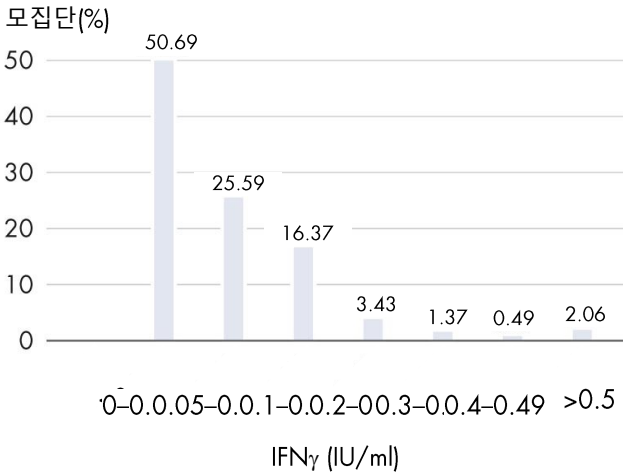


그림 4. 모집단 백분율로 표현한 건강한 대상자(n = 1020)에서 Nil IFN- γ 반응 분포.

성능 특징

임상적 성능

QF-CMV 를 사용한 이전 CMV 노출 검출에 대한 검사 임계값은 QF-CMV 결과를 CMV IgG 혈청학적 결과와 비교한 건강한 대상체 그룹 (n = 223)의 결과를 분석한 후에 확립하였습니다. ROC 분석 결과, QF-CMV 에 대한 최적의 양성 및 음성 예측값을 가정할 때 검사 임계값은 0.04 IU/ml(Nil 을 뺀 후)이었으며(곡선하 면적 = 0.9679 [95%CI: 0.9442-0.9915, p<0.0001]), 이는 건강한 모집단에서 이 분석항목의 용도를 가장 효과적으로 실시한 임계값을 나타냅니다.

QF-CMV 분석항목 성능을 SeraQuest™ CMV IgG 혈청학 검사(Quest International)와 비교하였습니다. QF-CMV 분석항목은 건강한 대상자에서 CMV IgG 혈청학 검사와 95%(310 명 중 294 명) 일치도를 보였으며, 149 명의 혈청 음성 공여자 중 QF-CMV 에 대한 반응을 보인 경우는 없었습니다. 161 명의 혈청 양성 공여자 중 145 명이 QF-CMV 반응성 반응을 나타냈습니다. 전반적인 양성 일치도는 90%였고 음성 일치도 값은 100%였습니다. 건강한 대상자에서 QF-CMV 반응과 CMV IgG 혈청학 상태 간의 일치도 수준이 표 3 에 나와 있습니다.

표 3. 건강한 대상자에서 QuantiFERON-CMV 과 CMV IgG 혈청학 검사 간의 일치도

		CMV 혈청학		총
		양성	음성	
QuantiFERON-CMV	반응성	145	0	145(46.8%)
	무반응	16	149	165(53.2%)
	총	161(51.9%)	149(48.1%)	310(100%)

분석항목 임계값

다른 임상 설정에 대해서는 다른 임계값이 검증될 수 있기는 하지만, 이 분석항목에 대한 권장 임상 검사 임계값은 CMV Antigen 튜브에서 0.2 IU/ml(Nil 을 뺀 값)입니다.

임상 연구

사이토메갈로바이러스 감염 진단을 확인하거나 배제하는 데 대한 확정적인 표준이 없으므로, QF-CMV 에 대한 민감도와 특이성 추정치를 실질적으로 평가할 수는 없습니다. QF-CMV 의 특이성과 민감도는 건강한 대상자에서 QF-CMV 반응과 CMV IgG 혈청학 상태의 일치도 수준을 평가하여 추정하였습니다.

QF-CMV 의 특이성은 이전 CMV 노출의 증거가 없는 건강한 공여자(CMV IgG 혈청 음성 개인) 검체에서 가양성 비율(QF-CMV 반응성 반응)을 평가하여 추정하였습니다. 민감도는 이전 CMV 노출의 증거가 있는 건강한 공여자(CMV IgG 혈청 양성 개인) 검체에서 QF-CMV 반응성을 평가하여 추정하였습니다. QF-CMV 는 상이한 CMV 단백질로부터 다수의 CMV 특이 에피토프를 사용하므로 다양한 HLA 등급 I 일배체형을 가진 집단이 광범위하게 포함됩니다(인구의 대략 98%). CMV 혈청학에 대해 검사받은 대상자의 HLA 일배체형이 알려져 있지 않기 때문에, 소수의 혈청 양성 개인이 QF-CMV Blood Collection Tubes 에 대해 무반응일 것으로 예상되었습니다.

특이성

건강한 대상자로부터 얻은 591 개 검체를 대상으로 한 연구에서 CMV IgG 에 대해 혈청 음성인 개인에서 가양성 QF-CMV 결과는 검출되지 않았으며, 248 개 중 248 개 검체가 QF-CMV ELISA 로 검사 시 무반응이었고 CMV IgG 혈청학 검사 시 음성이었습니다. 따라서, QF-CMV 와 CMV IgG 혈청학 검사를 사용하여 얻은 결과는 100% 일치율을 보였습니다.

고형 장기 이식 수혜자(1-8), 조혈모세포 이식 수혜자(9,10) 및 HIV 감염 환자(11)에게 수행된 다른 모든 특이성 평가에서 QF-CMV 와 CMV IgG 혈청학 간의 일치율도 100%인 것으로 나타났습니다.

민감도

CMV IgG 에 대해 혈청 양성 결과를 보인 건강한 대상자로부터 얻은 343 개 검체로 수행한 연구에서 QF-CMV 반응과 CMV IgG 혈청학 결과 간의 일치도 수준은 80.5%였으며 343 개 중 276 개 검체가 QF-CMV 에 반응성이었고 CMV IgG 혈청학 검사 시 양성이었습니다. 관찰된 불일치는 가양성 CMV 혈청학으로 인하거나 검사 대상 개인에서 반응성 HLA 유형이 없기 때문일 수 있습니다.

고형 장기 이식 수혜자(1-8), 조혈모세포 이식 수혜자(9, 10) 및 HIV 감염 환자(11)에서 수행된 민감도 평가의 일치도 수준은 더 낮은 것으로 나타났으며, 이는 가양성 CMV 혈청학으로 인한 것이거나 검사 대상 개인에 반응성 HLA 유형이 없거나 면역억제로 인해 이들 개인에 반응성 T 세포가 없기 때문일 수 있습니다.

임상적 유용성을 강조하는 연구

CMV IgG 혈청학 및 QF-CMV 둘 다의 용도는 CMV 에 대한 면역성을 검출하는 것입니다. 이식 상황에서 수혜자의 이식 후 발생하는 CMV 합병증의 위험을 확립하기 위해 이식 전에 CMV 혈청학이 널리 사용되고 있으나 이식 후에는 그 가치가 제한적입니다. 그 대신, 증상성 CMV 감염 발생 및/또는 면역억제로 인한 질병 발생의 위험이 있는 환자에서 CMV 면역성 수준을 평가하기 위해 이식 수혜자를 대상으로 QF-CMV 를 사용할 수 있습니다(12-15).

다양한 이식 코호트를 대상으로 한 다수의 공개된 임상 연구에서 QuantiFERON-CMV 의 유용성이 입증되었습니다(1-11, 15, 16).

108 명의 고형 장기 이식 수혜자를 대상으로 한 대규모 연구(4)에서 항-CMV 예방요법 완료 시 QF-CMV 반응성 결과를 보인 환자는 QF-CMV 무반응 결과를 보인 환자에 비해(21.8% 즉 17/78, $p = 0.044$) 이후 CMV 질병 발생 비율이 크게 낮았습니다(3.3% 즉 1/30, 임계값 0.2 IU/ml 사용)(그림 5).

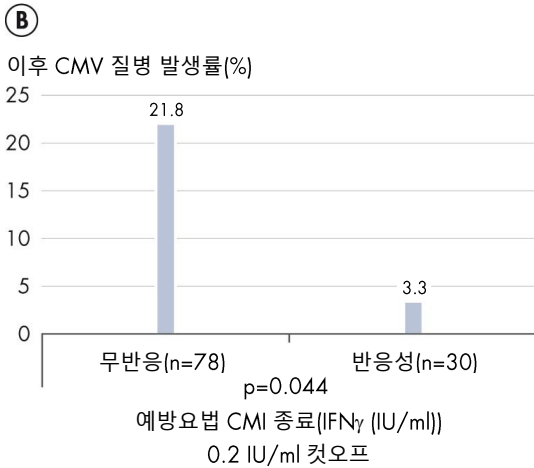
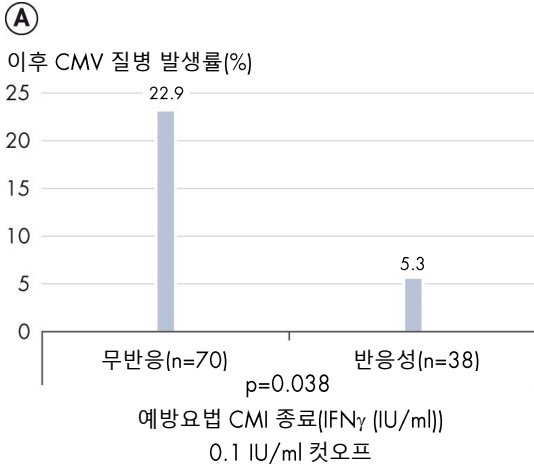


그림 5. 예방요법 종료 시 QuantiFERON-CMV 무반응 결과 대비 QuantiFERON-CMV 반응성 결과를 보인 환자에서 후기 발현 CMV 질병 발생률. 근거 데이터 출처: Kumar et al. (4).

또한, CMV 양성 공여자(D+R-)로부터 장기를 받은 CMV 혈청 음성 이식 수혜자로서 예방요법 완료 시 QF-CMV 반응성 결과를 보인 경우는 더 자주 그리고 더 오랫동안 CMV 질병이 발생하지 않았으며, 이는 후기 발현 CMV 질병 발생 위험이 있는 환자들을 식별하는 데 QF-CMV 를 사용할 수 있음을 시사합니다.

이 연구에서는 또한 CMV 질병 발생 위험이 가장 높은 이식 환자의 코호트(D+/R-)에서 예방요법 후 어느 시점에서든지 반응성 결과에서 CMV 질병이 발생하지 않을 가능성이 더 높았다는 점을 강조했습니다.

37 명의 고형 장기 이식 환자를 대상으로 한 연구(6)에서 QF-CMV 를 사용한 CMV 특이 CD8+ T 세포 반응 평가는 CMV 바이러스혈증에서의 상승 후 CMV 질병 진행에 비해 자발적 바이러스 제거 예측에 도움이 되었습니다. 이 연구에서, QF-CMV 반응성 결과(검사 임계값으로 IFN- γ ≥ 0.2 IU/ml 사용)를 보인 26 명의 환자 중 24 명(92.3%)에서 CMV 바이러스가 자발적으로 제거된 데 비해 QF-CMV 무반응 결과를 보인 11 명 환자 중 5 명(45.5%)만이 동일한 결과를 나타냈습니다.

67 명의 폐 이식 수혜자의 이식 후 V 바이러스혈증 사례를 평가하는 연구(7)에서 25 건 중 18 건(72%)의 CMV 바이러스혈증 사례가 QF-CMV 무반응 결과 후에 나타났으며, 이에 비해 16 건 중 4 건(25%)의 사례가 QF-CMV 반응성 반응 후 나타났습니다(피셔의 정확 검정, $p = 0.0046$, 그림 6).

바이러스 부하 >1000 copies/ml 인

HCMV DNA 혈증 사례(%)

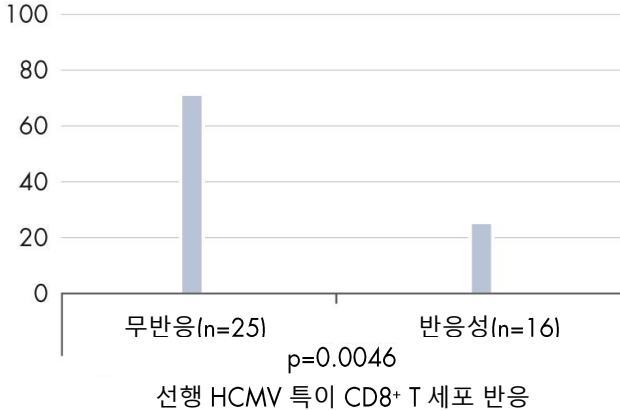


그림 6. QuantiFERON-CMV 로 검출한 CMV 특이 CD8+ T 세포 및 CMV 바이러스 혈증의 통계 분석항목(피서의 정확 검증, p=0.0046). 근거 데이터 출처: Weseslindiner et al (7).

공여자 CMV 혈청 양성, 수혜자 CMV 혈청 음성 고형 장기 이식 환자 127 명을 대상으로 한 대규모, 다기관, 전형적 연구(8)에서 모든 환자가 항바이러스 예방요법을 받았고, 항-CMV 예방요법 완료 후 어느 시점에서든지 QF-CMV 반응성 결과(검사 임계값 0.1 IU/ml 사용)를 보인 환자들은 QF-CMV 무반응 결과(22.2%)를 보인 환자 및 불확정적 결과(58.3%)를 보인 환자에 비해 이식 후 12 개월 시점에 후기 발현 발병률이 크게 낮았습니다(6.4%, p 0.001 미만). 불확정적 결과 또한 “무반응”으로 분류하는 경우에는 이후 CMV 질병 발생률이 6.4% 대비 26.8%(p = 0.024)이었습니다. CMV 질병을 예방하기 위한 QF-CMV 의 양성 및 음성 예측값은 각각 0.90(95% CI 0.74–0.98) 및 0.27(95% CI 0.18–0.37)로 보고되었습니다. 이 연구에서 예방요법을 받고 나서 후속 CMV 질병 발생에 대한 저위험, 중간 위험 또는 고위험 환자를 예측하는 데 QF-CMV 가 유용할 수 있는 것으로 밝혀졌습니다.

55 명의 고형 장기 이식 수혜자를 대상으로 한 전향적 연구(8)에서 이식 전 QF-CMV 결과와 이식 후 CMV 복제 사례 간의 관계를 분석한 결과, CMV 혈청 양성이고 이식 전 QF-CMV 결과가 반응성인 수혜자(4/30 즉 13.3%)에 비해 CMV 혈청 양성이고 이식 전 QF-CMV 결과가 무반응(검사 임계값 0.2 IU/ml 사용)인 환자들에서 이식 후 CMV 복제 발생률이 더 높았습니다(7/14 즉 50%, $p = 0.021$).

이 연구에서 CMV 혈청 양성 공여자로부터 장기를 받았고 이식 전 QF-CMV 반응이 무반응인 수혜자에서 이식 전 QF-CMV 반응이 반응성인 수혜자에 비해 CMV 복제 위험이 10 배 증가한 것으로 밝혀졌습니다(보정된 OR 10.49, 95% CI 1.88–58.46). 따라서, 이식 전 QF-CMV 분석항목은 이식 후 CMV 복제 위험을 예측하는 데 유용할 수 있으며 그에 따라 고형 장기 이식 후 개별적인 CMV 감염 관리를 가능하게 할 수 있습니다.

이식 수혜자 코호트에서 QF-CMV 를 사용하여 CMV 특이 CD8⁺ T 세포 반응 검출을 조사하는 다수의 기타 연구가 전 세계적으로 완료되었거나(2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) 현재 진행 중입니다.

고형 장기 이식에서 사이토메갈로바이러스 관리에 관한 국제적 합의 지침

CMV 특이 면역 모니터링의 중요성이 인식되었으며 *Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation* (12)에 발표되었습니다. 이식 학회의 감염병 부문(The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society)에서 소집한 CMV 및 고형 장기 이식 전문가 패널이 작성한 이 국제적 지침에는 진단, 면역학, 예방 및 치료를 포함하여 CMV 관리에 관한 증거 및 전문가 의견 기반 합의 지침이 나와 있습니다.

이 지침에서는 “CMV 특이 T 세포 반응에 관한 면역 모니터링으로 이식 후 CMV 질병 위험이 있는 환자를 예측할 수 있으며 예방요법 및 선제요법 지침에 유용할 수 있다”고 결론을 내렸습니다(12).

또한, 이 지침에서는 다음을 포함하는 이상적인 면역 모니터링 분석항목의 특성에 관한 권장 사항도 제공하였습니다:

- 이식 수혜자의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 양과 기능을 평가할 수 있는 능력
- IFN- γ 를 측정할 수 있는 능력
- 수행 용이성, 비용 효율성 및 재현 가능성
- 짧은 소요 시간
- 특수 의뢰 검사실로 쉽게 배송할 수 있는 시료

QF-CMV 는 이 지침에서 명시한 기준을 사실상 모두 충족하며, CMV 에 특이적인 IFN- γ 를 검출할 수 있는 유일한 표준화된 면역 모니터링 분석항목입니다.

분석항목 성능 특징

QF-CMV ELISA 는 재조합 사람 IFN- γ 표준액을 사용하며, 이 표준액은 기준 IFN- γ 조제물에 대해 분석되었습니다(NIH 참조: Gxg01-902-535). 검사 검체에 대한 결과는 키트와 함께 제공된 이차 표준액의 희석액을 검사하여 준비된 표준 곡선과 관련하여 국제 단위(IU)에 보고됩니다.

특정 개인의 혈청 또는 혈장에 있는 이종친화(예: 사람 항.마우스) 항체는 면역측정법의 간섭 원인으로 알려져 있습니다. QF-CMV ELISA 의 이종친화 항체 효과는 그린 희석제에 정상 마우스 혈청을 첨가하고 마이크로플레이트 웰에 코팅된 IFN- γ 포착 항체로 F(ab')₂ 단클론 항체 분절을 사용하여 최소화됩니다.

QF-CMV ELISA 의 검출 한계는 0.065 IU/ml 이며, 최대 10,000 IU/ml 의 IFN- γ 농도에서 고용량 후크(항체과잉구역) 효과의 증거는 나타나지 않았습니다. QF-CMV ELISA 항체는 IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 및 IL12 를 포함하여 검사한 모든 사이토카인과 교차 반응을 하지 않는 것으로 나타났습니다.

알려진 IFN- γ 농도의 11 개 혈장 풀의 5 개 복제물을 ELISA 플레이트에 무작위로 배치하여 QF-CMV ELISA 가 선형임을 입증했습니다. 선형 회귀선의 기울기는 1.002 ± 0.011 이고 상관 계수는 0.99 입니다(그림 7).

IFN- γ 의 측정 수치

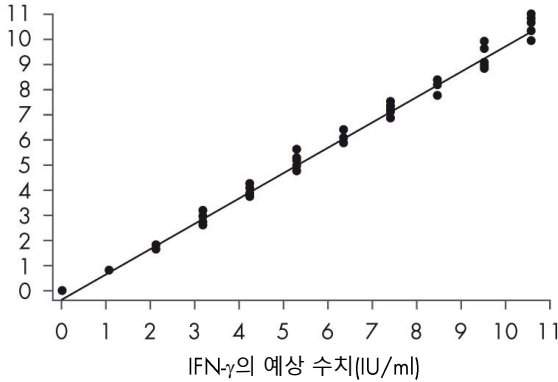


그림 7. 알려진 IFN- γ 농도의 혈장 검체 11 개의 복제물 5 개를 검사하여 측정된 QF-CMV ELISA 의 선형성 프로파일.

QF-CMV ELISA 의 재현성은 3 곳의 검사실에서 비연속적인 3 일에 3 명의 작업자가 다양한 IFN- γ 농도의 복제물 3 개로 된 혈장 검체 20 개를 검사하여 추정했습니다. 즉, 각 검체는 9 회의 독립적 분석항목 실행에서 27 회 검사했습니다. 한 검체는 Nil 대조군이었으며 계산된 IFN- γ 농도가 0.08 IU/ml(95% CI 0.07–0.09) IU/ml 이었습니다. 나머지 19 개 혈장 검체의 농도 범위는 0.33(95% CI 0.31–0.34)–7.7 IU/ml(95% CI 7.48–7.92)이었습니다.

실행 내 또는 내부 분석 비정밀도는 각 플레이트 실행(n=9)에서 IFN- γ 를 포함하는 각 검사 혈장에 대한 %CV 의 평균을 내서 추정하였으며, 범위는 4.1–9.1%CV 였습니다. 실행 내 %CV 의 평균(\pm 95% CI)은 6.6% \pm 0.6%였습니다. 영점 IFN- γ 혈장 평균은 14.1%CV 였습니다.

전체 또는 분석항목 간 비정밀도는 각 혈장 검체에 대한 IFN- γ 의 계산된 농도 27 개를 비교하여 측정하였으며 범위는 6.6–12.3%CV 였습니다. 전체 평균 % CV(\pm 95% CI)는 8.7% \pm 0.7%였습니다. 영점 IFN- γ 혈장은 26.1% CV 를 보였습니다. 계산된 IFN- γ 농도가 낮고 낮은 농도 추정치 주위의 변동이 높은 농도에 대한 변동보다 크기 때문에 이러한 변동 수치가 예상됩니다.

기술 정보

불확정적 결과

불확정적 결과는 검사 대상 개인의 면역 상태와 관련이 있을 수 있지만 다수의 기술적 요인과 관련이 있을 수도 있습니다:

- 채혈 후 37°C 배양까지 16 시간 이상 걸림
- 권장 온도 범위(22°C ± 5°C)를 벗어나 혈액을 보관
- 채혈 튜브가 충분히 혼합되지 않음
- ELISA 플레이트가 불완전하게 세척됨

채혈 또는 혈액 검체의 취급에 대하여 기술적인 문제가 의심되는 경우 새 혈액 시료를 사용하여 전체 QF-CMV 검사를 반복합니다. ELISA 검사의 절차 이탈이 의심되는 경우, 자극받은 혈장에 대한 ELISA 검사를 반복할 수 있습니다. ELISA 검사에 대한 오류가 있는 경우를 제외하고, (낮은 Mitogen 값으로 인한) 불확정적 결과는 반복 시 변경되지 않을 것으로 예상됩니다.

응고된 혈장 검체

혈장 검체의 장기 보관 시 피브린 응고가 발생하는 경우, 검체를 원심분리하여 응고 물질을 침전시켜 혈장의 피펫팅을 용이하게 합니다.

문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생 가능한 문제를 해결하는 데 도움을 줄 수 있습니다. 자세한 내용은 또한 www.QuantiFERON.com 에서 제공되는 기술 정보를 참조하시기 바랍니다. 연락처 정보는 뒷면 표지를 참조하십시오.

의견 및 제안

표준액에 대한 낮은 광학 밀도 판독치

- | | |
|------------------------|--|
| a) 표준액 희석 오류 | QF-CMV ELISA 제품 첨부 설명서에 따라 키트 표준액 희석액이 올바르게 준비되었는지 확인합니다. |
| b) 피펫팅 오류 | 피펫이 제조업체의 지침에 따라 캘리브레이션 및 사용되는지 확인합니다. |
| c) 배양 온도가 너무 낮음 | ELISA 배양은 실온($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$)에서 수행해야 합니다. |
| d) 배양 시간이 너무 짧음 | 접합체, 표준액 및 검체의 플레이트에서 배양이 120 ± 5 분 동안 수행되어야 합니다. 효소 기질 용액은 플레이트 상에 30 분간 배양합니다. |
| e) 잘못된 플레이트 리더 필터 사용 | 기준 필터를 620 nm 에서 650 nm 사이에 두고 450 nm 에서 플레이트를 판독합니다. |
| f) 시약이 너무 차가움 | 접합체 100x 농축액을 제외한 모든 시약은 분석항목 시작 전에 반드시 실온에 이르도록 해야 합니다. 이렇게 하는 데 약 1 시간이 걸립니다. |
| g) 키트/구성요소의 유효 기한이 만료됨 | 키트가 유통기한 전에 사용되는지 확인합니다. 재구성된 표준액 및 접합체 100x 농축액을 재구성일로부터 3 개월 내에 사용하도록 합니다. |

비특이성의 발색 현상

- | | |
|------------------------|---|
| a) 플레이트의 불완전한 세척 | 400 $\mu\text{l}/\text{well}$ 의 세척 완충액으로 플레이트를 최소 6 회 이상 씻어냅니다. 사용되는 세척기에 따라 6 회를 초과하는 세척 주기가 필요할 수도 있습니다. 각 주기 사이에 5 초 이상의 담금 시간이 있어야 합니다. |
| b) ELISA 웰의 교차 오염 | 검체를 피펫팅 및 혼합할 때 주의하여 위험을 최소화합니다. |
| c) 키트/구성요소의 유효 기한이 만료됨 | 키트가 유통기한 전에 사용되는지 확인합니다. 재구성된 표준액 및 접합체 100x 농축액을 재구성일로부터 3 개월 내에 사용하도록 합니다. |

의견 및 제안

- | | |
|-------------------------|---|
| d) 효소 기질 용액이 오염됨 | 청색으로 착색된 경우 기질을 폐기합니다. 반드시 깨끗한 시약 용기를 사용합니다. |
| e) 수확 전 원심분리 튜브 내 혈장 혼합 | 겔 표면의 물질을 교란시키지 않도록 주의하면서, 위아래로 피펫팅하지 않고 상단 젤에서 혈장 검체를 조심스럽게 수확하도록 합니다. |

높은 배경

- | | |
|------------------------|---|
| a) 플레이트의 불완전한 세척 | 400 µl/well 의 세척 완충액으로 플레이트를 최소 6 회 이상 씻어냅니다. 사용되는 세척기에 따라 6 회를 초과하는 세척 주기가 필요할 수도 있습니다. 각 주기 사이에 5 초 이상의 담금 시간이 있어야 합니다. |
| b) 배양 온도가 너무 높음 | ELISA 배양을 실온(22°C ± 5°C)에서 해야 합니다. |
| c) 키트/구성요소의 유효 기한이 만료됨 | 키트가 유통기한 전에 사용되는지 확인합니다. 재구성된 표준액 및 접합체 100x 농축액을 재구성일로부터 3 개월 내에 사용하도록 합니다. |
| d) 효소 기질 용액이 오염됨 | 청색으로 착색된 경우 기질을 폐기합니다. 반드시 깨끗한 시약 용기를 사용합니다. |

비선형 표준 곡선 및 중복 변동성

- | | |
|---------------------------------------|---|
| a) 플레이트의 불완전한 세척 | 400 µl/well 의 세척 완충액으로 플레이트를 최소 6 회 이상 씻어냅니다. 사용되는 세척기에 따라 6 회를 초과하는 세척 주기가 필요할 수도 있습니다. 각 주기 사이에 5 초 이상의 담금 시간이 있어야 합니다. |
| b) 표준액 희석 오류 | 본 제품 첨부 설명서에 따라 키트 표준의 희석이 올바르게 준비되도록 합니다. |
| c) 불량한 혼합 | 시약을 거꾸로 하여 또는 서서히 볼텍싱하여 완전히 혼합시킨 후에 플레이트에 첨가합니다. |
| d) 분석항목 설정 중에 일정하지 않은 피펫팅 기법 또는 간섭 발생 | 검체 및 표준액 첨가는 연속적인 방식으로 수행해야 합니다. 분석항목을 시작하기 전에 모든 시약을 준비해야 합니다. |

제품 정보 및 기술 지침은 유통업체를 통해 QIAGEN 에서 또는 www.QuantiFERON.com 을 방문하여 무료로 이용할 수 있습니다.

참고 문헌

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.

기호

포장물 및 라벨에 다음 기호가 있을 수 있습니다:

기호	기호 정의
	<N>회 반응에 충분한 시약 포함
	사용 기한
	CE 마크
	체외 진단용 의료 기기
	카탈로그 번호
	로트 번호
	물품 번호
	국제 거래 단위 번호
	온도 제한
	재사용하지 말 것
	직사광선을 피할 것
	사용 지침 참조
	제조업체
	유럽 공동체의 공인 대리인

연락처 정보

기술 지원 및 자세한 정보는 www.qiagen.com/Support 에서 기술 지원 센터를 참조하여 00800-22-44-6000 으로 전화하거나 QIAGEN 기술 서비스 부서 또는 현지 유통업체에 연락하십시오(뒷표지를 참조하거나 www.qiagen.com 를 방문해 주십시오).

간략한 ELISA 검사 절차

1 단계: 혈액 배양

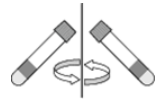
1. 환자의 혈액을 채혈 튜브에 수집하고 튜브의 내부 표면 전체가 혈액으로 덮이도록 충분히 확실하게 10 회 흔들어 혼합하여 튜브 벽의 항원을 용해합니다.



2. 튜브를 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 16-24 시간 동안 똑바로 세워 배양합니다.



3. 배양 후에 튜브를 $2000-3000 \times \text{RCF}(\text{g})$ 에서 15 분 동안 원심분리하여 혈장과 적혈구를 분리합니다.



4. 원심분리 후 수확 전에는 위아래로 피펫팅하거나 어떤 식으로든 혈장을 혼합하지 마십시오. 겔 표면의 물질을 교란시키지 않도록 항상 주의하십시오.



2 단계: IFN- γ ELISA

1. 접합체 100x 농축액을 제외한 ELISA 구성요소를 최소 60 분 동안 실온에 이르도록 합니다.

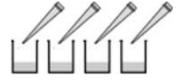


2. 증류수 또는 탈이온수로 키트 표준액을 8.0 IU/ml 로 재구성합니다. 4 가지 표준 희석액을 준비합니다.

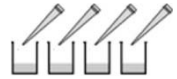


3. 동결건조된 접합체 100x 농축액을 탈이온수 또는 증류수로 재구성합니다.

4. 그린 희석제 내에 사용 강도 접합체를 준비하여 모든 웰에 50 μ l 를 첨가합니다.



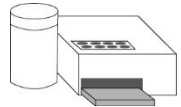
5. 검사 혈장 검체 50 μ l 및 표준액 50 μ l 를 해당 웰에 첨가합니다. 웨이커로 혼합합니다.



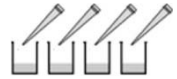
6. 실온에서 120 분 동안 배양합니다.



7. 400 μ l/well 의 세척 완충액으로 웰을 최소 6 회 이상 씻어냅니다.



8. 웰에 100 μ l 의 효소 기질 용액을 첨가합니다. 웨이커로 혼합합니다.



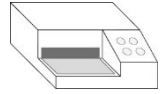
9. 실온에서 30 분 동안 배양합니다.



10. 모든 웰에 50 μ l 의 효소 정지 용액을 첨가합니다. 웨이커로 혼합합니다.



11. 기준 필터를 620–650 nm 에 두고 450 nm 에서 결과를 판독합니다.



12. 결과를 분석합니다.



안내서 개정 이력

문서	변경 사항	날짜
L1075110-R5	파손된 바이알에 관한 안전성 정보 추가 23 페이지의 표 2, QF-CMV 결과 해석 업데이트	2018 년 2 월
L1075110-R5	10 페이지의 GHS 정보 업데이트.	2018 년 2 월

이 페이지는 빈 페이지입니다.

이 페이지는 빈 페이지입니다.

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

QuantiFERON-CMV ELISA 에 대한 제한된 라이선스 협약

본 제품을 사용하는 것은 제품의 구매자 또는 사용자가 다음의 조건에 동의함을 나타냅니다:

1. 이 제품은 오직 제품과 함께 제공된 프로토콜과 이 안내서에 따라 사용해야 하며, 패널에 포함된 구성품만 함께 사용할 수 있습니다. QIAGEN 은 제품과 함께 제공된 프로토콜 및 본 안내서, www.qiagen.com 에서 제공되는 추가 프로토콜에서 설명한 경우를 제외하고 지적 재산권에 따라 본 패널에 포함된 구성품을 본 패널에 포함되지 않은 구성품과 통합하거나 사용하도록 라이선스를 부여하지 않습니다. QIAGEN 사용자들 위해 QIAGEN 사용자가 이 추가 프로토콜의 일부를 제공하였습니다. QIAGEN 에서 이 프로토콜을 철저히 검사하거나 최적화하지 않았습니다. QIAGEN 은 이를 보장하지 않으며 제 3 자의 권한을 침해하지 않는다는 것도 보증하지 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 QIAGEN 은 이 패널 및/또는 이 패널의 사용이 제 3 자의 권리를 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
3. 이 패널 및 구성품은 일회 사용에 대해 라이선스가 부여되며 재사용, 재정비 또는 재판매할 수 없습니다.
4. QIAGEN 은 명시적으로 설명한 경우 이외에 명시적 또는 묵시적으로 다른 라이선스를 명확히 부인합니다.
5. 패널의 구매자 및 사용자는 위에서 금지한 행위로 이어지거나 그러한 행위를 조장할 수 있는 조치를 취하거나 다른 사람이 그렇게 하도록 허용하지 않는다는 데 동의합니다. QIAGEN 은 어떤 법정에서든 이 제한적 라이선스 계약의 금지를 주장할 수 있으며, 패널 및/또는 그것의 구성품과 관련된 이 제한적 라이선스 계약 또는 그것의 지적재산권을 주장하기 위한 어떤 소송에서 변호사 비용을 포함하여 그의 모든 조사 및 법정 비용을 회수할 수 있습니다.

라이선스 조항의 업데이트는 www.qiagen.com 을 참조합니다.

Feb-18 © 2018 QIAGEN, 모든 권한 보유.

주문 www.qiagen.com/shop | 기술 지원 support.qiagen.com | 웹사이트 www.qiagen.com