

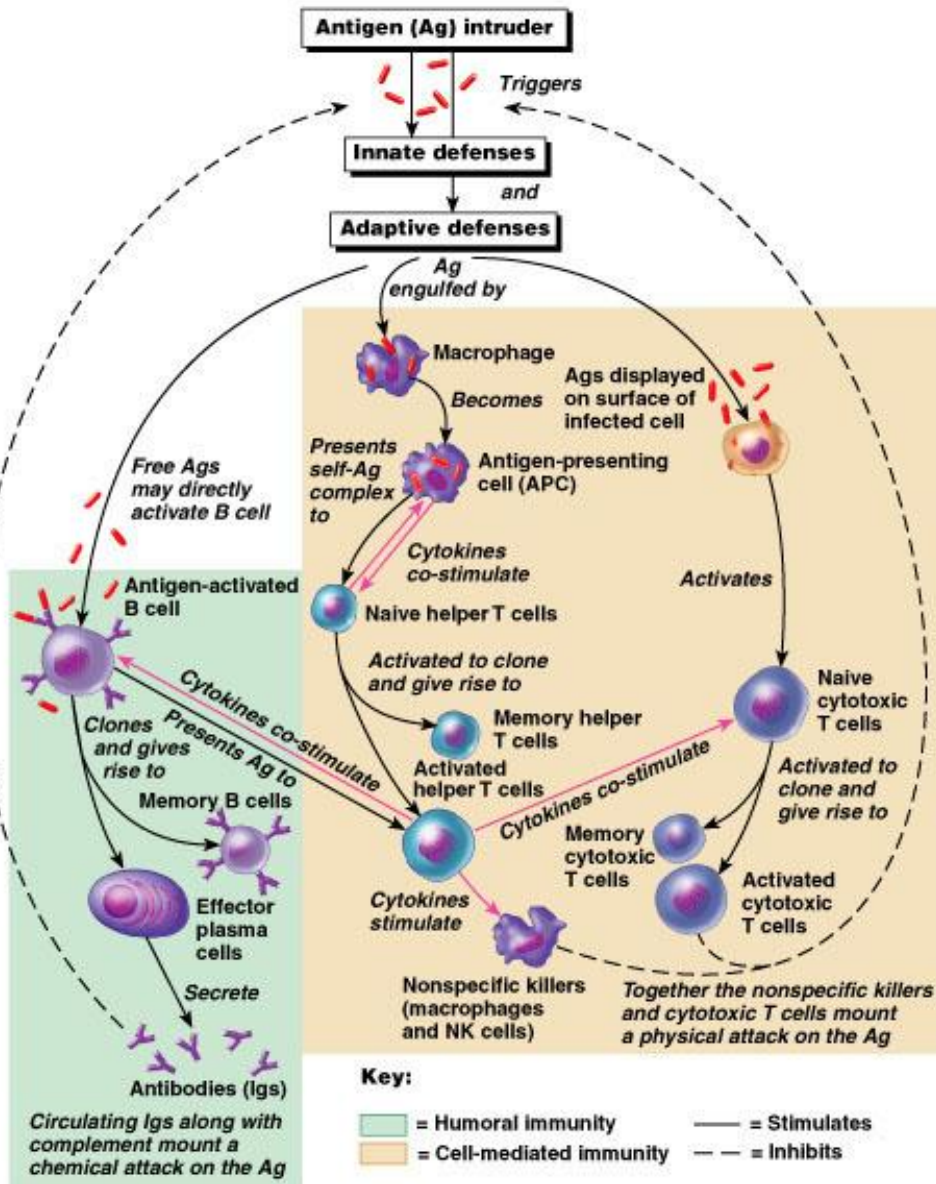
3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi-2015



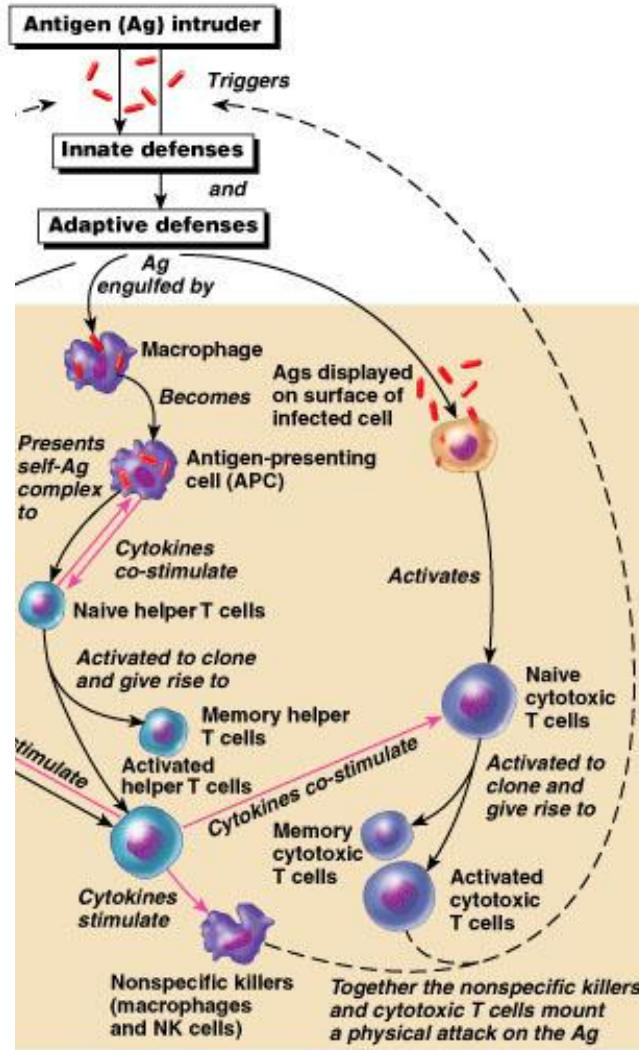
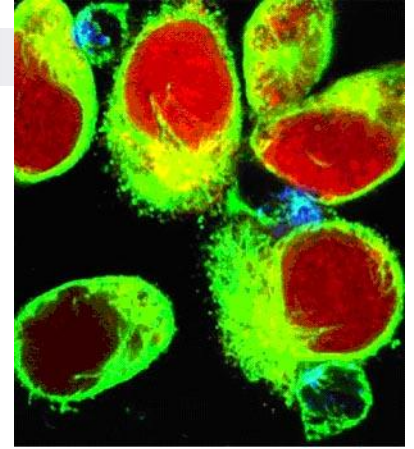
18-22 Kasım 2015
Titanic Kongre Merkezi
Belek, Antalya

KONAK İMMÜN YANITININ DEĞERLENDİRİLMESİ

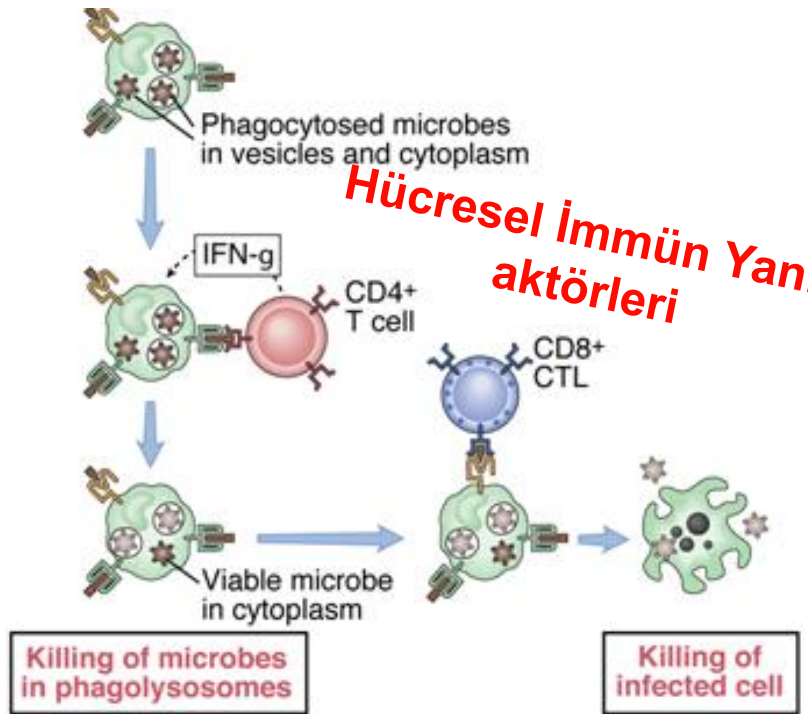
Prof.Dr.Meral GÜLTEKİN
mgultekin@akdeniz.edu.tr



Humoral Hücresel Immünite

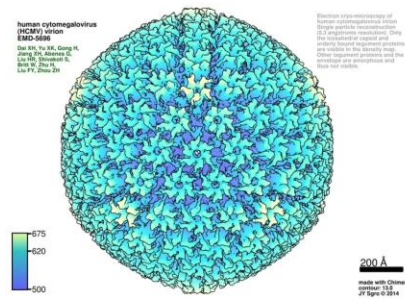
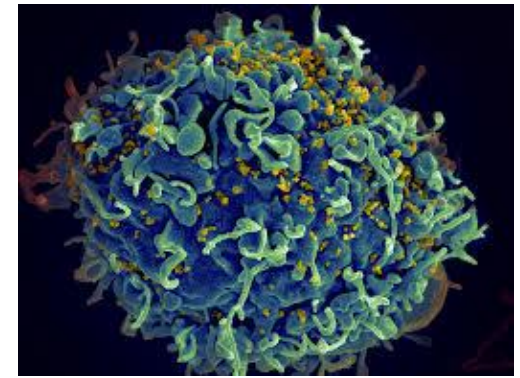
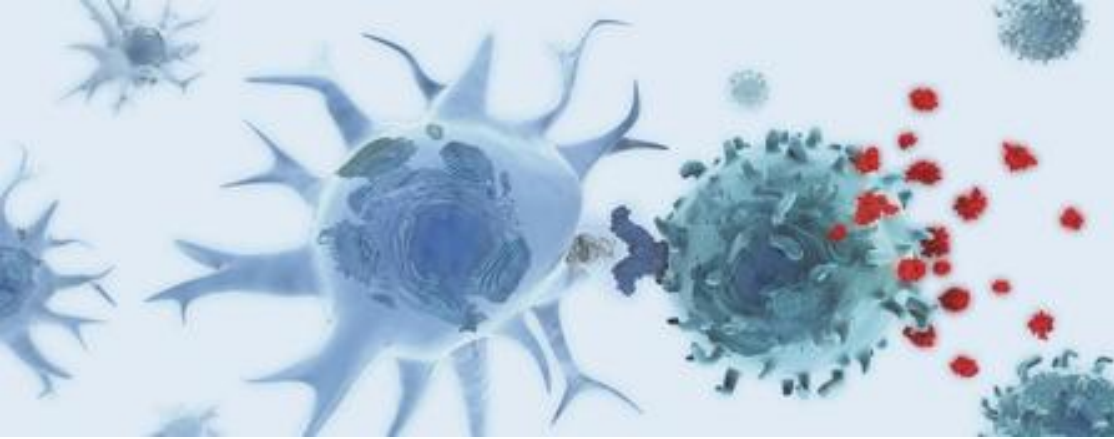


Key:
 = Humoral immunity — = Stimulates
 = Cell-mediated immunity - - = Inhibits

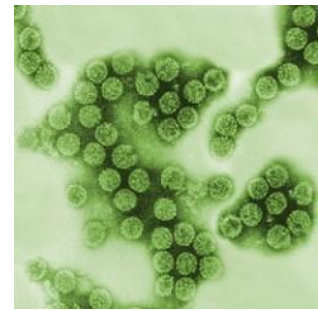


Hücresel İmmün Yanıt aktörleri

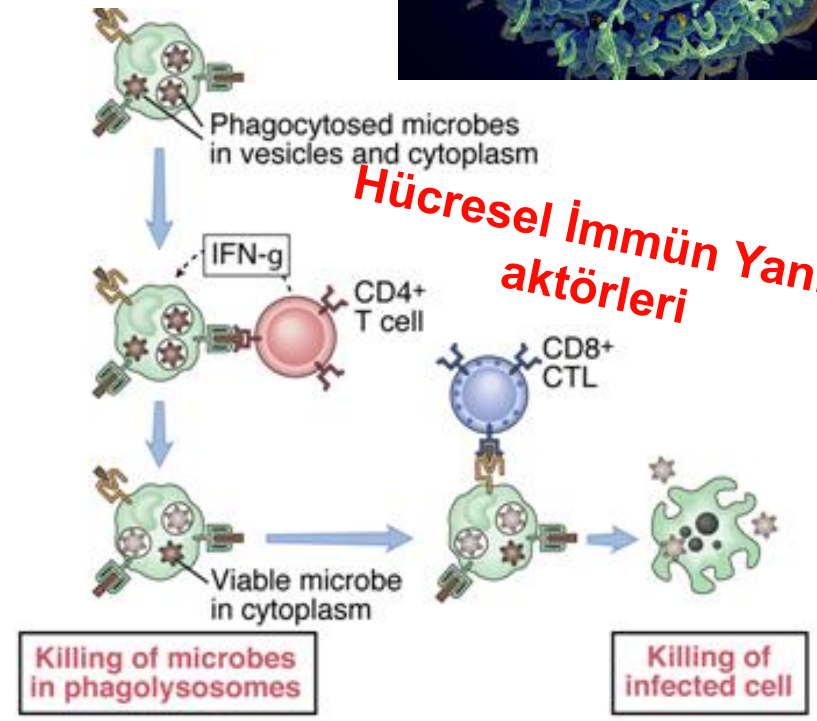
Hücresel İmmünite



CMV

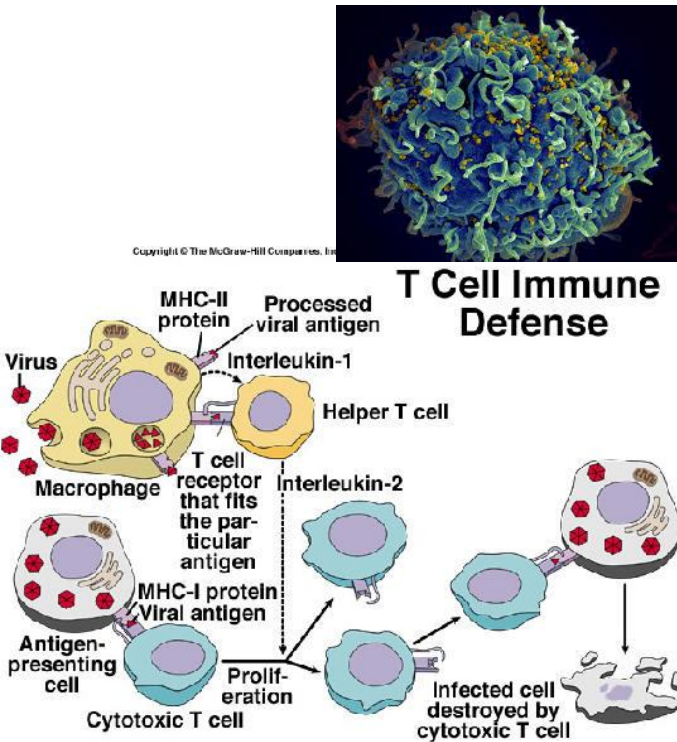


BKV

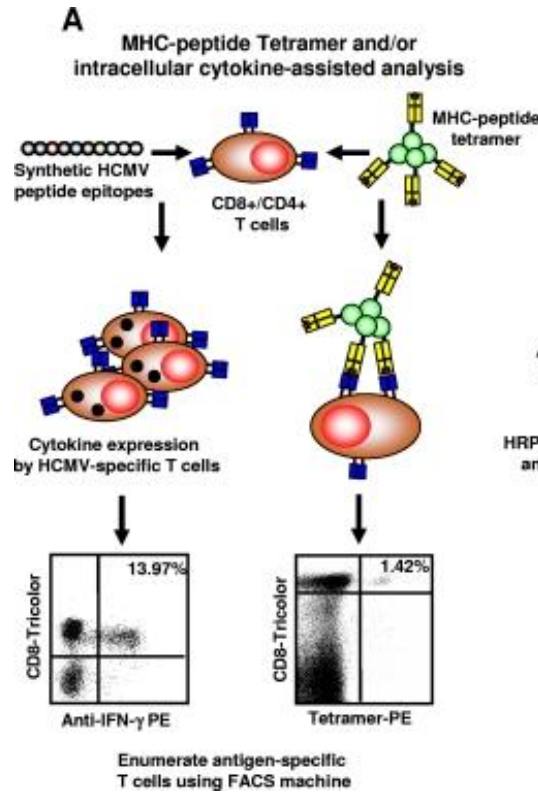


Hücresel İmmün Yanıt aktörleri

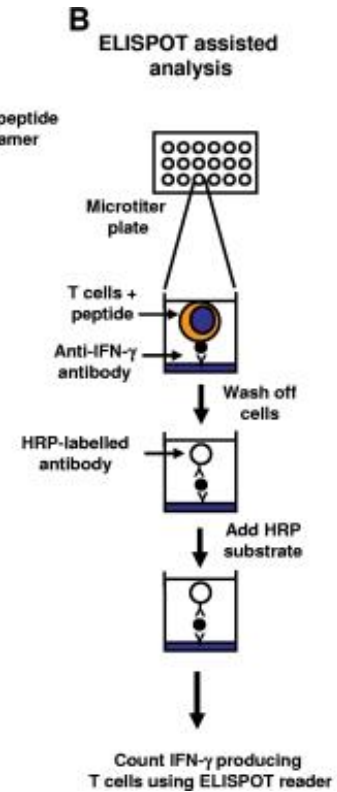
Sunum planı



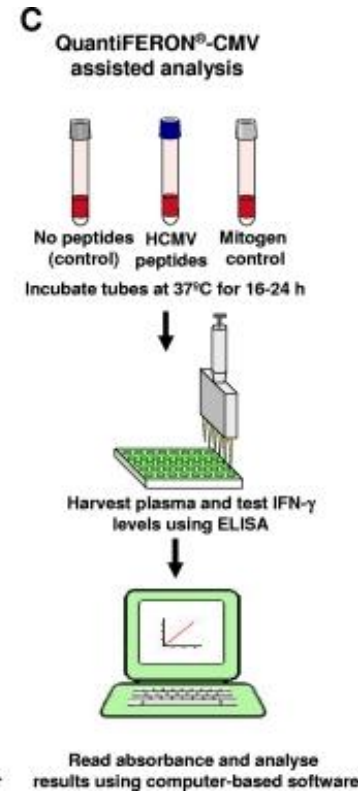
Akan hücre ölçer



ELISPOT

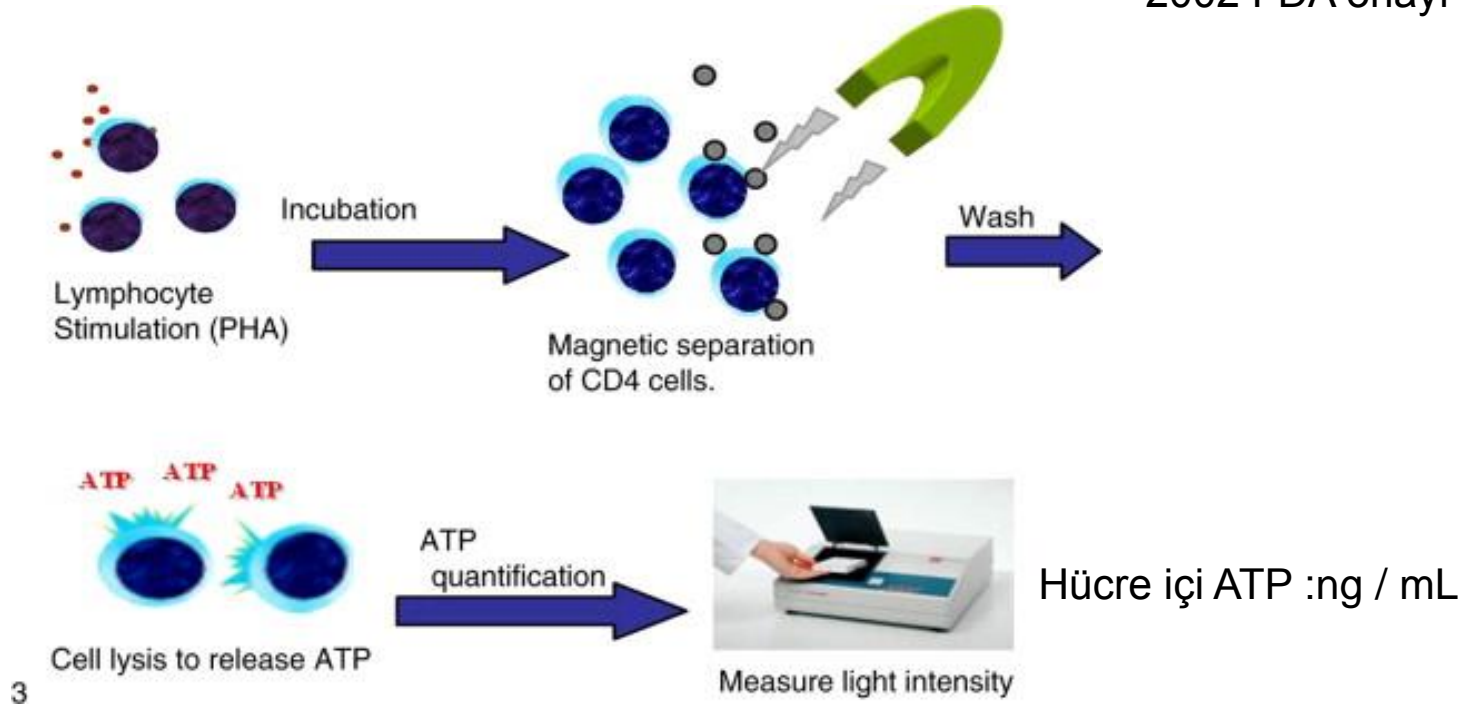


Quantiferon



Hücre içi ATP ölçümü : Immuknow immün hücre fonksiyon yöntemi

2002 FDA onayı



Kök hücre alıcılarında spesifik immün yapılanmayı etkileyen faktörler

- Hasta / donör yaşı
- Primer hastalığı
- Transplant tipi- kök hücre kaynağı, graft yapısı-
- Uygulanan protokollar
- GVHD / steroid kullanımı
- HLA farklılığı derecesi

Kök hücre alıcılarında spesifik immün yapılanmayı etkileyen faktörler

- Hasta / donör yaşı
- Primer hastalığı
- Transplant tipi- kök hücre kaynağı, graft yapısı-
- Uygulanan protokollar
- GVHD / steroid kullanımı
- HLA farklılığı derecesi

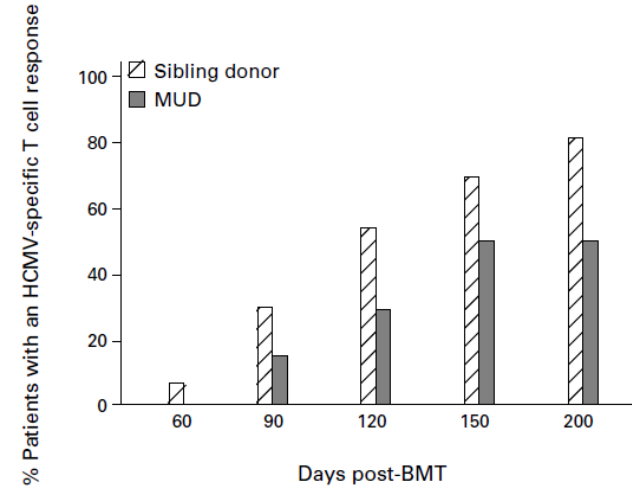


Figure 3 Development of the HCMV-specific T cell response in patients transplanted from an HLA-matched sibling or unrelated donor.

Kök hücre alıcılarında spesifik immün yapılanmayı etkileyen faktörler

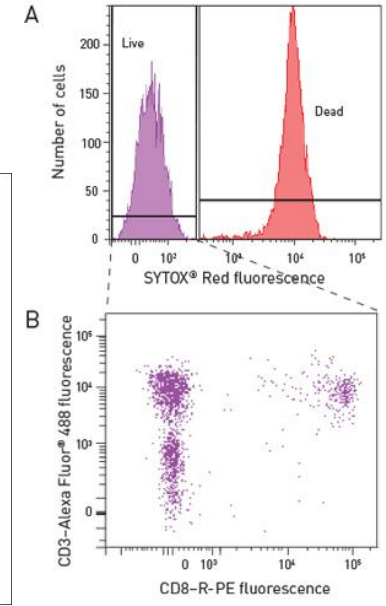
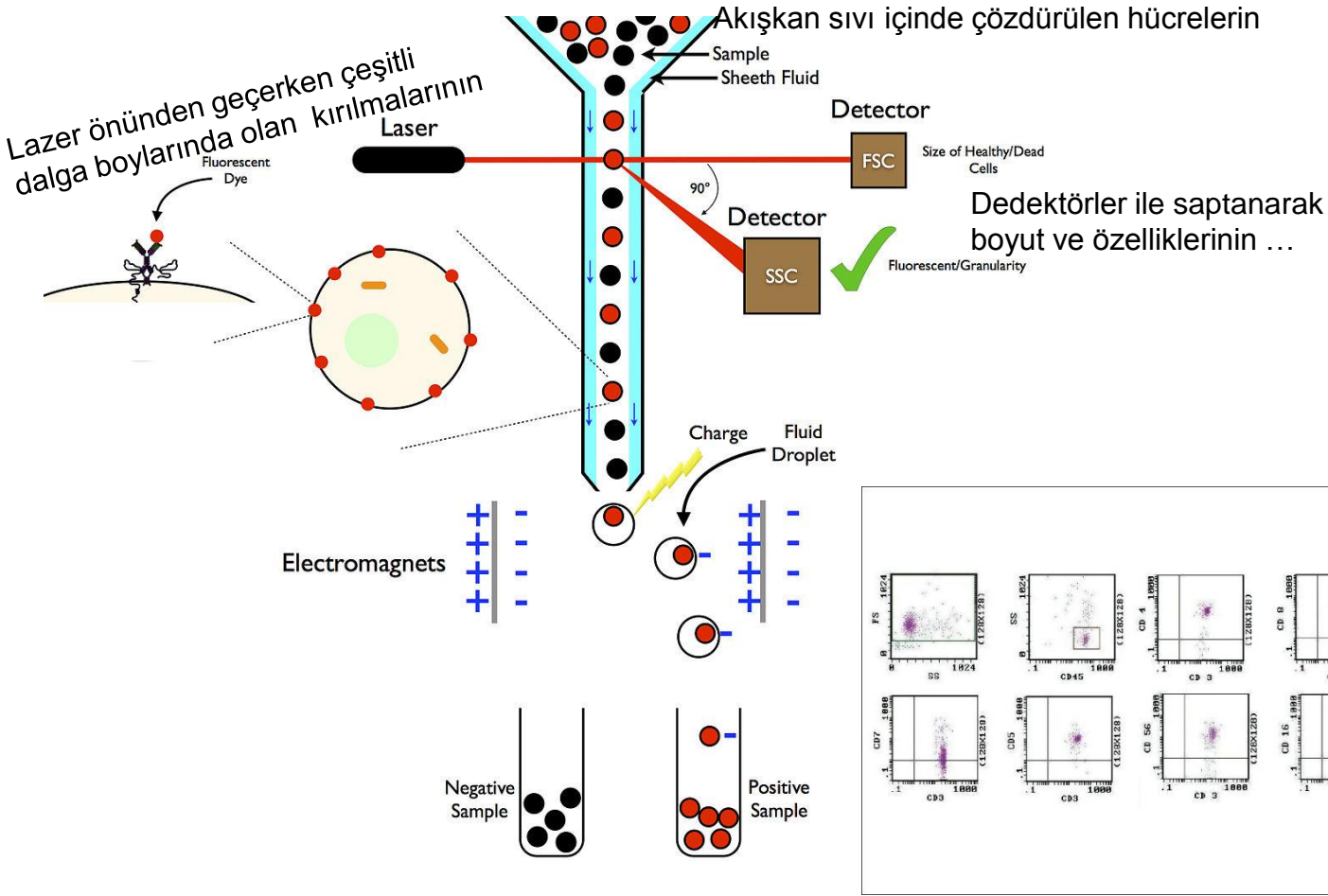
- Hasta / donör yaşı
- Primer hastalığı
- Transplant tipi- kök hücre kaynağı, graft yapısı-
- Uygulanan protokollar
- GVHD / steroid kullanımı
- HLA farklılığı derecesi
- Hasta / donör serolojik durumu

D⁺ / R⁺

D⁻ / R⁺

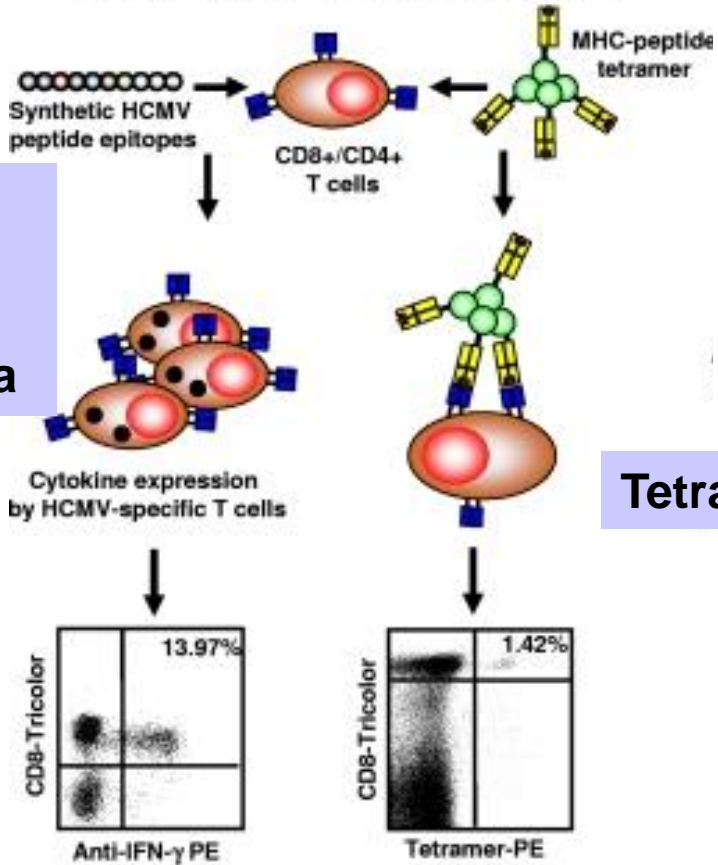
Multifonksiyonel CMV spesifik T hücre oluşturduklarından reaktivasyon, hastalık, mortalite kümülatif indeksi daha azdır ve daha az antiviral tedaviye gereksinim duyarlar.

Akış sitometri (akan hücre ölçer) - hücresel bağışık yanıt izlemi-



Akan hücre ölçer

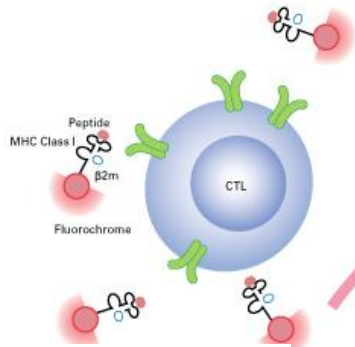
MHC-peptide Tetramer and/or intracellular cytokine-assisted analysis



Hücre içi sitokin boyama

Tetramer bazlı

Enumerate antigen-specific T cells using FACS machine

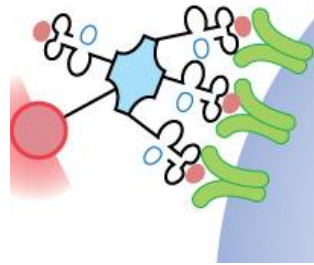


Tetramer bazlı akış sitometri

Monomerik MHC peptid kompleksi TCR e düşük aviditeli..

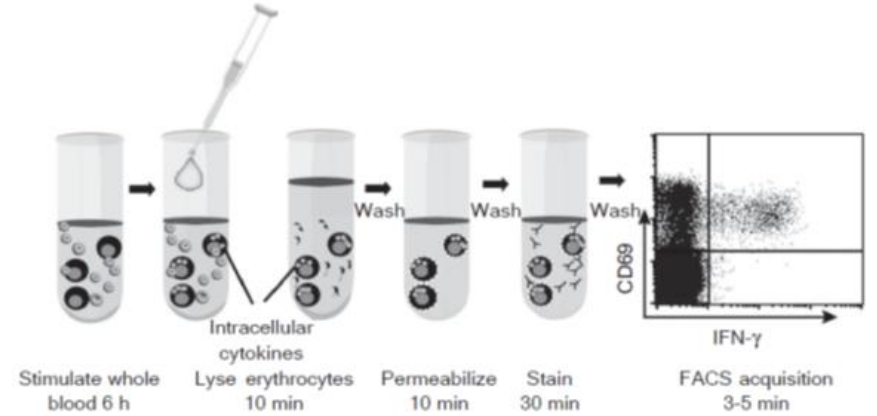
Tetramerizasyon MHC-peptid kompleksinin aviditesini arttırarak ag spesifik T hücrelerinin saptanmasını sağlar

avidity of MHC/peptide wing for detection of



Ancak ag spesifik T hücrelerinin tümü fonksiyonel olmayabilir.

CFC (Cytocine flow cytometry) : ICS (Intracellular Cytocine Staining) : Sitokin akış sitometri : Hücre içi Sitokin Boyama



Mononükleer hc.ler viral ag.ile uyarılır

Sitokin sentezleyen özgül T lenfositler antisitokin antikorlar ve aktivasyon markerları kullanılarak hücre içi boyama sonucu gösterilirler.

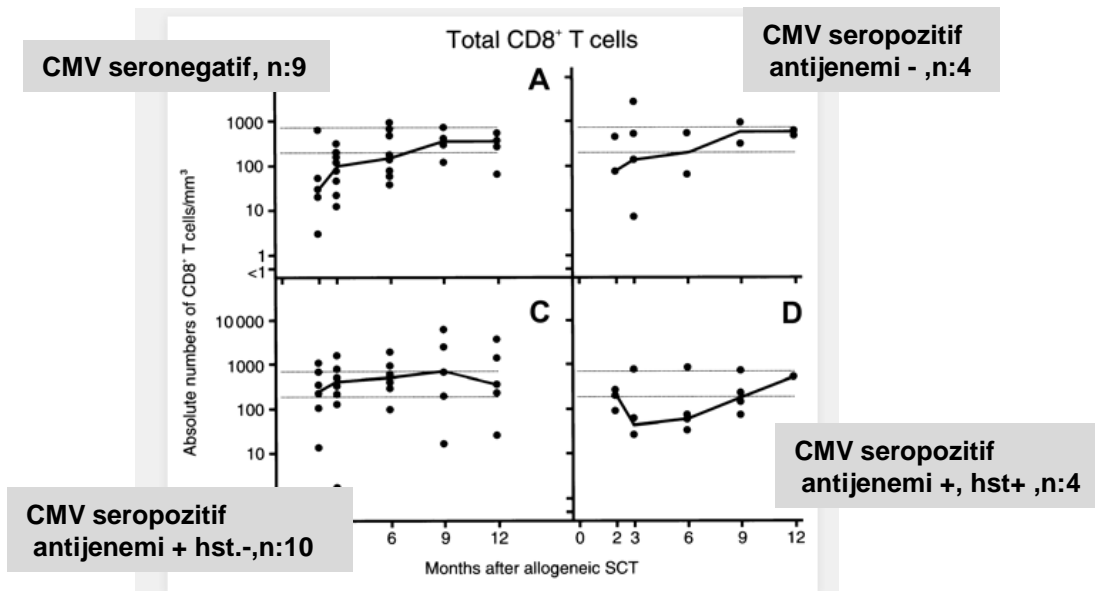
Fonksiyoneldir.

Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection

Jan W. Gratama, Joost W. J. van Esser, Cor H. J. Lamers, Claire Tournay, Bob Löwenberg, Reinder L. H. Bolhuis and Jan J. Cornelissen

n : 27 HLA-A*0201+ (R⁻/D⁻ n:6, R⁻/D⁺ n:3, R⁺/D⁻ n:5, R⁺/D⁺ n:13)

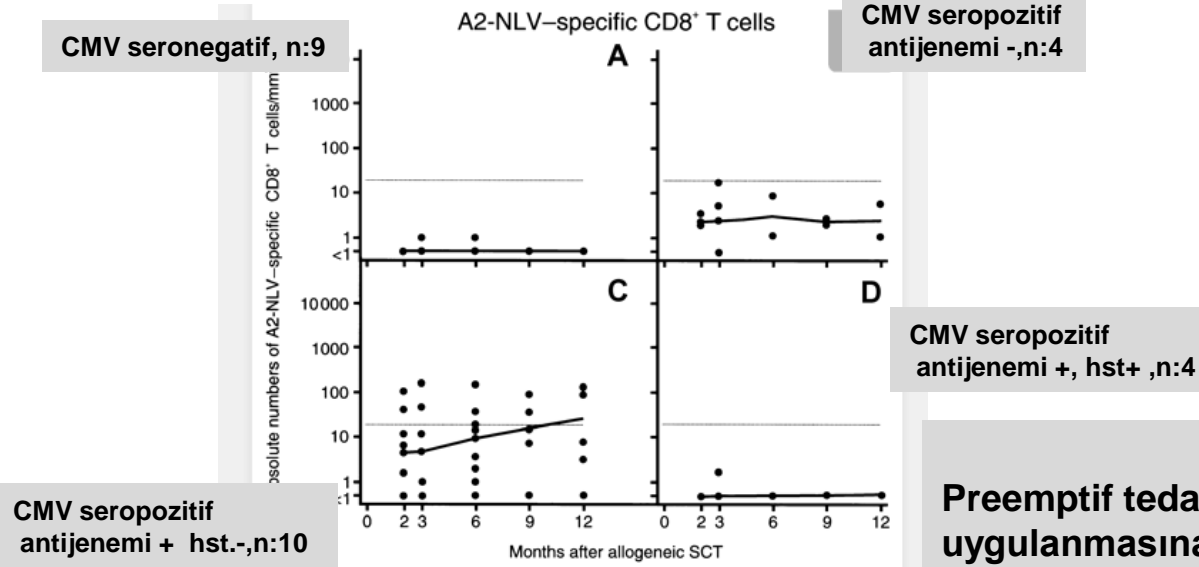
1 yıl immünolojik ; antijenemi testi.....



Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection

Jan W. Gratama, Joost W. J. van Esser, Cor H. J. Lamers, Claire Tournay, Bob Löwenberg, Reinder L. H. Bolhuis and Jan J. Cornelissen

n : 27 HLA-A*0201+ (R⁻/D⁻ n:6, R⁻/D⁺ n:3, R⁺/D⁻ n:5, R⁺/D⁺ n:13)
CMV pp65 immüdominant NLVPMVATV peptidi
1 yıl immünolojik ; antijenemi testi.....



Seropozitif, CMV hastalığı gelişmeyen olgularda (13/14) A2-NLV-spesifik CD8⁺ T hücre yanıtı mevcut

Preemptif tedavi uygulanmasına karşın CMV hastalığı gelişenlerde A2-NLV-spesifik CD8⁺ T hücre yanıtı saptanmadı.

CMV infeksiyonunu belirlemede bir değer ?

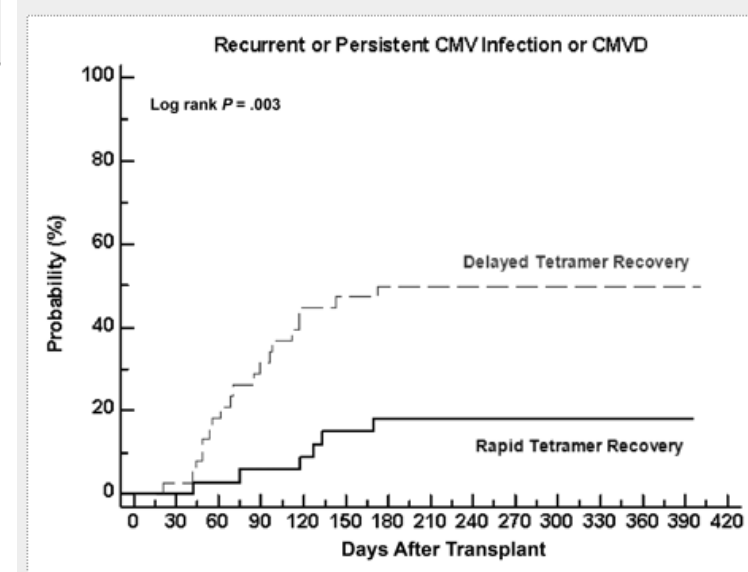
Protection from CMV infection with optimal cutoff of 7 cells/ μ L within 65 days

Recovery	Recurrent or persistent CMV infection or CMVD (n, %)	
	Absent	Present
Rapid	28 (82)	6 (18)
Delayed	19 (50)	19 (50)

İlk 65 günde 7 tetramer (+) hücre / μ l

CMV immünite hızlı iyileşme :
CMV hücresel immün yapılanmasında hızlı düzelme

CMV hastalığından koruyucu (p:0.004)



CMV immünite geç yapılanan grupta :

CMV inf.gelişme riski 2.6 X

CMVD gelişme riski 6.4 X

Fatal komplikasyon gelişme riski 2.4 X

ORIGINAL ARTICLE

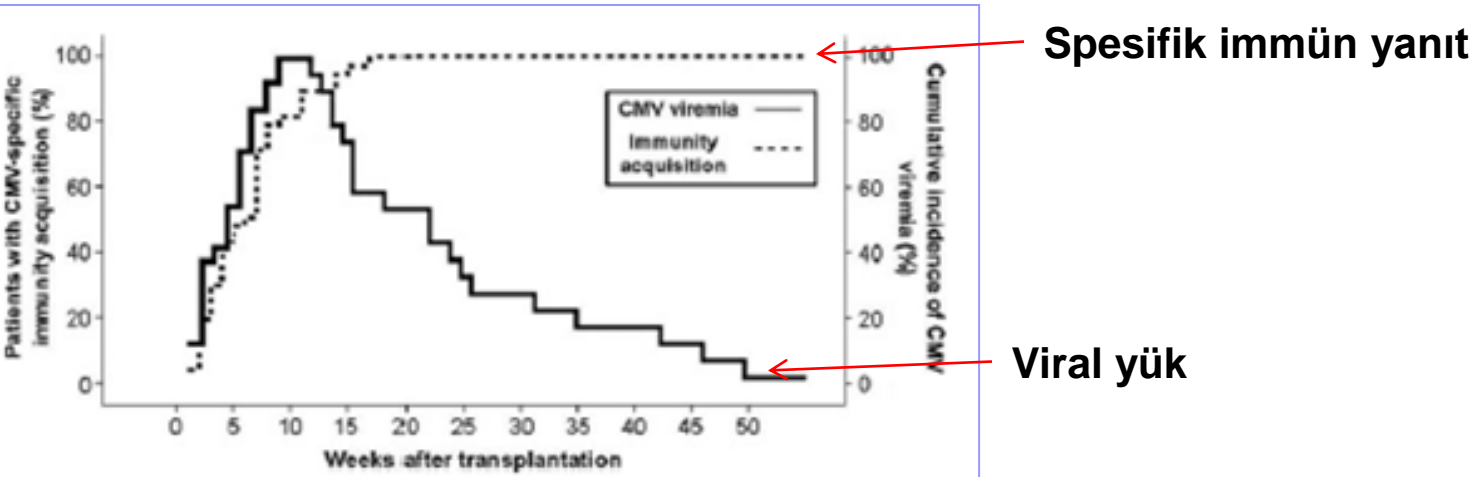
Timing of CMV-specific effector memory T cells predicts viral replication and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Ildefonso Espigado,^{1,2} Fátima de la Cruz-Vicente,^{1,2} Omar J. BenMarzouk-Hidalgo,^{1,3} Irene Gracia-Ahufinger,^{1,3} Jose R. Garcia-Lozano,^{1,4} Manuela Aguilar-Guisado,^{1,3} Jose M. Cisneros,^{1,3} Alvaro Urbano-Ispizua^{1,2} and Pilar Perez-Romero^{1,3}

n : 46 ;
Hücre yüzey molekülleri CD4,CD8,CD3,CD69 ;
IFN- γ , IL-2, IL-4 sitokinler : Hücre içi sitokin boyama

6 hafta içerisinde
CMV-spesifik T hücre yanıtı oluşturanlar (CD8⁺T : 0.7 hücre / μ l) / İmmün yapılanması daha geç düzelenler

CMV replikasyon : % 33 p:0.007 % 89.5



Spesifik immün yanıt

Viral yük

Spesifik immün yanıtın yeniden yapılanması ile viral yük azalıyor
p.0.01

ORIGINAL ARTICLE

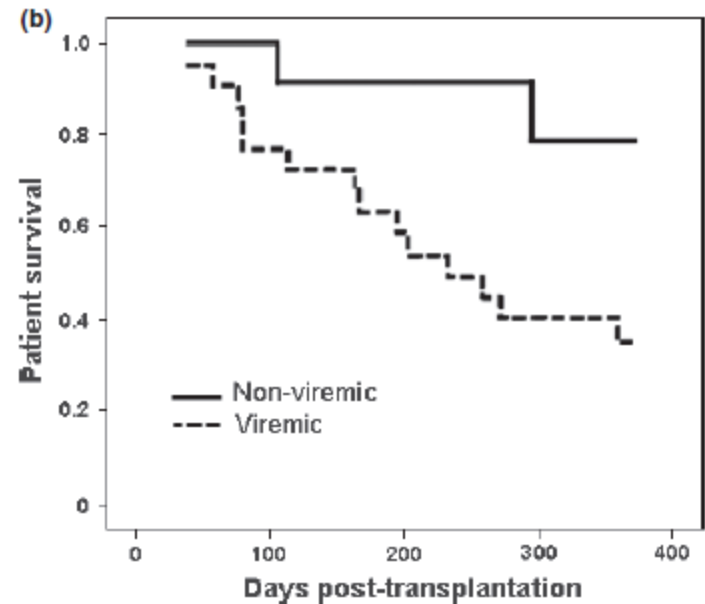
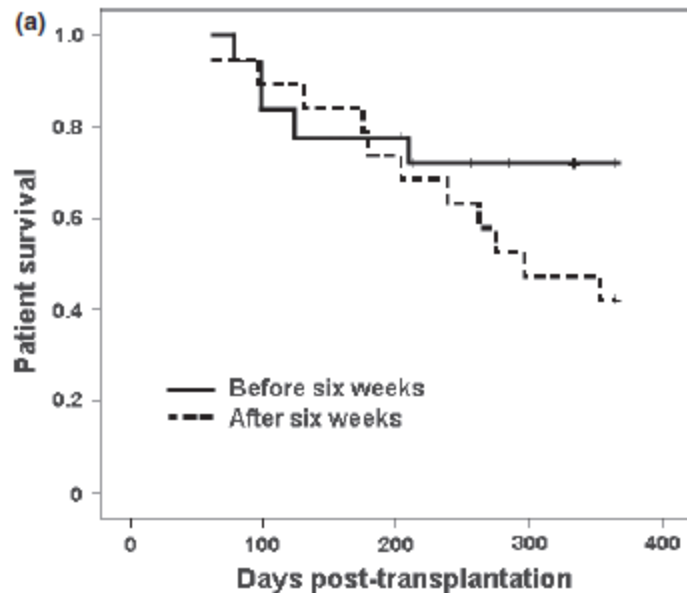
Timing of CMV-specific effector memory T cells predicts viral replication and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

Ildefonso Espigado,^{1,2} Fátima de la Cruz-Vicente,^{1,2} Omar J. BenMarzouk-Hidalgo,^{1,3} Irene Gracia-Ahufinger,^{1,3} Jose R. Garcia-Lozano,^{1,4} Manuela Aguilar-Guisado,^{1,3} Jose M. Cisneros,^{1,3} Alvaro Urbano-Ispizua^{1,2} and Pilar Perez-Romero^{1,3}

n : 46 ;
 Hücre yüzey molekülleri CD4,CD8,CD3,CD69 ;
 IFN- γ , IL-2, IL-4 sitokinler : Hücre içi sitokin boyama

6 hafta içerisinde
 CMV-spesifik T hücre yanıtı oluşturanlar / İmmün yapılanması daha geç düzelenler

Survey p:0.07



Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation

Kate Cwynarski, Jenni Ainsworth, Mark Cobbold, Simon Wagner, Prem Mahendra, Jane Apperley, John Goldman, Charles Craddock, and Paul A. H. Moss

[Blood. 2001;97:1232-1240]

CMV hastalığından koruyucu bir değer ?

n : 24 ; 13 kardeş , 11 akraba olmayan donör

Seropozitif donör alıcılarında ilk 50 günde CMV spesifik CTL tüm CD8 T lenfosit havuzunda % 21 ' ulaşmıştır.

$10 \times 10^6 / L$ üzerinde CMV spesifik CTL : CMV hastalığından koruyucu bir değer.....

Geç CMV hastalığı riskinde olanları belirlemede ?

n : 30 ; 21 HLA uyumlu kardeş ; CMV spesifik T hücre proliferasyon test

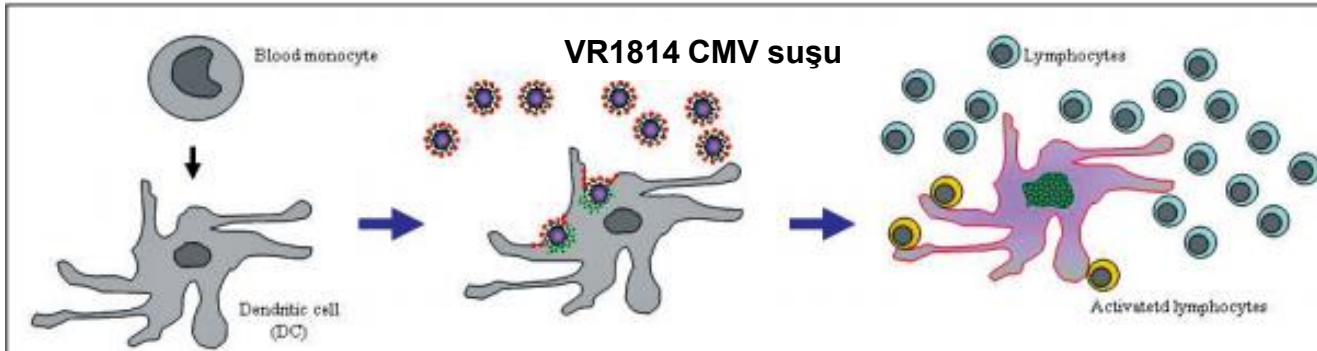
120. Günde

CMV-spesifik T hücre yapılanması olan n: 17 :
Geç CMV hastalığı gelişmedi.

Virusa T hücre yanıtı yanıt gelişmemiş
hastaların n:13 4 ' ünde (% 30.8) geç CMV
hastalığı gelişti.

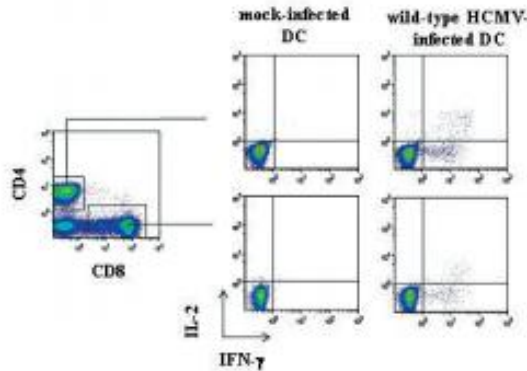
Virusa özel T hücre yanıtı mevcut değil ise daha sık, duyarlı taranmalı ,
preemptif tedavi süresi uzatılmalı

Dendritik hücre bazlı akış sitometri



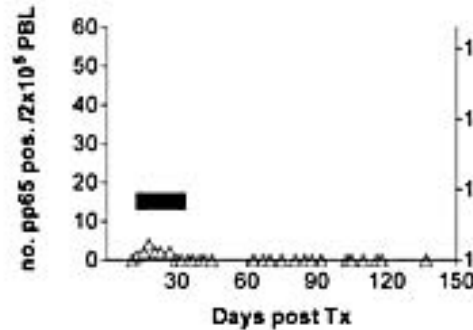
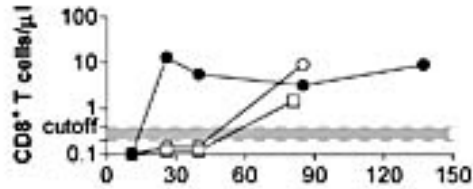
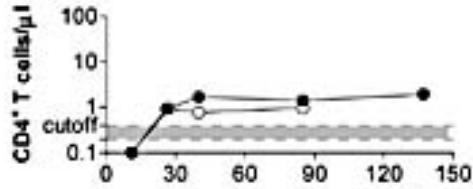
Monosit –
İmmatüre dendritik hücre
kültürü

Endoteliotropik ve dendrotrop
CMV suşu ile inf. İnfekte DC-lenfosit kültürü

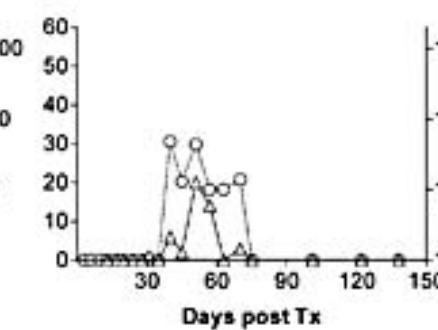
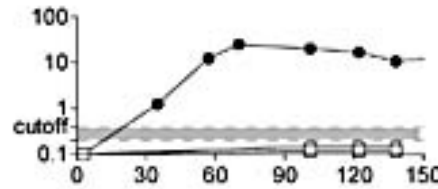
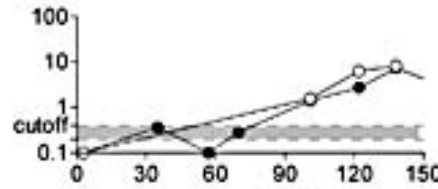


Sitokin sentezleyen CMV spesifik
CD4+ ve CD8+ T hücresi

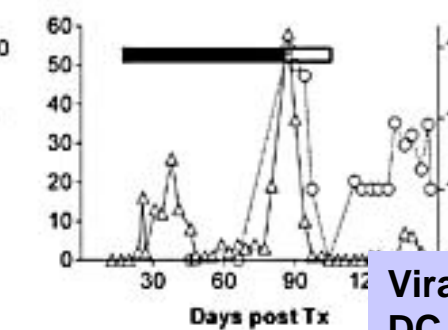
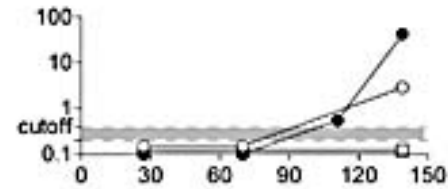
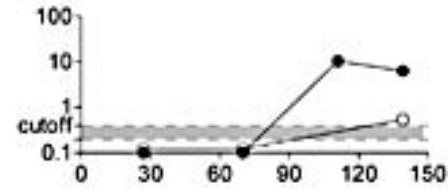
KİT hastaları Hasta 1



Hasta 2



Hasta3



● HCMV-spec CD4 (DC)
○ HCMV-spec CD4 (Ag)

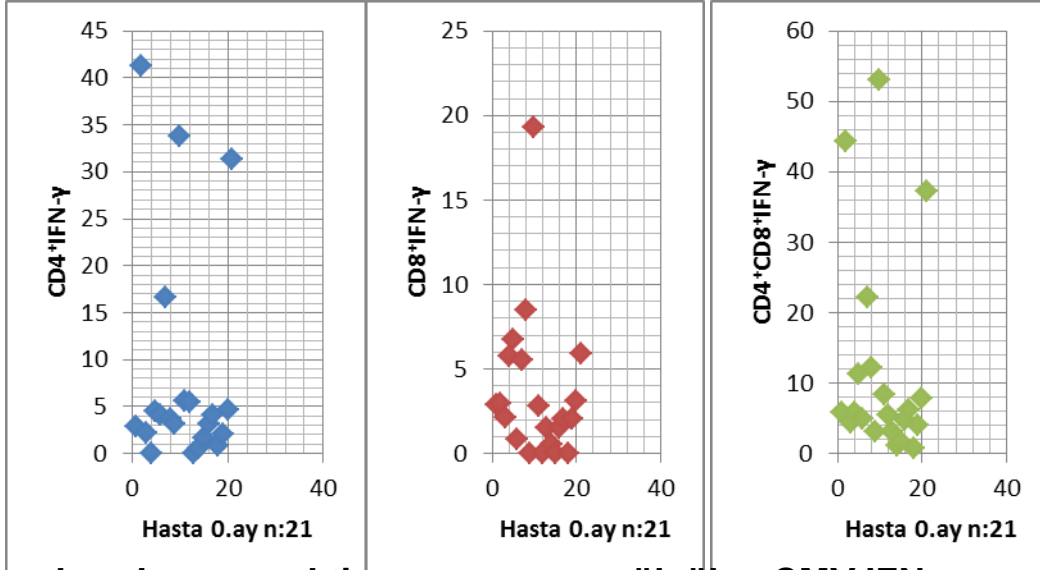
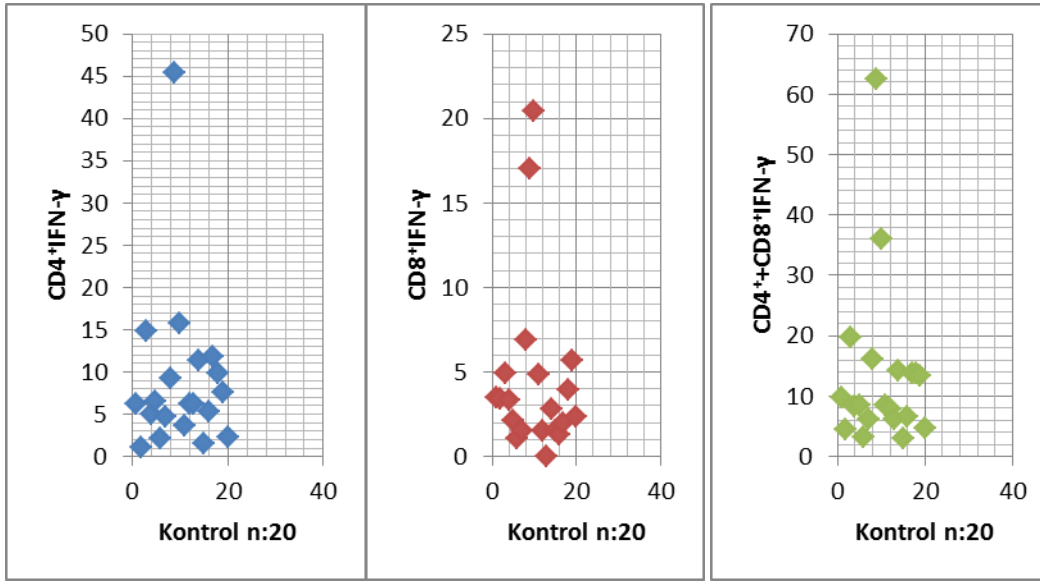
● HCMV-spec CD8 (DC)
○ pp65-spec CD8
○ IE-spec CD8

△ pp65-antigenemia
○ DNAemia
■ GCV treatment
□ PFA treatment

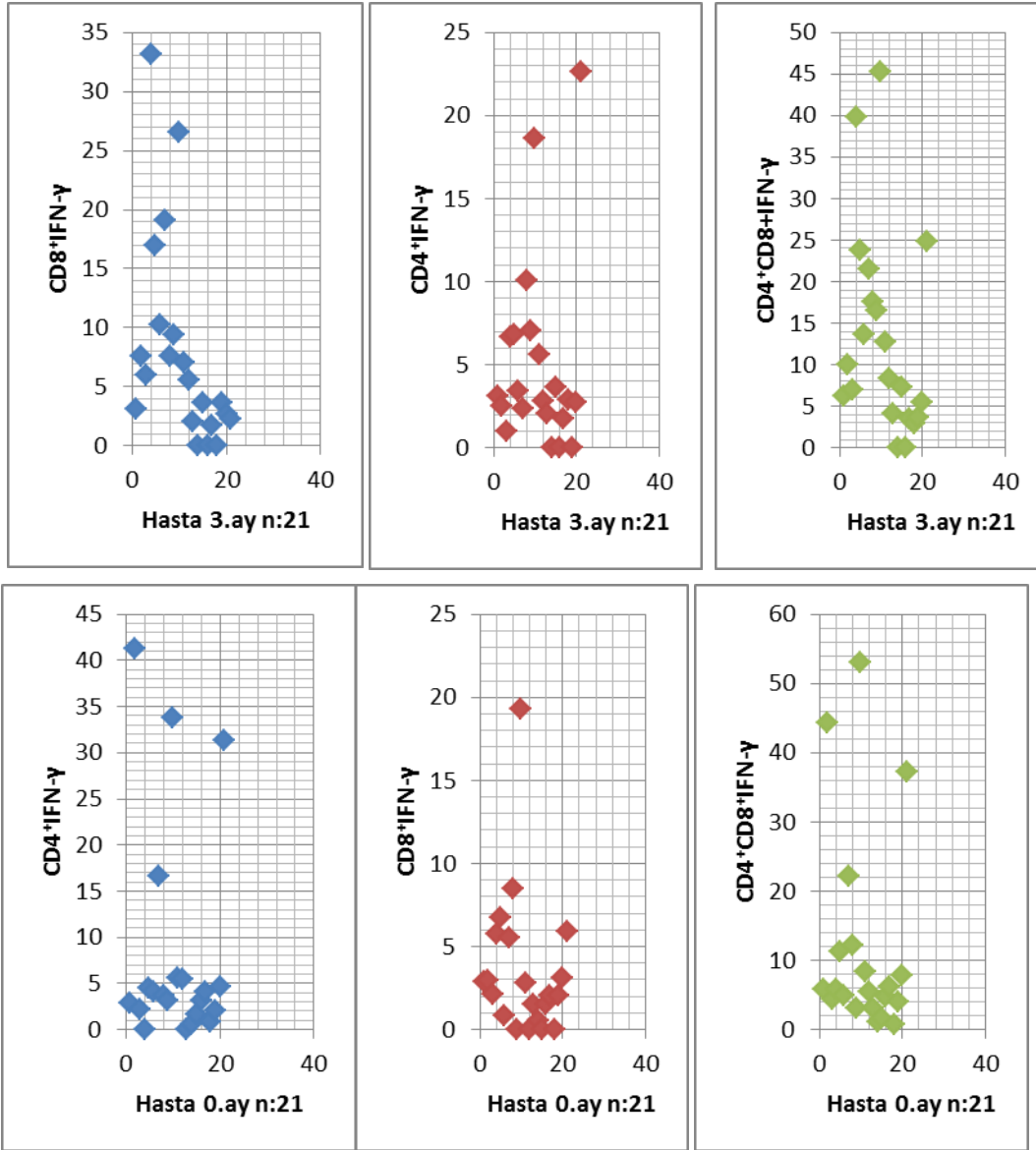
Viral stimülasyon :
DC ;
inaktive viral Ag;
pp65;
IE

CMV spesifik CD4+ ve CD8+ hücresel bağışık yanıt kinetikleri

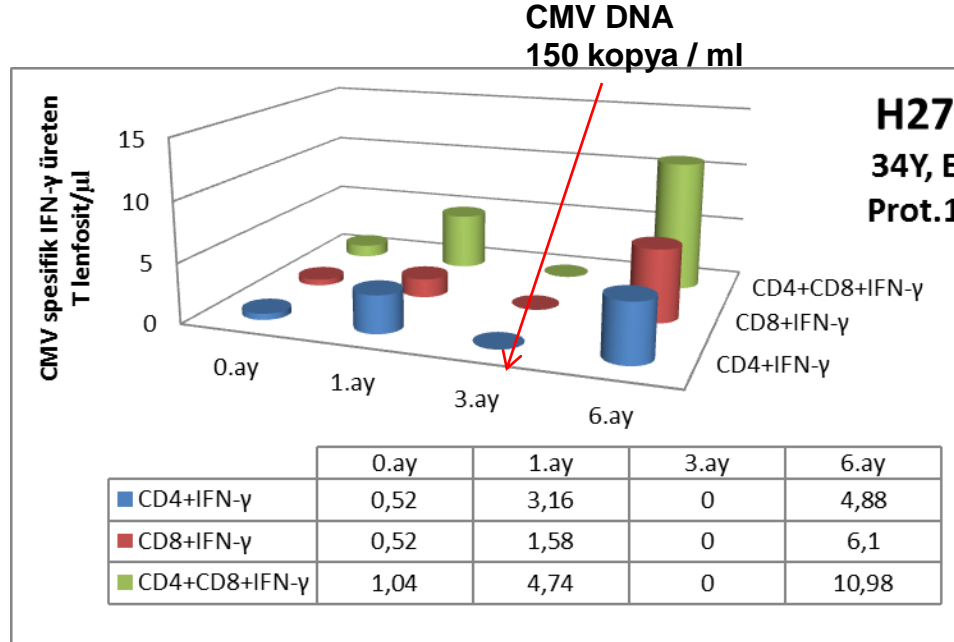
DC bazlı akış sitometri yönteminde CMV hücresel immunitenin yeniden yapılanması daha duyarlı monitorize edilebilir.



Kontrol ve hasta grubunda -0.ay- aktivasyon sonrası ölçülen CMV IFN-γ spesifik T lenfosit sayıları bakımından anlamlı fark yoktur.



3.ay CD4++CD8+IFN-γ T lenfosit sayısının 0. ve 1.ay CD4++CD8+IFN-γ T lenfosit sayısından daha düşük



Doğan HK. Sitomegalovirus spesifik T hücre yanıtının flow sitometri yöntemi ile optimizasyonu. Uzmanlık Tezi 2013; Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD

Akış sitometri (akan hücre ölçer) - hücresel bağışık yanıt izlemi-

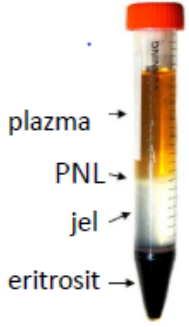


- **Hücre İçi Sitokin boyama:ölçümü referans yöntemdir.**
- **Hücrelerin fenotipik ve fonksiyonel analizi yapılır.**
- **8-10 saatte sonuç alınabilir.**

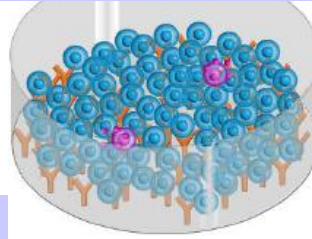
- **Pahalı cihaz donanımı..**
- **Emek yoğun..**
- **Deneyimli lab.ekibi**
- **Tüm aşamalarda standardizasyon sorunu**
 - Tam kandan izole edilen PKMNH dondurulup saklanabilir mi?
 - Lenfositlerin mediumda ink.süresi?
 - CMV peptid kokteyl hacmi ?
 - Stimülasyon süresi ?
 - Yıkama solüsyonu?
 - Ko stimülatör ?
 - Transport inhibitör?

ELISPOT (Enzyme-Linked Immunospot Assay) -hücresel bağışık yanıt izlemi-

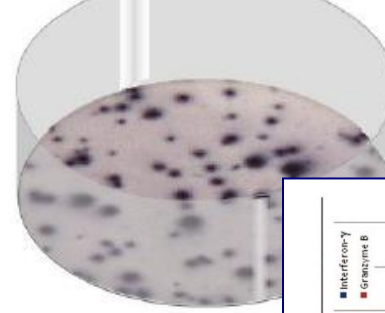
PKMNH izolasyonu



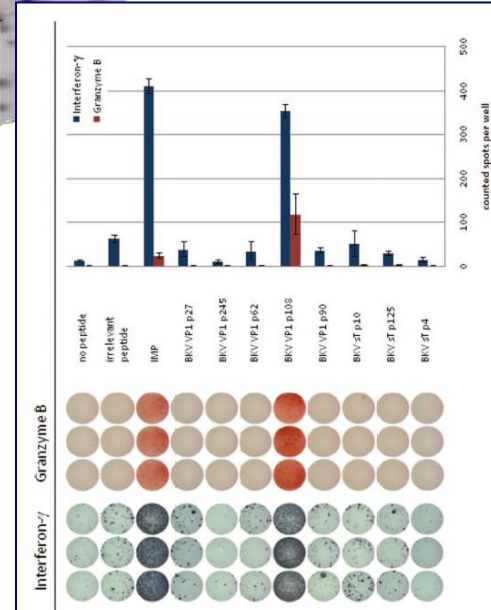
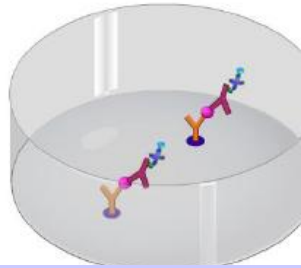
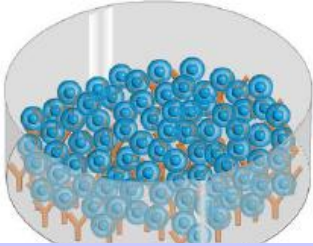
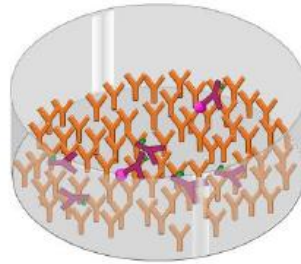
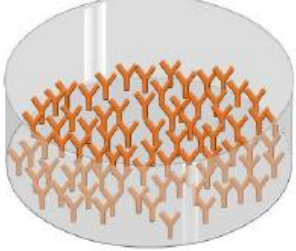
İnkübasyon....
Salınan özgül IFN- γ
monoklonal ak.tarafından yakalanır.



SFC (Spot Forming Colonies)
Spot oluşturan virusa özgül IFN- γ sentezleyen
T hc.sayısı / 2×10^5 - 10^6 mononükleer hücre



Solid faz üzerinde immobilize edilmiş
sitokin spesifik monoklonal ak.



Ag ;
mitojen ;
negatif kuyucuklara örnek ..

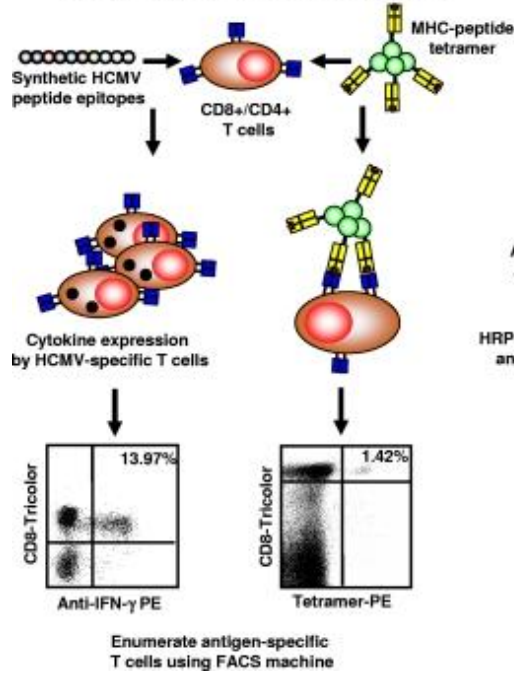
Enzimle konjuge antisitokin antikor
Substrat
Yıkamalar.....

IFN sentezleyen
spesifik T hc.
saptanabilmesi için T
hc. popülasyonunda
özgül T
en az % 0.002
oranında olmalı :

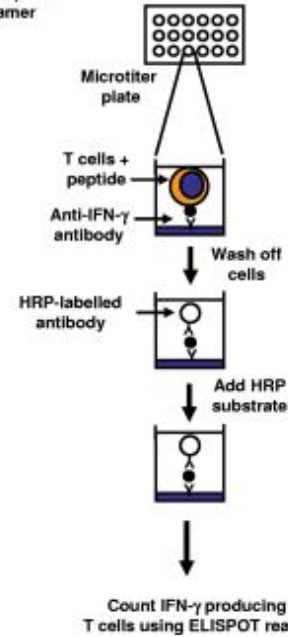
**40 özgül T / 10⁶
mononükleer hücre**

Akan hücre ölçer

MHC-peptide Tetramer and/or
intracellular cytokine-assisted analysis



ELISPOT



1 SFC / 10⁶ mononükleer hücre

Lesh A, et al. Methods 20013;31:143.

Crough T. Clin Microbiol 2009;22:76-98

Evaluation of polyomavirus BK cellular immune response by an ELISpot assay and relation to viral replication in kidney transplant recipients

Cristina Costa, Samantha Mantovani, Andrea Piccighello, Alessia Di Nauta, Franca Sinesi, Francesca Sidoti, Marina Messina¹, Rossana Cavallo

S.C. Microbiologia e Virologia U;
¹Unità Trapianto Rene, Azienda Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino, Italy

TABLE 1 - Results of virological and viro-immunological evaluation of polyomavirus BK in sthe tudy population of kidney transplant recipients.

Total Patients N = 149	Polyomavirus BK-DNA		
	Negative	Viremia	Viruria
BK-virus cellular immune response status			
Responder N = 14	14 (100%)	0	0
Non-responder N = 135	103 (76.3%)	12 (8.9%)	32 (23.7%)

BKV hücresel immün yanıt eşik değeri : 7 (5-23) SFU / 200 000 hücre

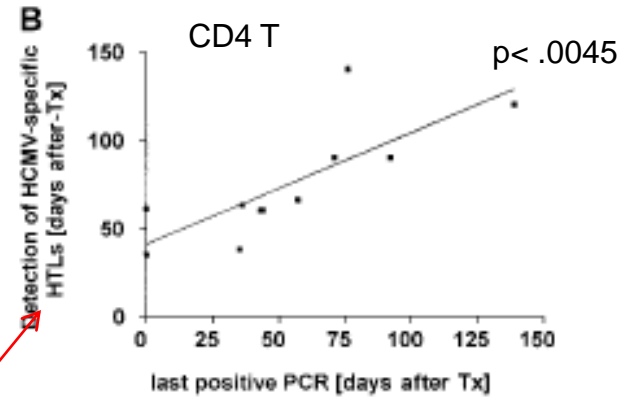
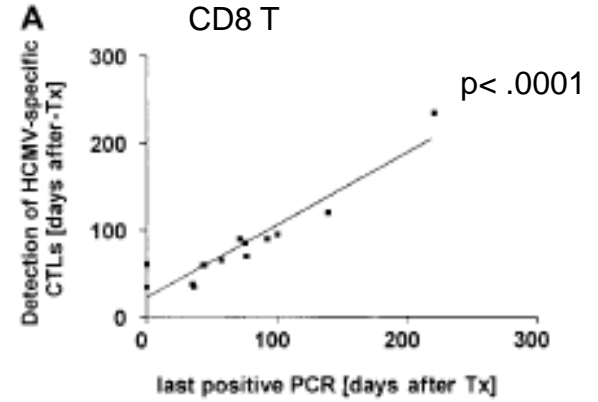
Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon- γ -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation

Holger Hebart, Senay Dagnik, Stefan Stevanovic, Ulrich Grigoleit, Andrea Dobler, Manuela Baur, Georg Rauser, Christian Sinzger, Gerhard Jahn, Juergen Loeffler, Lothar Kanz, Hans-Georg Rammensee, and Hermann Einsele

Hebart H, et al. Blood 2002; 99: 3830-7.

Allojenik kök hücre hastası 20,40,50,70,80,100. günlerde ,
CMV hücresel yanıt saptanamayan 8 hastayı 150 gün izlem...

Peptid spesifik CTL ELISPOT / ICS yöntemleri ;
CD4 T ICS ile araştırılmıştır.



CMV spesifik CD8 ve CD4 yeniden yapılanması ile vireminin temizlenmesi korele bulunmuştur.

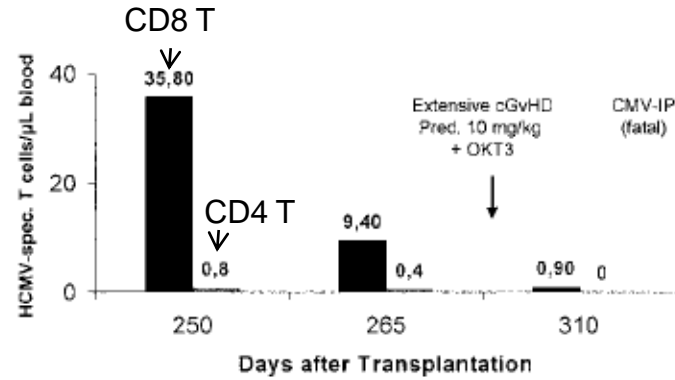
14 / 19 hasta : ort.90.(35-234) günde CMV -spesifik CTL : 0.14-60.6 hücre / μ l
11 / 18 hasta : ort.90.(35-180)günde CMV-spesifik CD4 T lenfositleri : 0.64-18.97 hücre / μ l

CMV hücresel bağışık yanıtın yeniden yapılanması / düzelmesi ile vireminin sonlanması arasında anlamlı ilişki var.

Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon- γ -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation

Holger Hebart, Senay Deginik, Stefan Stevanovic, Ulrich Grigoleit, Andrea Dobler, Manuela Baur, Georg Rauser, Christian Sinzger, Gerhard Jahn, Juergen Loeffler, Lothar Kanz, Hans-Georg Rammensee, and Hermann Einsele

Hebart H, et al. Blood 2002; 99: 3830-7.



Geç CMV hastalığı olanlarda :

ilk 3 aylık süre içerisinde CMV-protein spesifik T hücresi saptanmadı.



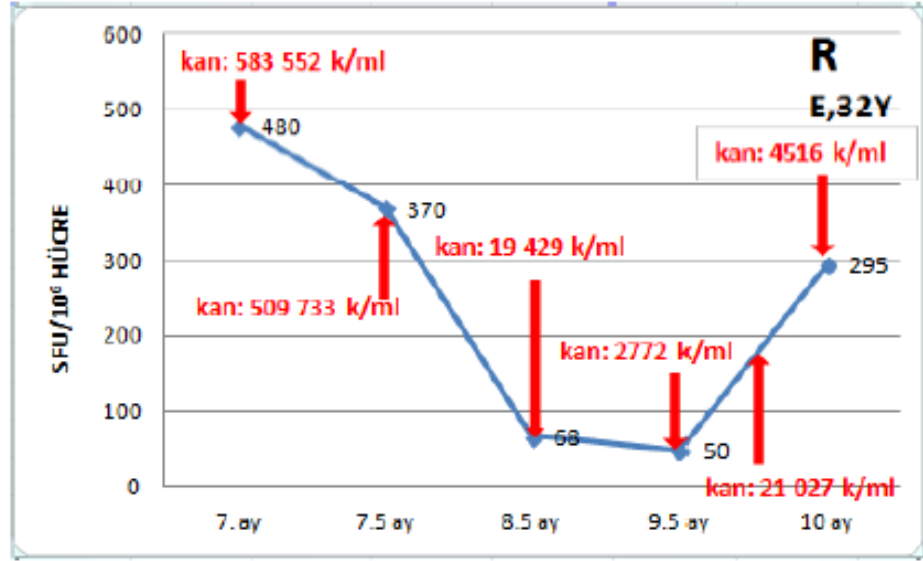
T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL İMMÜNOLJİ BİLİM DALI

RENAL TRANSPLANT HASTALARINDA BKV SPESİFİK İMMÜN YANITIN ELİSPOT YÖNTEMİ İLE ÖLÇÜLMESİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Üz. Dr. Esvet MUTLU

Antalya, 2014

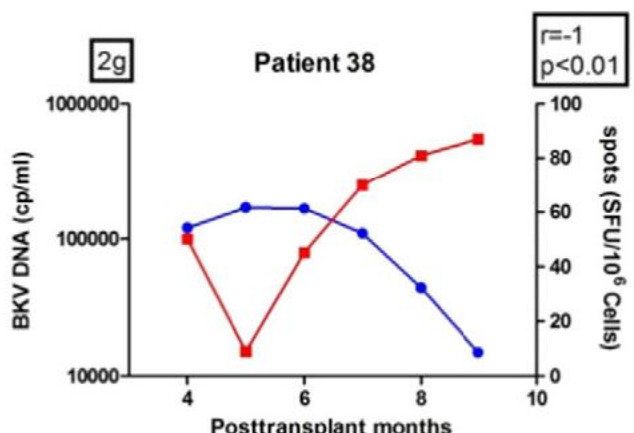
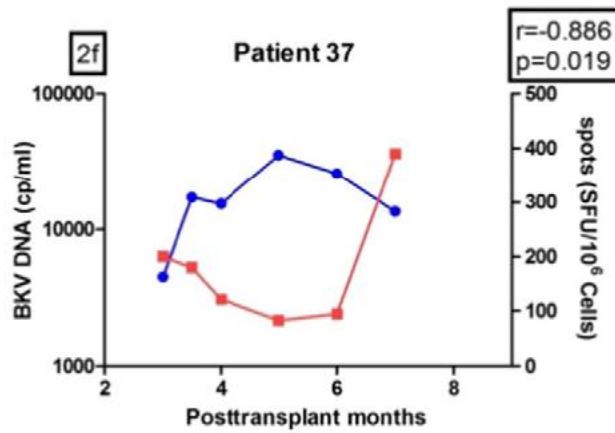
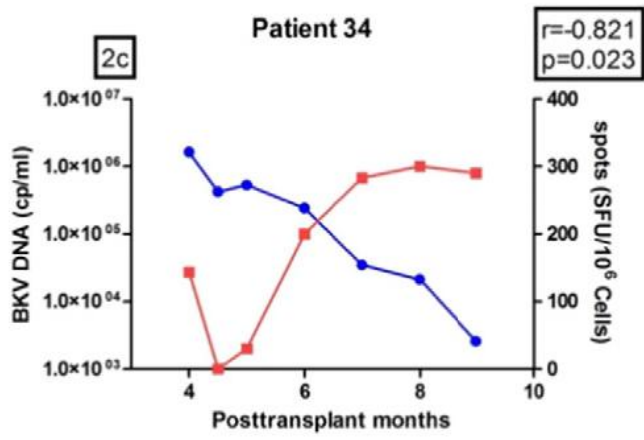
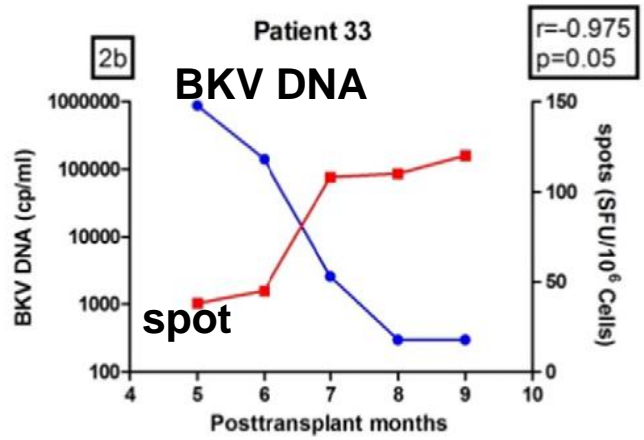


Şekil 4.4. Reaktivasyon gelişen olgunun BKV spesifik immün yanıt düzeyleri.

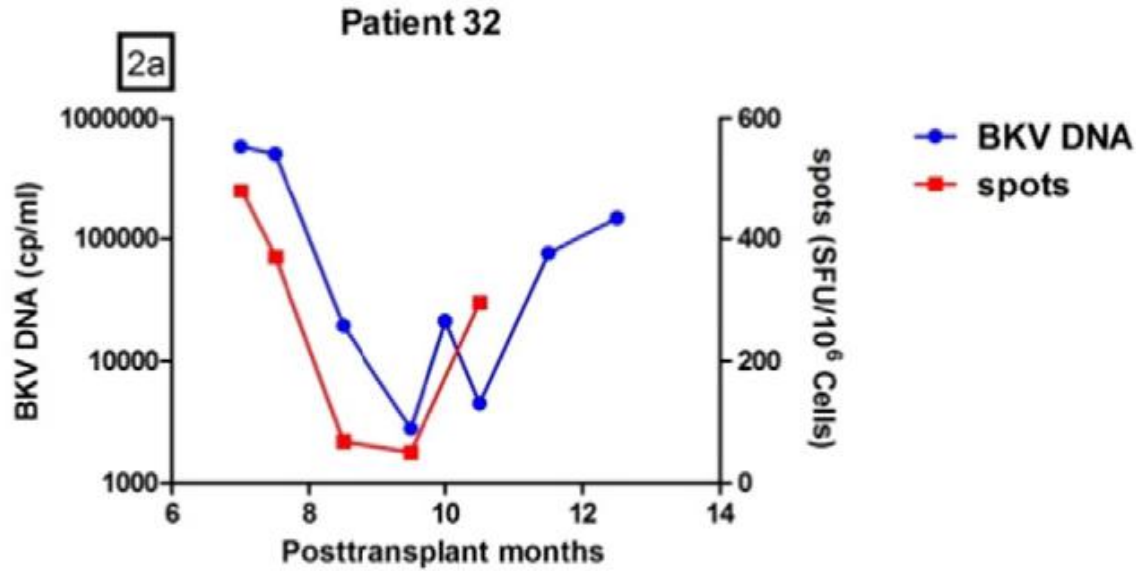


Quantitative analysis of BKV-specific CD4 + T cells before and after kidney transplantation☆

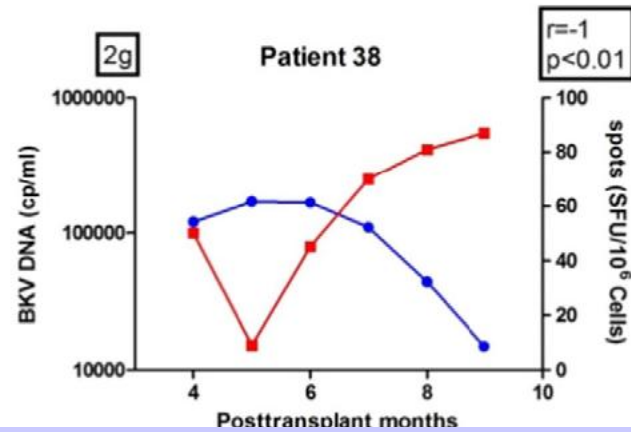
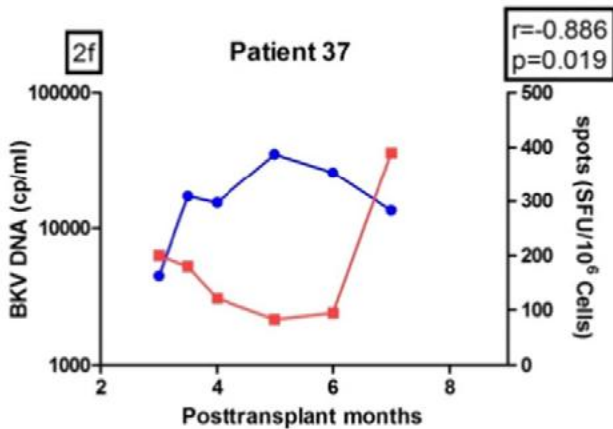
Esvet Mutlu ^{a,d,1}, Sadi Köksoy ^{a,d,*}, Derya Mutlu ^{a,2}, Vural T. Yılmaz ^{b,d,2}, Hüseyin Koçak ^{b,d,2}, Ayhan Dinçkan ^{c,d,2}, Gültekin Süleymanlar ^{b,d}, Meral Gültekin ^{a,3}



BKVN gelişmeyen reaktivasyon hastalarında BKV DNA düzeyleri ile spot sayıları arasında negatif



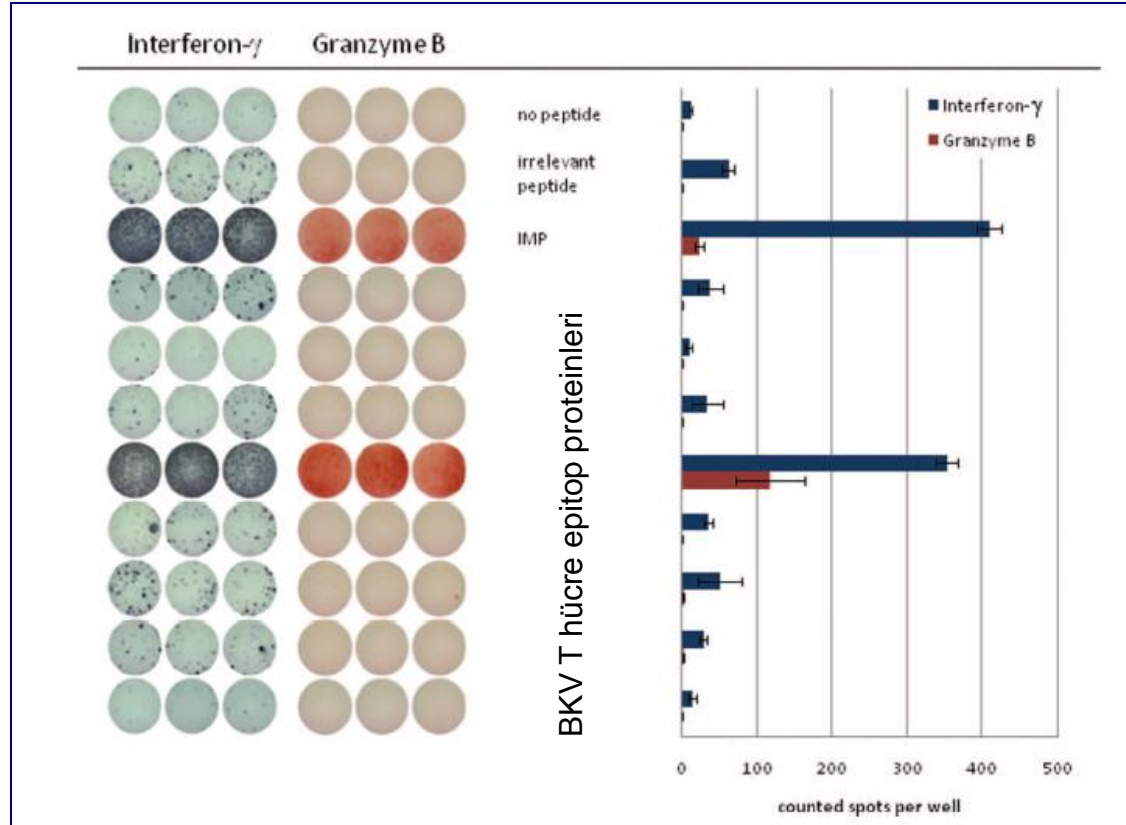
BKVN gelişen olguda negatif korelasyon yok.



BKVN gelişmeyen reaktivasyon hastalarında BKV DNA düzeyleri ile spot sayıları arasında negatif

Allojenik kök hücre nakil hastalarında hemorajik sistit gelişimi-immün dominant BKV peptid ?

Hemorajik sistit n : 5 ; kontrol grubu n: 25



Polyomavirus BK-specific CD8+ T cell responses in patients after allogeneic stem cell transplant

Leukemia & Lymphoma, June 2010; 51(6): 1055–1062

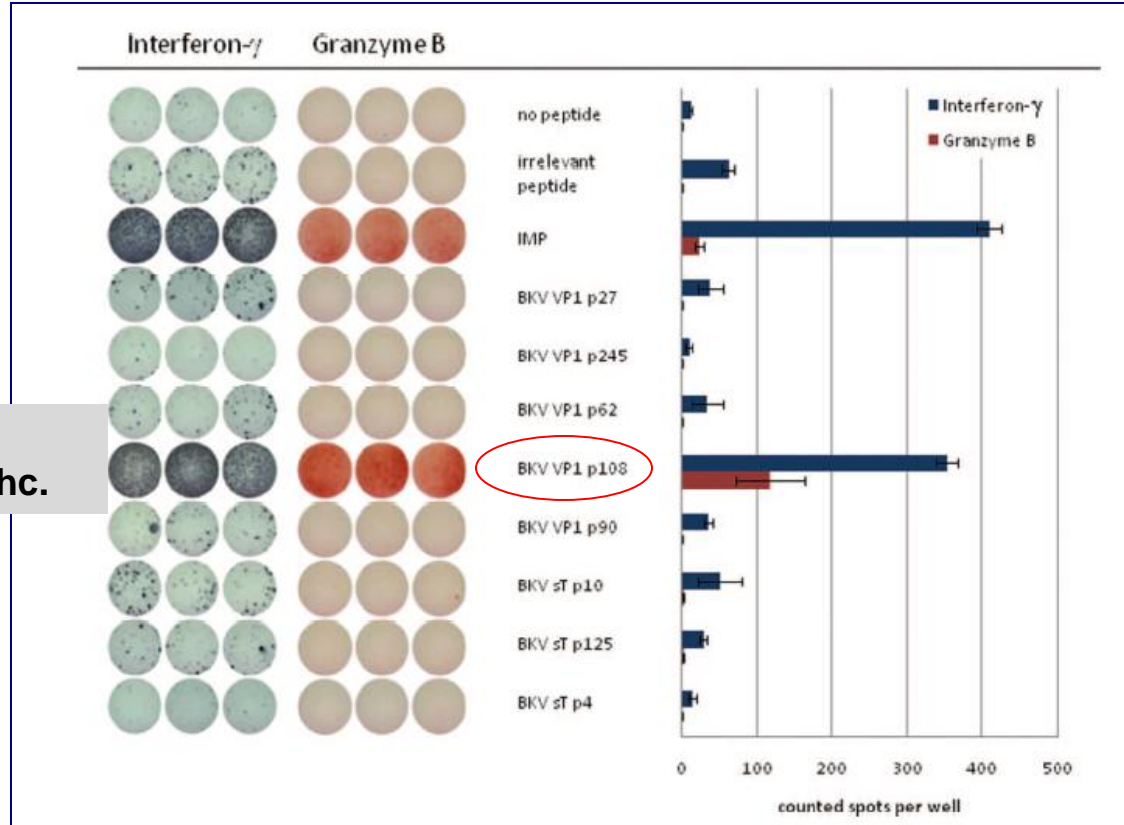
DOMINIK SCHNEIDAWIND¹, ANITA SCHMITT¹, MARKUS WIESNETH²,
THOMAS MERTENS³, DONALD BUNJES⁴, MATHIAS FREUND¹, &
MICHAEL SCHMITT¹

Allojenik kök hücre nakil hastalarında hemorajik sistit gelişimi-immün dominant BKV peptid ?

Hemorajik sistit n : 7; kontrol grubu n: 25

BKV peptid VP1 p108 ile stimüle edilmiş IFN- γ sentezleyen CD8 T hc.

Hastaların % 71
Kontrol grubunun % 28 ' inde..

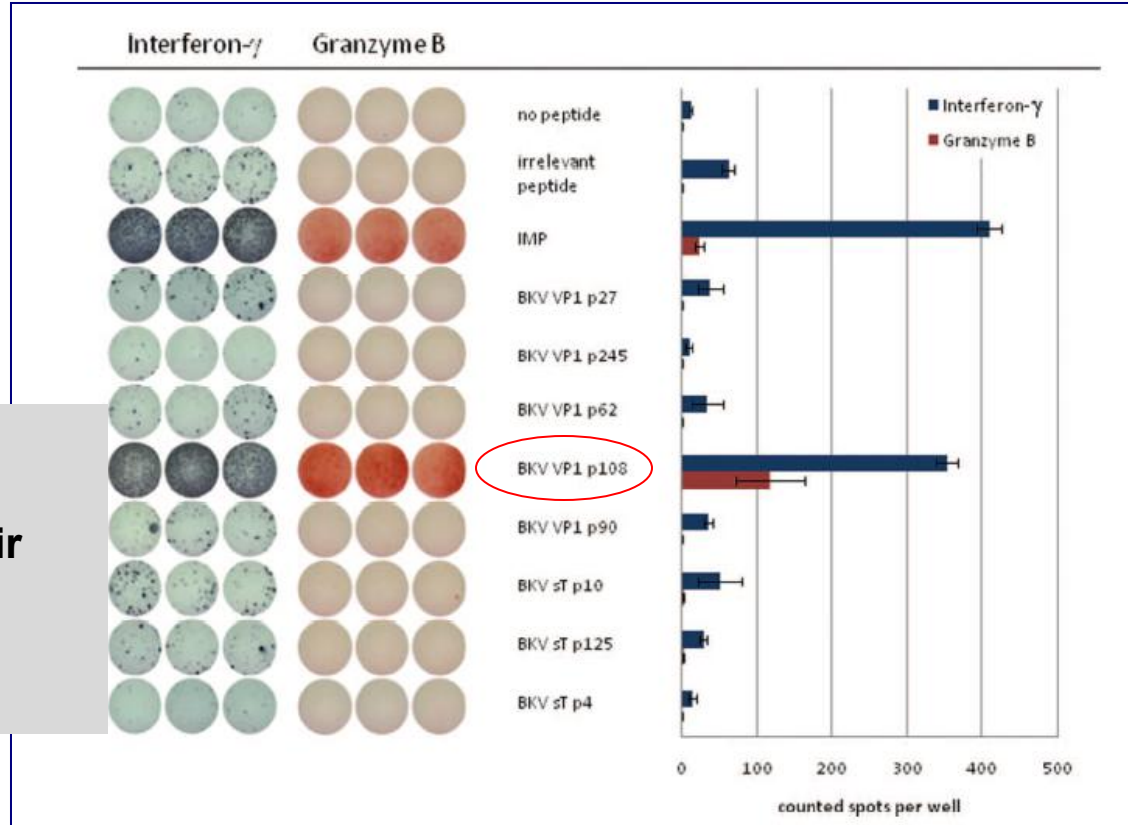


Polyomavirus BK-specific CD8⁺ T cell responses in patients after allogeneic stem cell transplant

Leukemia & Lymphoma, June 2010; 51(6): 1055–1062

DOMINIK SCHNEIDAWIND¹, ANITA SCHMITT¹, MARKUS WIESNETH²,
THOMAS MERTENS³, DONALD BUNJES⁴, MATHIAS FREUND¹, &
MICHAEL SCHMITT¹

Allojenik kök hücre nakil hastalarında hemorajik sistit gelişimi- immün dominant BKV peptid ?



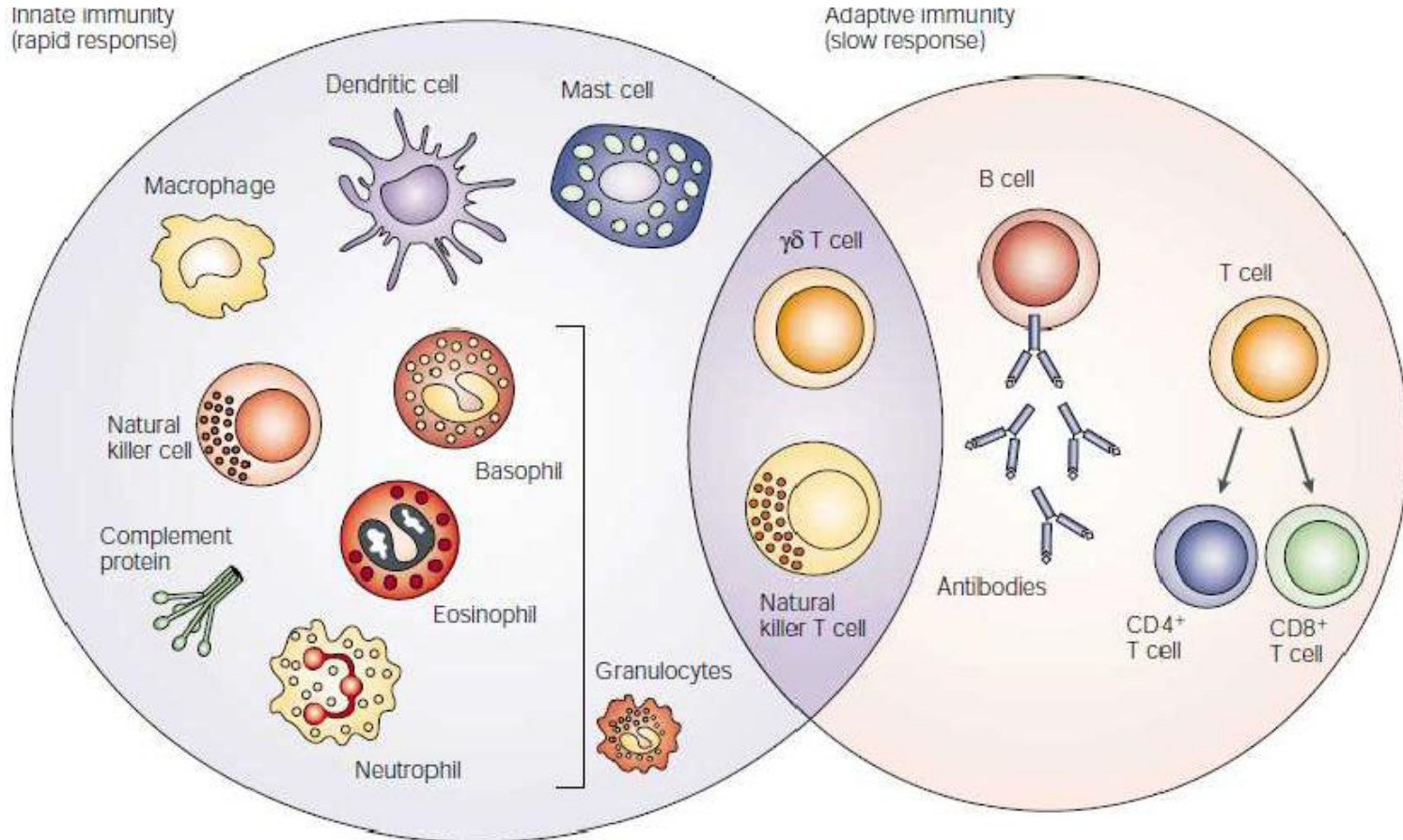
**BKV peptid VP1 p108 ;
nakil sonrası HS gelişiminde
immünolojik mekanizmada önemli bir
rolü vardır .
Gelecekte anti viral immünoterapide
önemli bir hedef olabilir.**

Polyomavirus BK-specific CD8+ T cell responses in patients after allogeneic stem cell transplant

Leukemia & Lymphoma, June 2010; 51(6): 1055–1062

DOMINIK SCHNEIDAWIND¹, ANITA SCHMITT¹, MARKUS WIESNETH²,
THOMAS MERTENS³, DONALD BUNJES⁴, MATHIAS FREUND¹, &
MICHAEL SCHMITT¹

CMV hastalığını öngörmede doğal ya da kazanılmış bağışık yanıtın hangi aktörü immünolojik bir belirteç ?



Relationship of Reconstituted Adaptive and Innate Cytomegalovirus (CMV)-Specific Immune Responses with CMV Viremia in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients



Michelle A. Barron¹, Dexiang Gao⁴, Kathryn L. Springer¹, Julie A. Patterson², Mark W. Brunvand⁵, Peter A. McSweeney⁵, Zeng Chang⁴, Anna E. Barón³, and Adriana Weinberg

Clin Infect Dis 2009 ;49:1777-1783.

n : 38 ;

LPA , ELISPOT, Akım sitometri , kazanılmış ve doğal bağışık yanıt...

Table 4. Association of Cytomegalovirus (CMV)-Immune Reconstitution with Lower Incidence of Viremia

Parameter	Odds ratio (95% CI)	P ^a
CMV stimulation index	8.49 (1.09–66.35)	.04 ^b
PWM stimulation index	1.29 (0.49–3.36)	.61
CD4+CD69+IFN+	2.80 (0.71–11.03)	.14
CD8+CD69+IFN+	0.89 (0.11–7.36)	.91
γδ+CD69+IFN+	2.32 (0.25–21.90)	.46
NK+CD69+IFN+	2.92 (1.05–8.14)	.04 ^b

Relationship of Reconstituted Adaptive and Innate Cytomegalovirus (CMV)-Specific Immune Responses with CMV Viremia in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients



Michelle A. Barron¹, Dexiang Gao⁴, Kathryn L. Springer¹, Julie A. Patterson², Mark W. Brunvand⁵, Peter A. McSweeney⁵, Zeng Chang⁴, Anna E. Barón³, and Adriana Weinberg

Clin Infect Dis 2009 ;49:1777-1783.

n : 38 ;

Table 4. Association of Cytomegalovirus (CMV)-Immune Reconstitution with Lower Incidence of Viremia

Parameter	Odds ratio (95% CI)	P ^a
CMV stimulation index	8.49 (1.09–66.35)	.04 ^b
PWM stimulation index	1.29 (0.49–3.36)	.61
CD4+CD69+IFN+	2.80 (0.71–11.03)	.14
CD8+CD69+IFN+	0.89 (0.11–7.36)	.91
γδ+CD69+IFN+	2.32 (0.25–21.90)	.46
NK+CD69+IFN+	2.92 (1.05–8.14)	.04 ^b

İlk 180 günde CMV-LPA yanıtı alınanlarda viremi riski daha az ve viremisi var ise vireminin temizlenmesi daha hızlı..

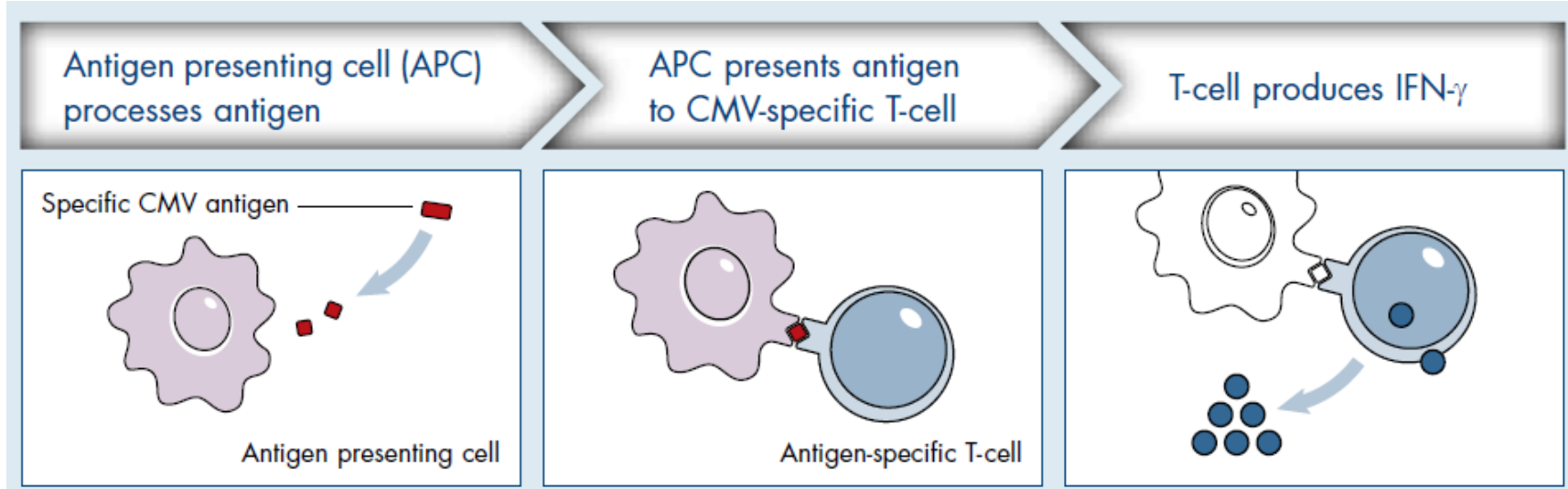
İlk 45 günde NK yapılanmasında düzelmeye CMV viremi gelişiminin önlenmesinde önemlidir.

ELISPOT- hücresel bağışık yanıt izlemi-



- Bir milyon PKMNH ' de sitokin sentezleyen tek lenfosit yakalanabilir.
- Çok sayıda örnek bir arada çalışılabilir. 24- 48 saatte sonuç alınır.
- Farklı sitokinler aynı deneyde çalışılabilir.
- Tekrarlanabilir.
- Ucuz, kolay...
- Standardizasyon sorunu
 - BKV antijenleri ? Kapsid proteinleri; erken proteinler, miks kokteyl..
 - Okuma aşamasında spotların büyüklük ve yoğunlukları ?
 - Eşik değerler ?

Quantiferon - hücresel bağışık yanıt izlemi -



- ✓ IGRA : Interferon Gamma Release Assay
- ✓ CMV peptidleri ile ex vivo uyarılan CD8⁺ T lenfositleri tarafından sentez edilen IFN- γ 'nın ELISA prensipleri ile tam kanda kantitasyonu (IU/ml)

Quantiferon - hücresel bağışık yanıt izlemi -

➤ QF-CMV CMV proteinlerinin CD8+ spesifik epitoplarını simüle eden , toplumun % 98 inden fazlasını kapsayan çeşitli HLA alellerinden CMV proteinlerinden elde edilmiş 22 peptid içerir.

➤ FDA onayı : Yok ; AB ' de onaylı

➤ Test aşamaları göreceli daha kolay ve ucuz

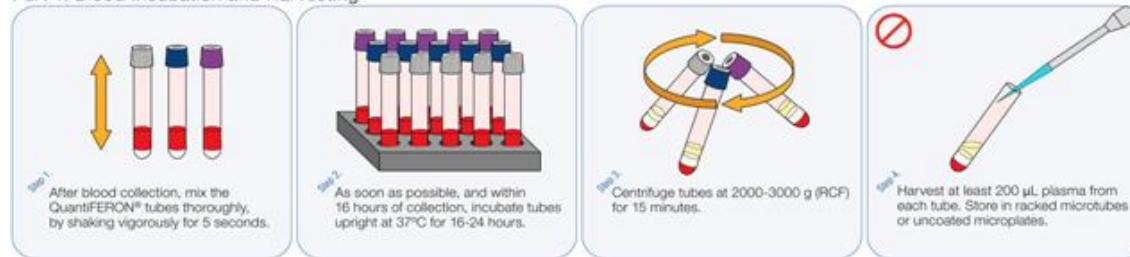
➤ Standart

➤ 18-24 saatte sonuç ..

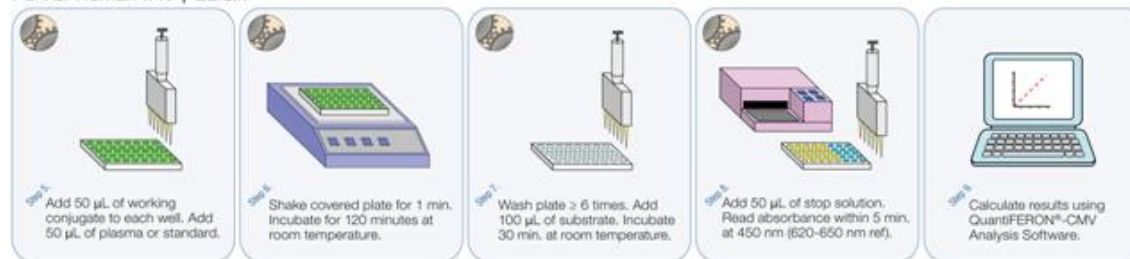
Peptide	Sequence	CMV Protein	HLA Restriction
1	VTEHDTLLY	pp50	A1
2	VLEETSVML	IE-1	A2
3	NLVPMVATV	pp65	A2
4	IMREFNSYK	gB	A3
5	AYAQKIFKIL	IE-1	A23 & A24
6	QYDPVAALF	pp65	A24
7	DIYRIFAEL	pp65	A26
8	TPRVTGGGAM	pp65	B7
9	QIKVRVDMV	IE-1	B8
10	ARVYEIKCR	pp28	B27
11	CPSQEPMSIVVY	pp65	B35
12	ELRRKMMYM	IE-1	B8
13	FEQPTETPP	IE-2	B41
14	QEFFWDANDI	pp65	B44
15	QAIRETVEL	pp65	B57 & B58
16	QMWQARLTV	pp65	B52
17	PTFTSQYRIQGKL	pp65	A24
18	GPISGHVLK	pp65	A11
19	DALPGPCI	pp65	B51
20	KMQVIGDQY	pp65	B40/B60
21	CEDVPSGKL	pp65	B40/B60
22	TRATKMQVI	pp65	Cw6 (A30/B13)

Quantiferon - CMV-

Part 1. Blood Incubation and Harvesting



Part 2. Human IFN- γ ELISA



"CMV Antigen" minus "Nil" (IU/mL)	"Mitogen" minus "Nil" (IU/mL)	QF-CMV Result	QF-CMV Result Interpretation
< 0.2	≥ 0.5	Non Reactive	Anti-CMV immunity NOT Detected
≥ 0.2	Any	Reactive	Anti-CMV immunity Detected
< 0.2	< 0.5	Indeterminate	Result indeterminate for CMV responsiveness

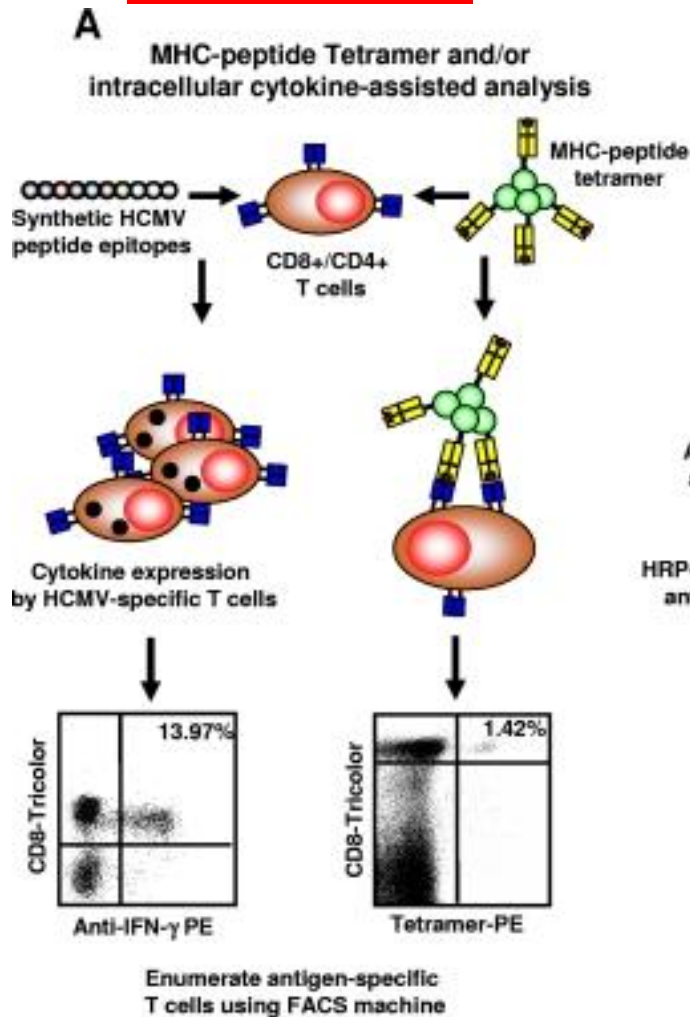
271 örnek , sonuçların % 32 ' si ' indeterminate '

Fleming T, et al.J Med Virol 2010;82:433.

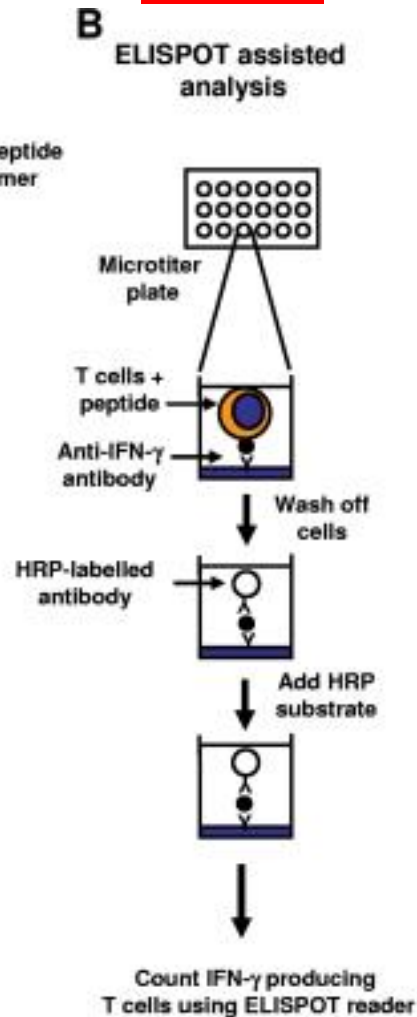
90 örnek , sonuçların % 20 ' si ' indeterminate '

Clari MA,et al.CVI 2012;19:791.

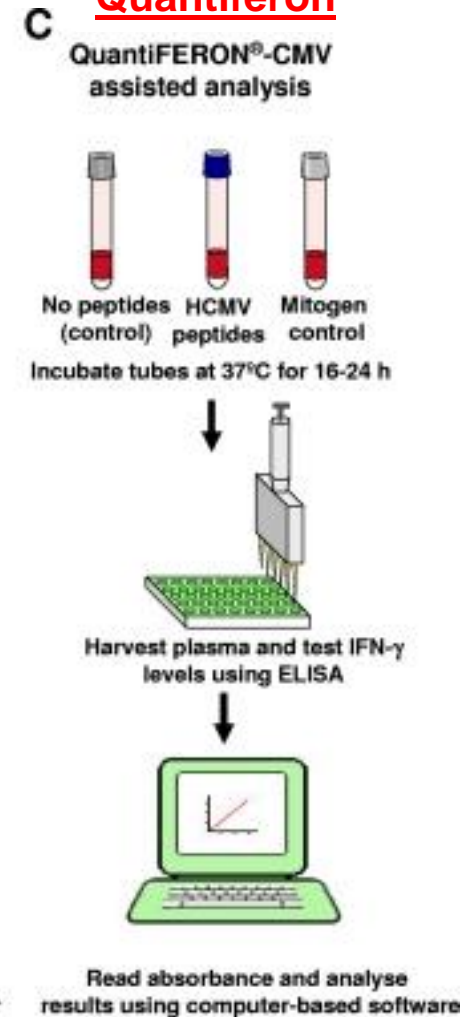
Akan hücre ölçer

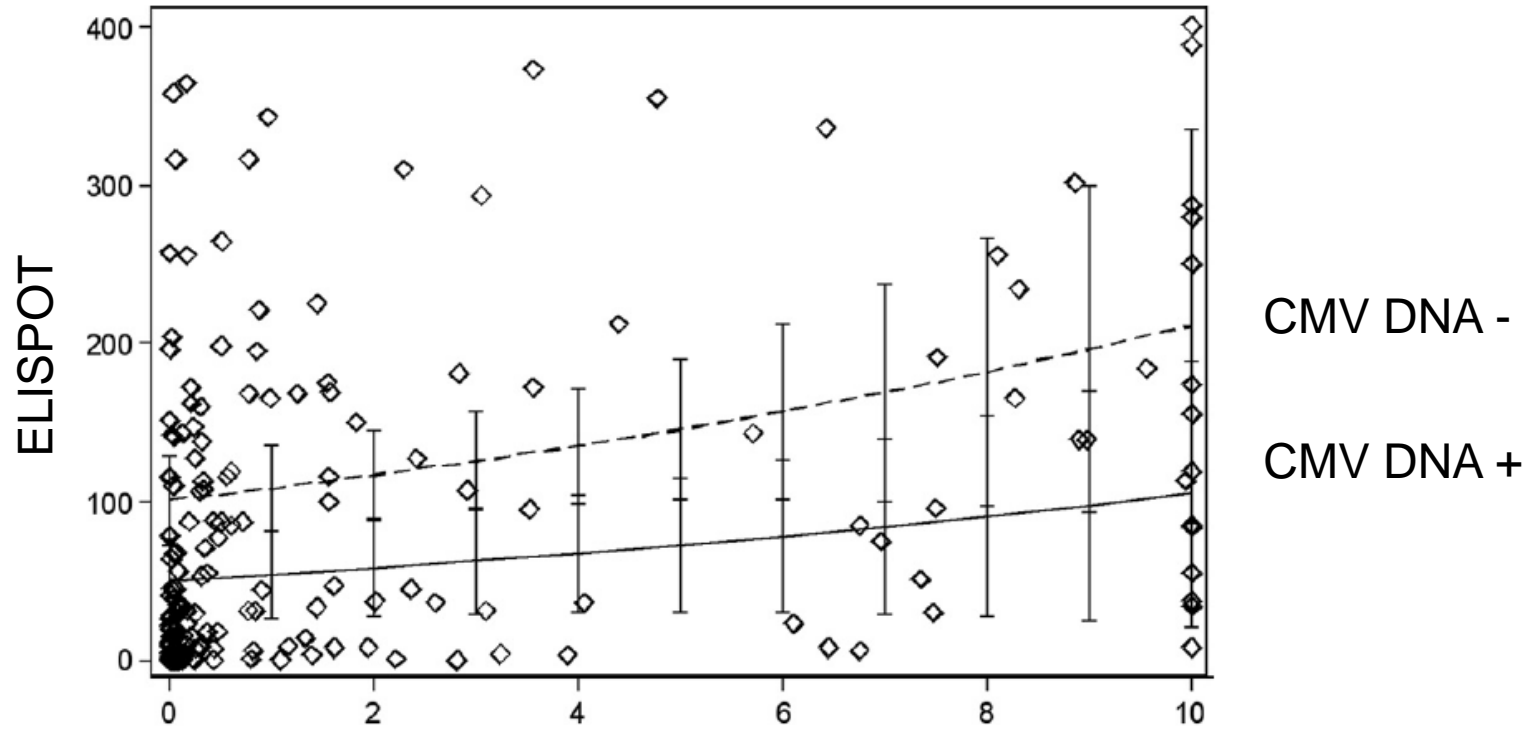


ELISPOT



Quantiferon





QuantiFERON-CMV ve ELISPOT korelasyonu : $p < 0.037$

Testlerin HCMV DNA ile korelasyonu: $p < 0.017$

Performance of the QuantiFERON-Cytomegalovirus (CMV) Assay for Detection and Estimation of the Magnitude and Functionality of the CMV-Specific Gamma Interferon-Producing CD8⁺ T-Cell Response in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients

Maria Angeles Clari,^a Beatriz Muñoz-Cobo,^a Carlos Solano,^{b,c} Isabel Benet,^{b,c} Elisa Costa,^a Maria José Remigia,^b Dayana Bravo,^a Paula Amat,^b and David Navarro^{a,d}

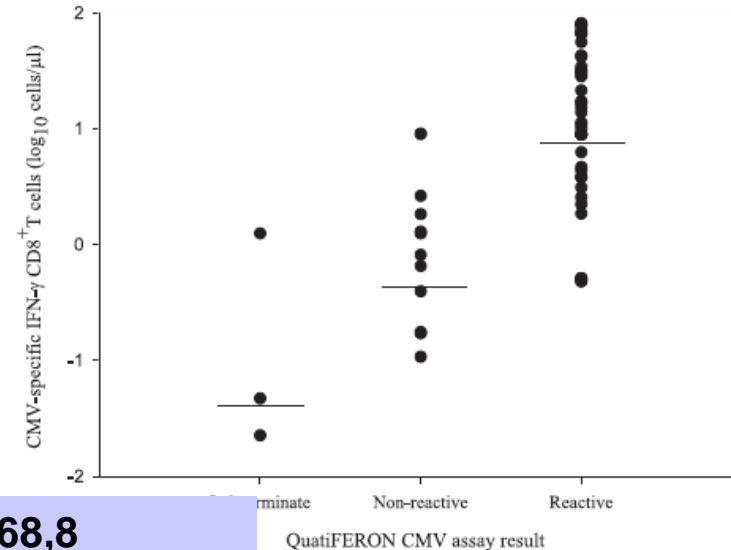
Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain^a; Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain^b; Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^c; and Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^d

n : 23

Clin. Vaccine Immunol. 2012, 19(5):791.

TABLE 1 Detection of cytomegalovirus-specific IFN- γ -producing CD8⁺ T cells by ICS and the QuantiFERON-CMV assay in whole-blood specimens from allogeneic stem cell transplant recipients

Result of ICS method (no. of specimens)	No. of specimens with QuantiFERON-CMV assay result of:		
	Positive	Negative	Indeterminate
Positive (55)	42	10	3
Negative (35)	1	20	14



QuantiFERON – CD8 T Sitokin akış sitometri Uyum : % 68,8
($\kappa=0,695$; 95% confidence interval [CI], 0.548 to 0.835)

QuantiFERON-CMV duyarlık : % 76.3

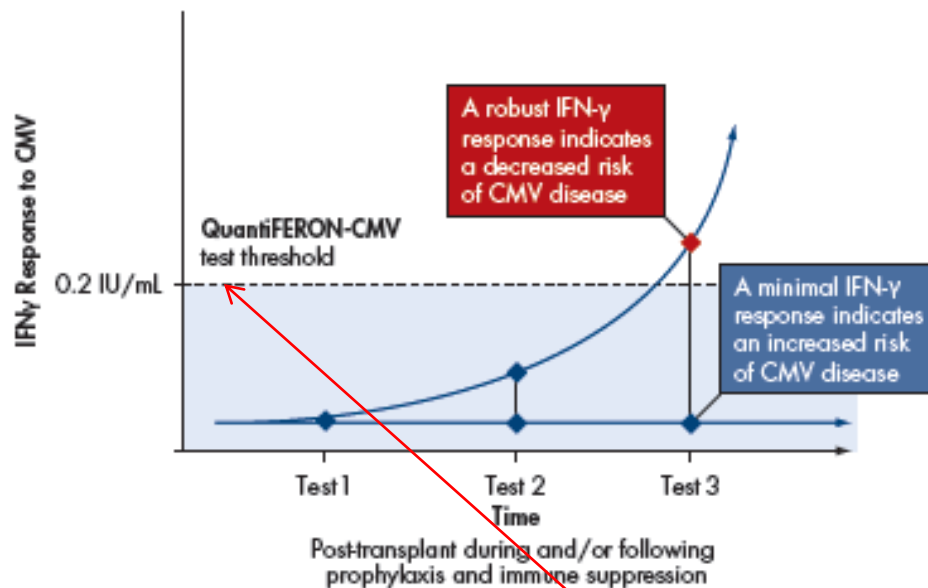
Performance of the QuantiFERON-Cytomegalovirus (CMV) Assay for Detection and Estimation of the Magnitude and Functionality of the CMV-Specific Gamma Interferon-Producing CD8⁺ T-Cell Response in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients

Maria Angeles Clari,^a Beatriz Muñoz-Cobo,^a Carlos Solano,^{b,c} Isabel Benet,^{b,c} Elisa Costa,^a Maria José Remigia,^b Dayana Bravo,^a Paula Amat,^b and David Navarro^{a,d}

Microbiology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain^a; Hematology and Medical Oncology Service, Hospital Clínico Universitario, Valencia, Spain^b; Department of Medicine, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^c; and Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain^d

Clin. Vaccine Immunol. 2012, 19(5):791.

A theoretical model of QuantiFERON-CMV responses



QuantiFERON-CMV duyarlık : % 76.3

Eşik değeri 0.1 IU / ml : duyarlık : % 81.8

Pretransplant Interferon- γ Secretion by CMV-Specific CD8+ T Cells Informs the Risk of CMV Replication After Transplantation

S. Cantisán^{1*}, R. Lara¹, M. Montejo²,
J. Redel³, A. Rodríguez-Benot⁴,
J. Gutiérrez-Aroca⁵, M. González-Padilla¹,
L. Bueno⁶, A. Rivero¹, R. Solana¹,
J. Torre-Cisneros¹

Article first published online: 11 JAN 2013

DOI: 10.1111/ajt.12049

Issue



American Journal of
Transplantation

Volume 13, Issue 3, pa
738–745, March 2013

In this prospective study we analyzed pretransplant interferon- γ secretion by cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells to assess its possible utility in determining the risk of CMV replication after solid organ transplantation. A total of 113 lung and kidney transplant patients were enrolled in the study but only 55 were evaluable. All CMV-seronegative recipients were pretransplant "nonreactive" (IFN γ <0.2 IU/mL) (11/11), whereas 30/44 (68.2%) CMV-seropositive (R+) recipients were "reactive" (IFN γ \geq 0.2 IU/mL) and 14/44 (31.8%) were "nonreactive". In the R(+) "nonreactive" group, 7/14 (50%) developed posttransplant CMV replication, whereas the virus replicated only in 4/30 (13.3%) of the R(+) "reactive" patients ($p = 0.021$). According to the best multivariate model, pretransplant "nonreactive" recipients receiving an organ from a CMV-seropositive donor had a 10-fold increased risk of CMV replication compared to pretransplant "reactive" recipients (adjusted OR 10.49, 95% CI 1.88–58.46). This model displayed good discrimination ability (AUC 0.80) and calibration (Hosmer–Lemeshow test, $p = 0.92$). Negative and positive predictive values were 83.7% and 75%, respectively. The accuracy of the model was 82%. Therefore, assessment of interferon- γ secretion by cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells prior to transplantation is useful in informing the risk of posttransplant CMV replication in solid organ transplant patients.

Ac,böbrek tx n:55 (44 : seropozitif)

Seropozitiflerin %68 i reaktif (>0.2 IU / mL)

Non reaktiflerin yarısında CMV replikasyonu

Reaktiflerin %13 ünde CMV replikasyonu....

Tx öncesi CMV CD 8+ IFN- γ <0.2 IU / mL ise reaktivasyon riski 10 kez fazla

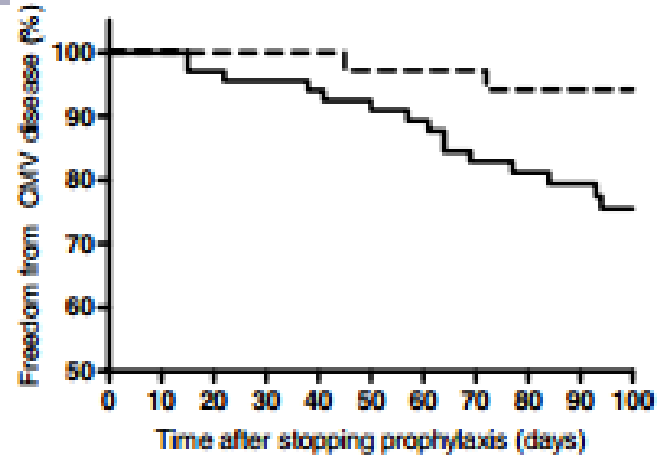
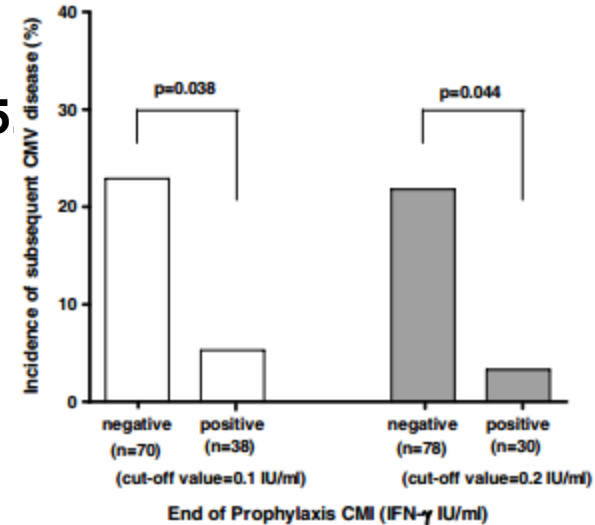


Figure 4: Time to development of CMV disease in patients with a positive (dashed line) versus negative (solid line) cell-mediated immunity result (cut-off 0.1 IU/mL of interferon- γ) at the end of prophylaxis ($p = 0.028$) (excludes four patients who remained on prophylaxis throughout the 6-month study period).



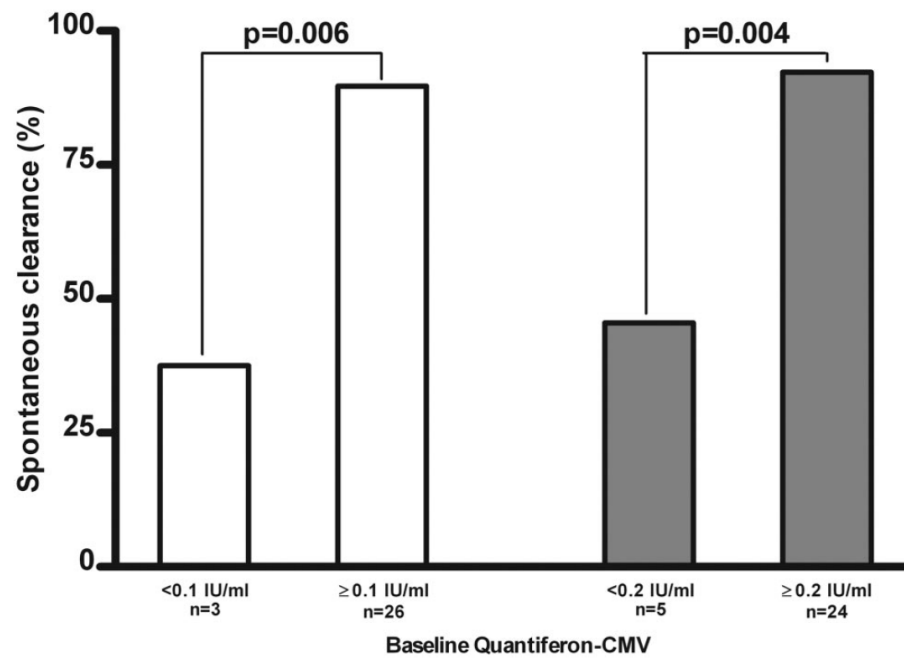
•108 SOT hasta ,% 68 seropozitif

•Proflaksi tamamlandıktan sonra

•38 Hastada IFN- γ : \geq 0.1 IU / mL

•Saptanabilir yanıtı olan hastaların sadece 2 sinde (% 5 CMV hastalığı gelişti

•CMV spesifik IFN- γ saptanmayan grupta CMV hastalığı gelişme : % 22. 9



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

T. Fleming,^{1,2} J. Dunne,³ and B. Crowley^{1,2,4*}

Allojenik kök hücre n: 43 D-/ R⁺ n:18, D⁺/ R⁺ n:17, D⁺/ R⁻ n:8 ; hematolojik kanser n:29

İzlem : Nakil sonrası ilk 100 gün haftada bir (CMV DNA PCR + ise haftada 2 , tek + CMV DNA : Preemptif tedavi

Yüksek risk grubunda ort.48 gün sonra CMV enf.

Yüksek ve orta risk grubunda CMV DNA saptandığında CMV spesifik IFN- γ mevcut değil.

Geç CMV hastalığı gelişenlerde CMV spesifik immünite yapılanması / iyileşmesi / düzelmesinde gecikme mevcut.

Akraba olmayandan nakil yapılanlarda kardeşten yapılanlara göre CMV spesifik immün yanıtta gecikme (ort.200 ve 58 gün)

Prospective study of anti-CMV specific immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation with the CMV Quantiferon method. Preliminary results.

Eirini Grispou¹, Stavros Gigantes², Ioannis Baltadakis², Eugenia Xenou², Aikaterini Xirokosta², Panagiotis Vlachos², Ioannis Apostolidis², Dimitrios Karakasis², Kimon Foundoulis¹, Nicholas Harhalakis²

¹Microbiology Department, ²BMT Unit, Evangelismos General Hospital, Athens, Greece

n : 26 Quantiferon CMV : Nakil öncesi ve ayda bir ; viral yük :

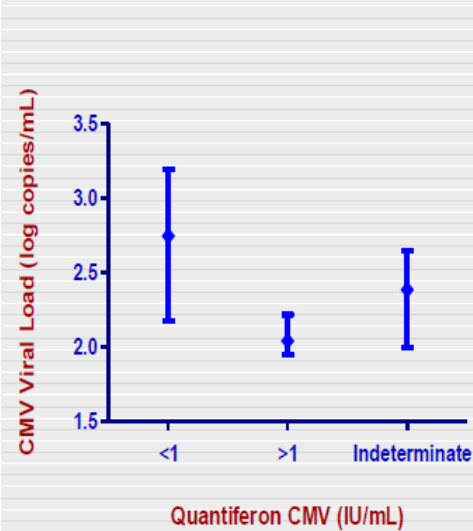


Diagram 1: Quantiferon-CMV levels and viral load

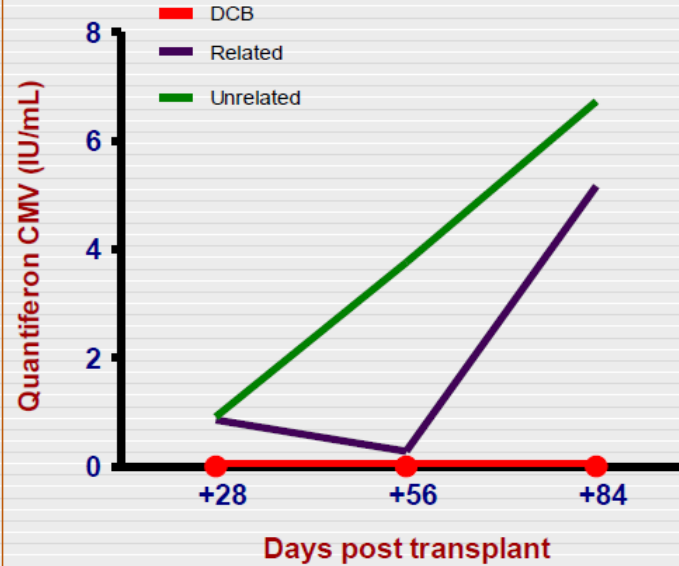


Diagram 2: Median value of Quantiferon-CMV at the first trimester

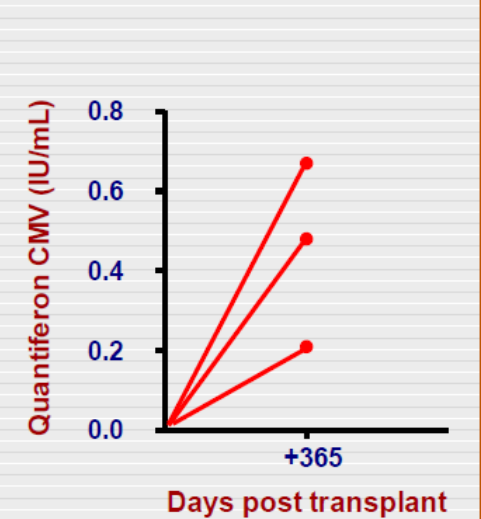


Diagram 3: Quantiferon-CMV levels in cord blood recipients after a year

Seropozitif alıcıların nakil öncesi CMV hücresel immünite : > 10 IU / ml

CMVI > 1IU / ml n: 9 :CMV reaktivasyonu gelişmedi, ya da düşük viral yük ...tedavi gereksinimi olmadı.

CMVI yapılanması olmayan grupta n: 8 : Yüksek viral yük ; 1 i hasta

Kord kan alıcısında (n:3) 3 aylık süreçte CMV immünitesinde yapılanma / düzelleme gerçekleşmedi.1 yıl sonra ancak 1 hastada 0.67 IU / ml.

CMV specific cytokine release assay in whole blood is optimized by combining synthetic CMV peptides and toll like receptor agonists

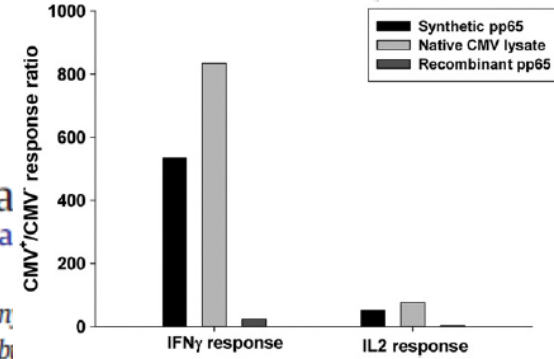
Werner Dammermann ^{a,*}, David Bochmann ^{a,1}, Frank Bentzien ^b, La Katja Steinhagen ^d, Sebastian Ullrich ^c, Jan van Lunzen ^a, Stefan Lüth ^a

^a Department of Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany

^b Department of Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg

^c Department of Anatomy and Experimental Morphology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

^d Institute of Experimental Immunology, Euroimmun AG, Seekamp 31, 23560 Lübeck, Germany



Journal of Immunological Methods 414 (2014) 82-90

Sitokin salınım testlerinin duyarlılığını artırma amacı ile

Sağlıklı kişilerde n: 397

CMV peptid, nativ lizat, rekombinant ag. ler....

Test protokoluna.TLR agonistleri eklendi

En iyi sitokin yanıtı : Sentetik pp65 ve nativ CMV lizati ile alınmıştır.

En iyi ko stimulanlar

Characteristics of all TLR agonists included in the study.

Characteristics		
Name	Receptor	Localization
Lipopolysaccharide (LPS)	TLR4	Cell surface
Lipoteichoic acid (LTA)	TLR2	Cell surface
Peptidoglycan (PGN)	TLR2	Cell surface
Zymosan (Zym)	TLR2 and 6	Cell surface
Poly(I:C)	TLR3	Intracellular
Flagellin (Fla)	TLR5	Cell surface
R848	TLR7 and 8	Intracellular
Loxoribine (Lox)	TLR7	Intracellular
Bropirimine (Bro)	TLR7	Intracellular

Quantiferon CMV - hücresel bağışık yanıt izlemi-

- **24-48 saatte sonuç alınır.**
- **Duyarlık : % 76**
- **Standart**
- **Kolay**
- **Ekipman gereksinimi çok az**

- **3 ayrı tüpte tam kan gereksinimi vardır.**
- **T hücrelerinin fenotipik analizi yapılamaz.**

Projenin Başlığı	Pediyatrik Kök Hücre Transplantasyon Hastalarında CMV Spesifik İmmün Yanıtın İzlenmesi
Proje Yürütücüsü	Prof Dr. Meral Gültekin
Araştırmacı(lar)	Uzm.Dr. Gül Aydın Tıǒlı
Proje Türü	Yan Dal Uzmanlık Projesi

n : 20 30, 45 , 60, 90. günlerde,

- CMV inf. ve hastalığını öngörmeye değeri ?
- CMV hastalığı tedavisi tamamlandıktan sonra tekrarlayan viremi riski ?
- Geç dönem CMV enfeksiyonu riski ?
- Düşük düzeyde viremi olan hastalarda vireminin kendiliğinden düzelmesi ya da hastalık gelişme riski ?



Hücresel bağışık yanıtın yeniden yapılanmasının izlemi

- ✓Viral yük izlemi ile birlikte.... tamamlayıcı bir testtir.
- ✓Kişinin viral etkene karşı immün yanıt kapasitesini belirler.
- ✓Risk gruplarını belirlemede önemli bilgiler verir.

- ✓İmmün yanıt kinetikleri
- ✓Viral patogeneze ilişkin bilgiler artacaktır.

- ✓Proflaksinin süresi ile ilgili yeni değerlendirmeler yapılacaktır.
- ✓Preemptif – tedavi algoritmaları yeniden değerlendirilecektir.
- ✓Bağışık yanıtı yapılanmış olanlarda daha kısa süre: İlaç toksik etkilerinde , maliyette azalma , ilaç direnci gelişmesinde azalma
- ✓Anti viral direnç önlenmesi stratejilerinde yer alacaktır.

- ✓Edinsel T hücre naklinden yararlanacakların belirlenmesi
- ✓Hafıza hücresel immün yanıtı canlandıracak olan CMV aşısı çalışmalarında yol gösterici olacaktır.



Kök hücre nakil hastalarında
viral özgül hücresel bağışık yanıtın izlemi
tanı, tedavi algoritmalarında gelişmelere neden olacaktır.



Kök hücre nakil hastalarında
viral özgül hücresel bağışık yanıtın izlemi
tanı, tedavi algoritmalarında gelişmelere neden olacaktır.
Geniş klinik araştırmalara gereksinim vardır.

[Transplantation](#), 2013 Aug 27;96(4):333-60. doi: 10.1097/TP.0b013e31829df29d.

Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation.

[Kotton CN¹](#), [Kumar D](#), [Caliendo AM](#), [Asberg A](#), [Chou S](#), [Danziger-Isakov L](#), [Humar A](#); [Transplantation Society International CMV Consensus Group](#).