

Februar 2018

# QuantiFERON<sup>®</sup>-CMV ELISA

## Packungsbeilage



Interferon-Gamma-Test (IFN- $\gamma$ ) für Vollblut zur Messung der Immunantwort auf Peptidantigene des humanen Zytomegalievirus



Für in-vitro-diagnostische Anwendungen



0350-0201



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
Deutschland

1075110DE Rev. 05



[www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com)



# Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck .....	5
Zusammenfassung und Erläuterung .....	5
Verfahrensprinzip .....	6
Erforderliche Zeit für die Testdurchführung .....	7
Im Lieferumfang enthalten .....	8
Kit-Inhalt .....	8
Zusätzlich benötigtes Material .....	9
Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen .....	9
Sicherheitshinweise .....	11
Lagerung und Handhabung der Reagenzien .....	12
Entnahme und Handhabung der Proben .....	13
Verfahren .....	16
Stufe 1: Inkubation der Blutprobe und Entnahme des Plasmas .....	16
Stufe 2: QuantiFERON-CMV ELISA zum Nachweis von Human-IFN- $\gamma$ .....	17
Berechnungen und Auswertung des Tests .....	22
Erstellung der Standardkurve (ohne QF-CMV Analysis Software) .....	22
Qualitätskontrolle des Tests .....	23
Interpretation der Ergebnisse .....	25
Anwendungseinschränkungen .....	26
Erwartungswerte .....	26
Leistungsmerkmale .....	30
Klinische Leistungsmerkmale .....	30

---

Grenzwert des Tests.....	31
Klinische Studien .....	31
Spezifität.....	32
Sensitivität .....	32
Studien zum klinischen Nutzen.....	33
Internationale Konsensusleitlinien zum CMV-Infektionsmanagement bei Transplantationen solider Organe .....	38
Assay-Leistungsmerkmale .....	39
Technische Informationen.....	41
Unbestimmte Ergebnisse.....	41
Geronnene Plasmaproben .....	42
Fehlerbehebung.....	43
Literatur .....	45
Symbole .....	46
Kontakt.....	47
Kurzanleitung zum ELISA-Test .....	48
Stufe 1: Inkubation des Bluts .....	48
Stufe 2: IFN- $\gamma$ -ELISA .....	48
Bearbeitungsverlauf des Dokuments .....	51

# Verwendungszweck

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) ist ein In-vitro-Test, bei dem ein Peptid-Cocktail Proteine des humanen Zytomegalievirus (cytomegalovirus, CMV) simuliert und Zellen in heparinisierten Vollblutproben stimuliert. Durch den Nachweis von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) mittels ELISA-Test (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wird die In-vitro-Immunantwort auf diese Peptidantigene, die mit der Immunabwehr bei einer CMV-Infektion assoziiert sind, quantifiziert. Ein Verlust dieser Immunfunktion kann mit der Entwicklung der CMV-Krankheit in Verbindung stehen. QF-CMV dient der Überwachung der CMV-Immunität von Patienten.

QF-CMV dient nicht dem Nachweis einer CMV-Infektion und darf nicht zum Ausschluss einer CMV-Infektion verwendet werden.

## Zusammenfassung und Erläuterung

CMV ist ein Herpesvirus, mit dem 50–85 % der erwachsenen Bevölkerung infiziert sind. Es führt häufig zu Komplikationen bei einer Immunsuppression, insbesondere nach Transplantationen, und kann erheblich zur Morbidität und Mortalität von Transplantatempfängern beitragen. Die derzeit üblicherweise zur Verhinderung der Abstoßung eines transplantierten Organs angewandten Immunsuppressiva wirken sich schädlich auf die T-Lymphozyten und die zellvermittelte Immun(cell-mediated immune, CMI)-Antwort aus, was nach Transplantationen die Anfälligkeit für Vireninfektionen erhöht. Wie wichtig die Funktion der T-Zellen bei der Hemmung der CMV-Replikation ist, spiegelt sich auch darin wider, dass CD8-positive (CD8<sup>+</sup>) CMV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T-lymphocytes, CTLs) vor der virusbedingten Pathogenese schützen können. Die Zahl der CD8<sup>+</sup> CMV-spezifischen CTLs in immunsupprimierten Patienten und die Produktion von IFN- $\gamma$  erlauben Rückschlüsse auf das CMV-Erkrankungsrisiko. Die IFN- $\gamma$ -Produktion kann als funktioneller Ersatzparameter für die Identifizierung CMV-spezifischer CTLs genutzt werden.

Mit dem QF-CMV Test kann die CMI-Antwort auf Peptidantigene gemessen werden, die CMV-Proteine simulieren. Die CMV-Peptide dienen der Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, darunter solche mit den HLA-Klasse-I-Haplotypen A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 und Cw6 (A30, B13), die > 98 % der Bevölkerung abdecken. Mit CMV infizierte Patienten haben normalerweise CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im Blut, die diese Antigene erkennen. Im Laufe dieses Erkennungsprozesses wird das Zytokin IFN- $\gamma$  von den Zellen produziert und sezerniert. Der Nachweis und die anschließende Quantifizierung von IFN- $\gamma$  bilden die Grundlage dieses Tests.

## Verfahrensprinzip

Der QF-CMV-Test wird in zwei Stufen durchgeführt. Zunächst wird Vollblut in jedes der drei QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen abgenommen. Dabei handelt es sich um ein Negativkontroll-Röhrchen (Nil), ein CMV-Antigen-Röhrchen und ein Mitogen-Röhrchen.

Das Mitogen-Röhrchen dient im Rahmen des QF-CMV-Tests als Positivkontrolle. Dies kann insbesondere in Fällen wichtig sein, in denen der Immunstatus des Patienten fraglich ist. Das Mitogen-Röhrchen kann auch als Kontrolle dienen, um zu bestimmen, ob die Handhabung und die Inkubation des Blutes korrekt durchgeführt wurden.

Die Röhrchen sollten so schnell wie möglich, jedoch spätestens 16 Stunden nach der Blutentnahme, bei 37 °C inkubiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 16–24 Stunden werden die Röhrchen dann zentrifugiert, das Plasma wird abgenommen und die Menge an IFN- $\gamma$  (IU/ml) wird mittels QF-CMV ELISA gemessen.

Die Menge an IFN- $\gamma$  in den Plasmaproben im CMV-Antigen- und im Mitogen-Röhrchen ist häufig so hoch, dass die Messwerte die Höchstgrenzen der meisten ELISA-Reader überschreiten, selbst bei mäßig immunsupprimierten Patienten. Als qualitative Ergebnisse verwenden Sie bitte die für unverdünntes Plasma berechneten Werte. Zur Ermittlung der quantitativen Ergebnisse, die in IU/ml ausgedrückt werden, werden die Plasmaproben 1:10 in der grünen Verdünnungslösung (Green Diluent) verdünnt und dann zusammen mit dem unverdünnten Plasma im ELISA gemessen.

Hinweis: Bei Proben, deren Ergebnisse innerhalb des Messbereichs des QF-CMV ELISA liegen (also bis zu 10 IU/ml), ist das mit dem unverdünnten Plasma ermittelte Ergebnis zu verwenden. Bei diesen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen können die mit der 1:10-Verdünnung der Plasmaproben ermittelten Werte ungenau sein.

Der Test gilt als positiv für die IFN- $\gamma$ -Reaktion („reaktiv“), wenn der Messwert des CMV-Antigen-Röhrchens (IFN- $\gamma$  in IU/ml) signifikant über dem Wert der Negativkontrolle (Nil) liegt. Die mitogenstimulierte Plasmaprobe dient für jede getestete Probe als IFN- $\gamma$ -Positivkontrolle. Testet eine Blutprobe negativ („nicht-reaktiv“) auf die CMV-Antigene und das Mitogen zeigt nur eine schwache Reaktion, dann ist das Ergebnis unbestimmt. Ein solches Muster kann auftreten bei ungenügender Lymphozytenzahl, herabgesetzter Lymphozytenaktivität infolge unsachgemäßer Probenbehandlung, unsachgemäßem Befüllen oder Mischen des Mitogen-Röhrchens oder in Fällen, in denen die Lymphozyten des Patienten nicht in der Lage sind, IFN- $\gamma$  zu bilden (beispielsweise kurz nach einer Organtransplantation). Die Negativkontrolle dient zur Hintergrundkorrektur oder zur Korrektur von nicht-spezifischem IFN- $\gamma$  in der Blutprobe. Der IFN- $\gamma$ -Gehalt des Negativkontroll-Röhrchens wird vom IFN- $\gamma$ -Gehalt des CMV-Antigen- und Mitogen-Röhrchens abgezogen (Informationen zur Auswertung der Ergebnisse des QF-CMV-Tests finden Sie im Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ auf Seite 25 dieser Packungsbeilage).

## Erforderliche Zeit für die Testdurchführung

Nachstehend finden Sie Angaben zur geschätzten Dauer des QF-CMV-Tests sowie zur erforderlichen Zeit bei der gleichzeitigen Durchführung mehrerer Tests:

Inkubation der Blutröhrchen bei 37 °C:	16–24 Stunden
ELISA:	Etwas 3 Stunden für eine ELISA-Platte
	Unter 1 Stunde Arbeitszeit
	Plus 10–15 Minuten für jede zusätzliche Platte

# Im Lieferumfang enthalten

## Kit-Inhalt

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
Katalog-Nr.	0192-0301
Anzahl der Präparationen	1
QuantiFERON Nil Control (QuantiFERON-Negativkontrolle, grauer Deckel)	1 Röhrchen
QuantiFERON CMV Antigen (QuantiFERON-CMV-Antigen, blauer Deckel)	1 Röhrchen
QuantiFERON Mitogen Control (QuantiFERON-Mitogen-Kontrolle, violetter Deckel)	1 Röhrchen
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Packungsbeilage für die QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen)	1

QuantiFERON-CMV ELISA	
Katalog-Nr.	ELISA-Kit mit 2 Platten 0350-0201
Mikrotiterplattenstreifen (12 × 8 Wells), beschichtet mit monoklonalen Mausantikörpern gegen Human-IFN- $\gamma$	2 Sätze von Mikrotiterplattenstreifen mit 12 × 8 Wells
Human IFN- $\gamma$ Standard, lyophilized (Human-IFN- $\gamma$ -Standard, lyophilisiert; enthält rekombinantes Human-IFN- $\gamma$ , Rinder-casein, 0,01 % m/v Thiomersal)	1 Fläschchen (8 IU/ml nach der Rekonstitution)
Green Diluent (Grüne Verdünnungslösung; enthält Rinder-casein, Normalserum von Mäusen, 0,01 % m/v Thiomersal)	1 × 30 ml
Conjugate 100× Concentrate, lyophilized (100× Konjugatkonzentrat, lyophilisiert; Meerrettichperoxidase (Maus) gegen Human-IFN $\gamma$ mit 0,01 % m/v Thiomersal)	1 × 0,3 ml
Wash Buffer 20× Concentrate (20× Waschpufferkonzentrat; pH 7,2 mit 0,05 % v/v ProClin® 300)	1 × 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Enzymsubstratlösung; mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	1 × 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzymstopplösung; mit 0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )*	1 × 15 ml
QF-CMV ELISA Packungsbeilage	1

\* Enthält Schwefelsäure. Vorsichtsmaßnahmen finden Sie auf Seite 9.

## Zusätzlich benötigtes Material

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (safety data sheets, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

- 37°C-Inkubator; CO<sub>2</sub> nicht erforderlich
- Kalibrierte Pipetten mit variablem Volumen für Volumina von 10–1000 µl mit Einwegspitzen
- Kalibrierte Mehrkanalpipette zur Abgabe von 50 und 100 µl mit Einwegspitzen
- Schüttler für Mikrotiterplatten
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser (2 Liter)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten (vorzugsweise automatisiert)
- Mikrotiterplatten-Reader mit 450-nm-Filter und Referenzfilter bei 620 bis 650 nm

## Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen geeigneten Laborkittel, Einmalhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern (SDS). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) finden Sie zu jedem QIAGEN® Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

ACHTUNG



Behandeln Sie Humanblutproben stets als potenziell infektiös. Die einschlägigen Richtlinien zum Umgang mit Blut sind zu beachten.

Für die Komponenten des QuantiFERON-CMV ELISA gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

#### QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Enthält: Schwefelsäure. Achtung! Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

#### QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Achtung! Verursacht milde Hautreizungen. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

#### QuantiFERON Green Diluent



Enthält: Trinitrium-5-hydroxy-1-(4-sulfophenyl)-4-(4-sulfophenylazo)pyrazol-3-carboxylat. Enthält: Tartrazin. Achtung! Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung/ Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.

#### QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Enthält: ProClin 300. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

---

## Sicherheitshinweise

### Weitere Informationen

- Abweichungen von der Packungsbeilage des QF-CMV-Tests können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Bitte lesen Sie die Anweisungen vor Gebrauch sorgfältig durch.
- Verwenden Sie das Kit nicht, wenn Reagenzflaschen vor Gebrauch beschädigt oder undicht erscheinen.
- Wichtig: Fläschchen vor der Anwendung prüfen. Keine Konjugat- oder IFN- $\gamma$ -Standard-Fläschchen verwenden, bei denen Zeichen einer Beschädigung sichtbar sind oder deren Gummidichtung beeinträchtigt ist. Defekte Fläschchen nicht anfassen. Solche Fläschchen unter Beachtung geeigneter Sicherheitsmaßnahmen sicher entsorgen. Empfehlung: Benutzen Sie zur Öffnung der Konjugat- oder IFN- $\gamma$ -Standard-Fläschchen eine Entbördelzange, um Verletzungen durch den metallenen Bördeldeckel zu vermeiden.
- Es dürfen keine Komponenten, wie Mikrotiterplattenstreifen, Human-IFN- $\gamma$ -Standard, grüne Verdünnungslösung oder 100 $\times$  Konjugatkonzentrat, von unterschiedlichen QF-CMV-Kit-Chargen zusammen verwendet oder vermischt werden. Andere Reagenzien (20 $\times$  Waschpufferkonzentrat, Enzymsubstratlösung und Enzymstopplösung) können zwischen den Kits ausgetauscht werden, vorausgesetzt, das Verfallsdatum der Reagenzien ist noch nicht abgelaufen und die Chargendaten werden notiert.
- Entsorgen Sie nicht benötigte Reagenzien und biologische Proben gemäß den örtlichen und nationalen Vorschriften.
- Nach Ablauf des Verfallsdatums dürfen die QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen oder < QF-CMV ELISA-Kits nicht mehr verwendet werden.
- Stellen Sie sicher, dass Laborgeräte wie zum Beispiel Plattenwaschgeräte und -Reader kalibriert und für den Gebrauch validiert sind.

# Lagerung und Handhabung der Reagenzien

## Blutentnahmeröhrchen

- QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen sind bei 4–25 °C zu lagern.
- QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen müssen zum Zeitpunkt der Befüllung mit Blut eine Temperatur zwischen 17 und 25 °C haben.
- Bei Lagerung bei 4–25 °C sind die QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen 15 Monate ab Herstellungsdatum haltbar.

## Reagenzien des ELISA-Kits

- Das Kit bei 2–8 °C aufbewahren.
- Die Enzymsubstratlösung ist stets vor direkter Sonneneinstrahlung zu schützen.

## Rekonstituierte und nicht verbrauchte Reagenzien

Anweisungen zur Rekonstitution der Reagenzien finden Sie im Abschnitt „Stufe 2: QuantiFERON-CMV ELISA zum Nachweis von Human-IFN- $\gamma$ “ (Schritte 3 und 5 auf den Seiten 17 und 19).

- Der rekonstituierte Human-IFN- $\gamma$ -Standard ist bei Lagerung bei 2–8 °C bis zu 3 Monate lang haltbar.  
Notieren Sie das Datum der Rekonstitution des Human-IFN- $\gamma$ -Standards.
- Das 100x Konjugatkonzentrat muss nach der Rekonstitution bei 2–8 °C gelagert und innerhalb von 3 Monaten aufgebraucht werden.  
Notieren Sie das Datum der Rekonstitution des Konjugats.
- Gebrauchsfertig verdünntes Konjugat muss innerhalb von 6 Stunden nach Zubereitung verwendet werden.
- Gebrauchsfertig verdünnter Waschpuffer ist bei Raumtemperatur ( $22 \pm 5$  °C) bis zu 2 Wochen lang haltbar.

# Entnahme und Handhabung der Proben

Im QF-CMV-Test werden die folgenden Blutentnahmeröhrchen verwendet:

- Negativkontrolle, grauer Deckel
- CMV-Antigen, blauer Deckel
- Mitogen-Kontrolle, violetter Deckel

Die Innenwand der Blutentnahmeröhrchen ist mit Antigenen beschichtet; es ist daher wichtig, dass der Röhrcheninhalt gründlich mit dem Blut gemischt wird. Die Röhrchen müssen so schnell wie möglich – spätestens jedoch 16 Stunden nach der Blutentnahme – in einen 37°C-Inkubator überführt werden.

Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollte die nachfolgend beschriebene Vorgehensweise eingehalten werden:

1. Nehmen Sie von jedem Patienten per Venenpunktion je 1 ml Blut direkt in jedes der QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen ab. Die Blutentnahme sollte von geschulten Phlebologen durchgeführt werden.

QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen können bis zu einer Höhe von 810 m über dem Meeresspiegel verwendet werden.

Werden QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen in Höhenlagen über 810 m verwendet oder ist das entnommene Blutvolumen zu gering, kann auch mit einer Spritze Blut abgenommen und je 1 ml davon sofort in die drei Röhrchen gegeben werden. Aus Sicherheitsgründen nimmt man hierzu am besten unter Beachtung der einschlägigen Vorsichtsmaßnahmen die Nadel von der Spritze, nimmt dann die Deckel von den drei QF-CMV-Röhrchen ab und gibt in jedes Röhrchen 1 ml Blut (bis zur schwarzen Markierung seitlich am Röhrchen). Verschließen Sie die Röhrchen sicher mit den Deckeln und mischen Sie den Inhalt wie nachstehend beschrieben. Da die 1-ml-Röhrchen das Blut relativ langsam

---

aufnehmen, belassen Sie das Röhrchen nach dem scheinbaren Erreichen des Füllstands noch 2–3 Sekunden auf der Nadel, um zu gewährleisten, dass die erforderliche Blutmenge entnommen worden ist.

Die schwarze Markierung seitlich am Röhrchen ist die 1-ml-Fülllinie. Die QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen wurden für Volumina von 0,8 bis 1,2 ml validiert. Liegt der Volumenstand des Bluts in einem Röhrchen nicht in der Nähe der Markierung, ist eine neue Blutprobe zu entnehmen.

Erfolgt die Blutentnahme mit einer Flügelkanüle, sollte ein Absaugröhrchen verwendet werden, um sicherzustellen, dass die Schläuche mit Blut gefüllt sind, bevor die QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen zum Einsatz kommen.

Zur Blutentnahme kann alternativ auch ein Blutentnahmeröhrchen mit Lithiumheparin als Antikoagulans verwendet werden, aus dem das Blut anschließend in die QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen überführt wird. Es darf nur Lithiumheparin als Antikoagulans verwendet werden, da andere Antikoagulanzen die Leistung des Assays beeinträchtigen. Füllen Sie ein Blutentnahmeröhrchen (Mindestvolumen: 5 ml) und lösen Sie das Lithiumheparin durch vorsichtiges, mehrmaliges Überkopfdrehen auf. Die Blutentnahme sollte von geschulten Phlebologen durchgeführt werden. Das Blut sollte bei Raumtemperatur ( $22 \pm 5$  °C) aufbewahrt werden, bevor es zur Inkubation in die QF-CMV-Röhrchen überführt wird. Die Inkubation muss innerhalb von 16 Stunden nach der Blutentnahme gestartet werden.

2. Die QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen sofort nach der Befüllung 10-mal gerade so stark schütteln, dass die gesamte Innenfläche des Röhrchens mit Blut bedeckt ist, um die Antigene an der Röhrchenwand zu lösen.

Die Röhrchen sollten bei der Befüllung eine Temperatur zwischen 17 und 25 °C aufweisen.

Zu heftiges Schütteln kann das Gel zerstören und somit zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Wurde das Blut in ein Lithiumheparin-Röhrchen entnommen, müssen die Proben gründlich gemischt werden, bevor sie in die QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen überführt werden.

---

Stellen Sie sicher, dass das Blut vor der Überführung durch vorsichtiges Überkopfdrehen gründlich gemischt wird. Geben Sie Aliquote von jeweils 1 ml (ein Aliquot pro QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen) in das Negativkontroll-, das CMV-Antigen- und das Mitogen-Röhrchen. Dies wird am besten unter Beachtung der einschlägigen Vorsichtsmaßnahmen in aseptischer Arbeitsweise durchgeführt, indem Sie die Deckel von den drei QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen abnehmen und in jedes Röhrchen 1 ml Blut geben (bis zur schwarzen Markierung seitlich am Röhrchenetikett). Verschließen Sie die Röhrchen sicher mit den Deckeln und mischen Sie den Inhalt wie oben beschrieben.

3. Röhrchen korrekt beschriften.

Jedes Röhrchen (Negativkontrolle, CMV-Antigen und Mitogen) muss anhand des Etiketts oder einer anderen Kennzeichnung eindeutig zu identifizieren sein.

4. Nachdem die Röhrchen gefüllt, geschüttelt und etikettiert wurden, müssen sie so schnell wie möglich – spätestens jedoch 16 Stunden nach der Blutentnahme – in einen Inkubator ( $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) überführt werden. Vor der Inkubation sind die Röhrchen bei Raumtemperatur ( $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) aufzubewahren. Bewahren Sie die Blutproben nicht im Kühlschrank oder Gefrierschrank auf.

# Verfahren

## Stufe 1: Inkubation der Blutprobe und Entnahme des Plasmas

1. Röhrrchen SENKRECHT stellen und 16–24 Stunden bei  $37 \pm 1$  °C inkubieren. Bei der Inkubation muss weder CO<sub>2</sub> zugeführt noch die Luftfeuchtigkeit erhöht werden.  
Wichtig: Wird das Blut nicht direkt nach der Entnahme inkubiert, müssen die Röhrrchen vor der Inkubation erneut durch 10-maliges Überkopfdrehen gemischt werden.  
Nach der Inkubation können die Blutentnahmeröhrrchen vor der Zentrifugation maximal 3 Tage bei 4–27 °C gelagert werden.
2. Nach der Inkubation der Röhrrchen bei 37 °C werden diese 15 Minuten lang bei 2000–3000 (RZB) (g) zentrifugiert. Die Gelbarriere trennt dabei die Zellen vom Plasma. Ist diese Trennung nicht erfolgreich, zentrifugieren Sie die Röhrrchen erneut.  
Das Plasma kann auch ohne Zentrifugation gewonnen werden, dabei ist jedoch Vorsicht geboten, damit bei der Entnahme des Plasmas die Zellen nicht aufgewirbelt werden.
3. Vermeiden Sie nach der Zentrifugation unbedingt ein Auf- und Abpipettieren oder Mischen des Plasmas vor der Entnahme. Achten Sie stets darauf, das Material an der Geloberfläche nicht zu verwirbeln.  
Wichtig: Plasmaproben sollten nur mit einer Pipette entnommen werden.  
Plasmaproben können direkt aus den zentrifugierten Blutentnahmeröhrrchen in die QF-CMV ELISA-Platte überführt werden – auch bei Verfahren mit automatisierten ELISA-Arbeitsstationen.  
Plasmaproben in zentrifugierten QF-CMV-Blutentnahmeröhrrchen können maximal 28 Tage bei 2–8 °C oder, in abgetrennter Form, bei unter –20 °C (möglichst unter –70 °C) über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.  
Es müssen mindestens 150 µl Plasma gewonnen werden, um eine ausreichende Menge an Probenmaterial zu erhalten.

## Stufe 2: QuantiFERON-CMV ELISA zum Nachweis von Human-IFN- $\gamma$

Informationen über Materialien, die für die Durchführung von ELISA erforderlich sind, finden Sie unter „Kit-Inhalt“ auf Seite 8 und unter „Zusätzlich benötigtes Material“ auf Seite 9.

1. Mit Ausnahme des 100× Konjugatkonzentrats müssen alle Plasmaproben und Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur ( $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gebracht werden. Planen Sie für die Temperaturäquilibrierung mindestens 60 Minuten ein.
2. Nehmen Sie nicht benötigte ELISA-Plattenstreifen aus dem Rahmen, schließen Sie die Folienverpackung und lagern Sie sie bis zum Gebrauch im Kühlschrank.  
Sehen Sie mindestens einen Streifen für die QF-CMV ELISA-Standards und eine ausreichende Anzahl von Streifen für die zu testenden Patienten vor. Bewahren Sie den Rahmen und den Deckel nach dem Gebrauch für die verbleibenden Streifen auf.
3. Rekonstituieren Sie den Human-IFN- $\gamma$ -Standard mit der auf dem Etikett des Fläschchens angegebenen Menge an entionisiertem oder destilliertem Wasser. Mischen Sie vorsichtig, um die Schaumbildung zu minimieren, bis der Inhalt vollständig aufgelöst wurde. Durch Rekonstitution des IFN- $\gamma$ -Standards auf das angegebene Volumen wird eine Lösung mit einer Konzentration von 8,0 IU/ml erhalten.

Hinweis: Das Rekonstitutionsvolumen für den Human-IFN- $\gamma$ -Standard (Kit-Standard) variiert von Charge zu Charge.

Stellen Sie eine Verdünnungsreihe des rekonstituierten Standards mit grünem Verdünnungsmittel (Green Diluent, GD) mit vier IFN- $\gamma$ -Konzentrationen her (Abbildung 1, nächste Seite). S1 (Standard 1) enthält 4,0 IU/ml, S2 (Standard 2) enthält 1,0 IU/ml, S3 (Standard 3) enthält 0,25 IU/ml und S4 (Standard 4) enthält 0 IU/ml (nur GD). Die Standards sind mindestens in Doppelbestimmungen zu testen. Stellen Sie die Verdünnungen des Kit-Standards für jeden ELISA-Durchgang frisch her.

Beispiel für das Vorgehen zum Testen der Standards in Doppelbestimmungen

Beispiel für das Vorgehen zum Testen der Standards in Doppelbestimmungen	
A	Beschriftung der vier Röhren: S1, S2, S3, S4
B	150 µl GD zu S1, S2, S3 und S4 zugeben
C	150 µl Kit-Standard zu S1 zugeben und gründlich mischen
D	50 µl von S1 nach S2 überführen und gründlich mischen
E	50 µl von S2 nach S3 überführen und gründlich mischen
F	Nur GD dient als Nullstandard (S4)

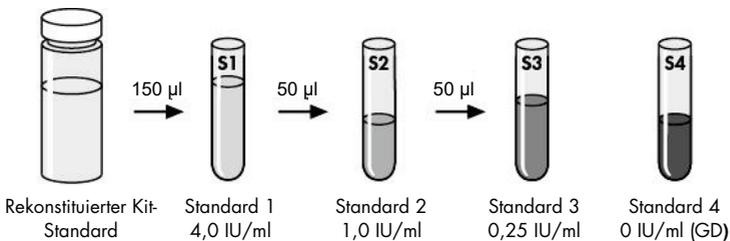


Abbildung 1. Bestimmung der Standardkurve durch Reihenverdünnung.

4. Rekonstituieren Sie das lyophilisierte 100× Konjugatkonzentrat mit 0,3 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser. Mischen Sie das Fläschchen vorsichtig, um die Schaumbildung zu minimieren, bis sich das Konjugat vollständig aufgelöst hat.

Das gebrauchsfertig verdünnte Konjugat wird hergestellt, indem Sie die erforderliche Menge des rekonstituierten 100× Konjugatkonzentrats in grüner Verdünnungslösung verdünnen (siehe Tabelle 1 auf der nächsten Seite).

Mischen Sie gründlich, aber vorsichtig, um Schaumbildung zu vermeiden.

Nicht verbrauchtes 100× Konjugatkonzentrat muss sofort nach Gebrauch wieder bei 2–8 °C gelagert werden.

Es darf nur grüne Verdünnungslösung verwendet werden.

Tabelle 1. Herstellung des gebrauchsfertig verdünnten Konjugats

Anzahl Streifen	Volumen 100x Konjugatkonzentrat	Volumen grüne Verdünnungslösung
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. Plasmaproben, die von Blutentnahmeröhrchen gewonnen und bis zum Test eingefroren oder über 24 Stunden lang gelagert wurden, müssen vor der Zugabe zum ELISA-Well gründlich gemischt werden.

Wichtig: Wenn die Plasmaproben direkt von den zentrifugierten QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen zugegeben werden, ist von einem Mischen des Plasmas abzusehen. Achten Sie immer darauf, das Material an der Geloberfläche nicht zu verwirbeln.

6. Falls quantitative Ergebnisse benötigt werden, stellen Sie 1:10-Verdünnungen des CMV- und Mitogen-Plasmas in grüner Verdünnungslösung her (10 µl Plasma + 90 µl grüne Verdünnungslösung). Das Negativkontrollplasma darf nicht verdünnt werden.

Es wird empfohlen, die folgenden Proben parallel zu testen:

Negativkontrolle, CMV-Antigen, Mitogen, CMV-Antigen (1:10), Mitogen (1:10)

Die QuantiFERON-CMV Analysis Software unterstützt jedoch auch die folgenden Optionen für die Patientenproben:

Negativkontrolle, CMV-Antigen, Mitogen

Negativkontrolle, CMV-Antigen (1:10), Mitogen (1:10)

Negativkontrolle, CMV-Antigen, Mitogen, CMV-Antigen (1:10)

Negativkontrolle, CMV-Antigen (1:10), Mitogen

7. Geben Sie mit Hilfe einer Mehrkanalpipette je 50 µl des frisch angesetzten gebrauchsfertig verdünnten Konjugats in alle benötigten ELISA-Wells.
8. 50 µl der zu testenden Plasmaproben in die entsprechenden Wells geben. Geben Sie schließlich je 50 µl der Standards 1 bis 4 in die entsprechenden Wells. Die Standards sind mindestens in Doppelbestimmungen zu testen.
9. Decken Sie die ELISA-Platte ab und mischen Sie die Konjugat-/Plasmaproben und Standards 1 Minute lang mit einem Schüttler für Mikrotiterplatten bei 500 bis 1000 U/min gründlich durch. Ein Verspritzen muss vermieden werden.
10. Decken Sie die ELISA-Platte ab und inkubieren Sie die Platten  $120 \pm 5$  Minuten lang bei Raumtemperatur ( $22 \pm 5$  °C).

Die Platten dürfen während der Inkubation keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden. Eine Abweichung vom angegebenen Temperaturbereich kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

11. Bereiten Sie während der Inkubation Waschpuffer in gebrauchsfertiger Konzentration vor. Verdünnen Sie dazu einen Teil 20x Waschpufferkonzentrat mit 19 Teilen entionisiertem oder destilliertem Wasser und mischen Sie gründlich. Im Lieferumfang ist ausreichend 20x Waschpufferkonzentrat zur Herstellung von 2 Litern gebrauchsfertig verdünntem Waschpuffer vorhanden.

12. Waschen Sie nach Abschluss der Inkubation der ELISA-Platte die Wells mindestens sechsmal mit 400 µl gebrauchsfertigem Waschpuffer. Wir empfehlen die Verwendung eines Waschautomaten für Mikrotiterplatten.

Wichtig: Sorgfältiges Waschen ist für die Leistung des Tests sehr wichtig. Achten Sie bei jedem Waschzyklus darauf, dass alle Wells vollständig bis oben mit Waschpuffer gefüllt sind. Es empfiehlt sich, den Waschpuffer bei jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken zu lassen.

---

In den Auffangbehälter für Abfallflüssigkeit sollte ein laborübliches Desinfektionsmittel gegeben werden. Befolgen Sie zudem die in Ihrem Labor geltenden Anweisungen zur Dekontamination potenziell infektiösen Materials.

13. Klopfen Sie die Platten umgekehrt auf einem fusselfreien Papierhandtuch aus, um noch vorhandenen Waschpuffer zu entfernen. Geben Sie 100 µl Enzymsubstratlösung in jedes Well, decken Sie die Platte mit einem Deckel ab und mischen Sie sie 1 Minute lang gründlich mit einem Mikroplattenschüttler bei 500 bis 1000 U/min.
14. Decken Sie jede Platte ab und inkubieren Sie die Platten 30 Minuten lang bei Raumtemperatur ( $22 \pm 5$  °C).  
Die Platten dürfen während der Inkubation keinem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden.
15. Nach der 30-minütigen Inkubation geben Sie 50 µl Enzymstopplösung in jedes Well. Benutzen Sie dazu die gleiche Reihenfolge wie bei der Zugabe von Substrat. Mischen Sie die Platte anschließend gründlich mit einem Schüttler für Mikrotiterplatten bei 500 bis 1000 U/min.
16. Messen Sie innerhalb von 5 Minuten nach Stoppen der Reaktion die optische Dichte (Optical Density, OD) jedes Wells mit einem Mikrotiterplatten-Reader unter Verwendung eines 450-nm-Filters und eines Referenzfilters zwischen 620 und 650 nm. Die OD-Werte werden für die Berechnung der Ergebnisse benötigt.

---

# Berechnungen und Auswertung des Tests

Für die Analyse der Rohdaten und die Berechnung der Ergebnisse ist von QIAGEN die QuantiFERON-CMV Analysis Software erhältlich, zu finden im Internet unter [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Achten Sie darauf, die aktuellste Version der QF-CMV Analysis Software zu verwenden.

Die Software führt eine Qualitätskontrolle des Tests durch, erstellt eine Standardkurve und liefert für jeden Patienten ein Testergebnis nach der im Abschnitt „Interpretation der Ergebnisse“ auf Seite 25 beschriebenen Methode. Die Software gibt die niedrigste Verdünnung an, für die im Bereich des QF-CMV ELISA ein Ergebnis erhalten wird. Dabei wird der Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

Alternativ zur Verwendung der QF-CMV Analysis Software können die Ergebnisse auch wie folgt bestimmt werden.

## Erstellung der Standardkurve (ohne QF-CMV Analysis Software)

Ermitteln Sie für jede Platte die OD-Mittelwerte der Bestimmungen des Kit-Standards.

Erstellen Sie eine  $\log_{(e)}$ - $\log_{(e)}$ -Standardkurve durch Auftragen des  $\log_{(e)}$  des OD-Mittelwerts (y-Achse) gegen den  $\log_{(e)}$  der IFN- $\gamma$ -Konzentration der Standards in IU/ml (x-Achse). Der Nullstandard wird bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt. Berechnen Sie dann die Regressionsgerade für diese Punkte.

Ermitteln Sie anhand der Standardkurve die IFN- $\gamma$ -Konzentration (IU/ml) der getesteten Plasmaproben. Legen Sie dabei den OD-Wert jeder Probe zugrunde.

---

Für diese Berechnungen können Softwarepakete für Mikrotiterplatten-Reader verwendet werden oder gängige Tabellenkalkulations- und Statistikprogramme (wie beispielsweise Microsoft® Excel®). Wir empfehlen die Verwendung solcher Softwarepakete zur Durchführung der Regressionsanalyse und zur Berechnung des Variationskoeffizienten (coefficient of variation, %VK) der Standards sowie des Korrelationskoeffizienten (r) der Standardkurve.

Es wird das Ergebnis der niedrigsten Verdünnung angegeben, für die im Bereich des QF-CMV ELISA ein Ergebnis erhalten wird. Stellen Sie sicher, dass dabei ggf. der Verdünnungsfaktor berücksichtigt wird.

## Qualitätskontrolle des Tests

Die Genauigkeit der Testergebnisse hängt von der Erstellung einer korrekten Standardkurve ab. Daher müssen die Ergebnisse der Standards vor Auswertung der Testergebnisse geprüft werden.

Der ELISA liefert gültige Ergebnisse, wenn alle nachstehenden Kriterien erfüllt sind:

- Der OD-Mittelwert von Standard 1 muss  $\geq 0,600$  betragen.
- Der prozentuale Variationskoeffizient (%VK) der OD-Werte der Standard-1- und Standard-2-Replikate muss  $< 15 \%$  betragen.
- Die OD-Replikatwerte für die Bestimmungen von Standard 3 und Standard 4 dürfen höchstens um 0,040 OD-Einheiten vom jeweiligen Mittelwert abweichen.
- Der aus den mittleren Absorptionswerten der Standards berechnete Korrelationskoeffizient (r) muss  $\geq 0,98$  betragen.

Die Berechnung und Angabe dieser Qualitätskontrollparameter wird mit der QF-CMV Analysis Software durchgeführt. Werden diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

---

Der OD-Mittelwert des Nullstandards (grüne Verdünnungslösung) muss  $\leq 0,150$  sein. Ist der OD-Mittelwert  $> 0,150$ , muss das Verfahren zum Waschen der Platten überprüft werden.

# Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse des QuantiFERON-CMV-Tests werden gemäß den Kriterien unter Tabelle 2 interpretiert.

Tabelle 2. Interpretation der QuantiFERON-CMV-Ergebnisse

Negativkontrolle (IU/ml)	CMV minus Negativkontrolle (IU/ml)	Mitogen minus Negativkontrolle (IU/ml)	Ergebnis des QF-CMV-Tests	Bericht/Interpretation
≤ 8,0	≥ 0,20 und ≥ 25 % der Negativkontrolle	Beliebig	Reaktiv <sup>†</sup>	Anti-CMV-Immunität nachgewiesen
	< 0,20 ODER ≥ 0,20 und < 25 % der Negativkontrolle	≥ 0,5	Nicht-reaktiv	Anti-CMV-Immunität NICHT nachgewiesen
		< 0,5	Unbestimmt <sup>‡</sup>	Die Ergebnisse lassen keinen Schluss auf die CMV-Reaktionsfähigkeit zu
> 8,0 <sup>§</sup>	Beliebig	Beliebig	Unbestimmt <sup>‡</sup>	Die Ergebnisse lassen keinen Schluss auf die CMV-Reaktionsfähigkeit zu

\* Die Ergebnisse der Mitogen-Positivkontrolle (und gelegentlich auch die der CMV-Antigene) können außerhalb des Messbereichs des Mikrotiterplatten-Readers liegen. Die Testergebnisse werden dadurch nicht beeinträchtigt.

† Wo keine Zytomegalovirusinfektion vermutet wird, können anfänglich reaktive Ergebnisse durch eine Testwiederholung der ursprünglichen Plasmaproben in Doppelbestimmung mit dem QF-CMV ELISA-System bestätigt werden. Ergibt die Testwiederholung ein positives Ergebnis für ein oder beide Replikate, sollte der betroffene Patient als reaktiv in Bezug auf den Test eingestuft werden.

‡ Mögliche Ursachen finden Sie unter „Fehlerbehebung“ (Seite 43).

Klinische Studien (1) haben ergeben, dass ein unbestimmtes Ergebnis für Empfänger von soliden Organtransplantaten klinisch relevant ist, wenn der Spender auf CMV reaktiv ist, die Mitogen-Kontrolle jedoch unter 0,5 IU/ml liegt. Solche Patienten haben ein erhöhtes Risiko, CMV zu entwickeln.

§ Klinische Studien haben ergeben, dass der IFN- $\gamma$ -Spiegel der Negativkontrolle bei weniger als 0,25 % der Probanden > 8,0 IU/ml ist.

Hinweis: Der gemessene IFN- $\gamma$ -Spiegel sollte zusammen mit der klinischen Präsentation, der Anamnese und anderen diagnostischen Untersuchungen zur Ermittlung einer Immunantwort auf CMV-Antigene ausgewertet werden. QF-CMV dient nicht dem Nachweis einer CMV-Infektion und darf nicht zum Ausschluss einer CMV-Infektion verwendet werden.

---

# Anwendungseinschränkungen

Die Ergebnisse des QuantiFERON-CMV-Tests müssen im Zusammenhang mit der epidemiologischen Anamnese jedes einzelnen Patienten, seinem derzeitigen Gesundheitszustand und sonstigen diagnostischen Untersuchungen bewertet werden.

Unzuverlässige oder unbestimmte Ergebnisse können folgende Ursachen haben:

- Abweichungen von dem in der QuantiFERON-CMV ELISA Packungsbeilage beschriebenen Verfahren
- Übermäßig hohe IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im Kontrollröhrchen
- Überschreitung des Zeitraums von 16 Stunden zwischen Blutabnahme und Inkubation bei 37 °C.

## Erwartungswerte

Die IFN- $\gamma$ -Erwartungswerte mit QuantiFERON-CMV stammen aus Tests von 591 Proben von gesunden Probanden. 343 Proben testeten seropositiv und 248 Proben testeten seronegativ auf CMV IgG. Der CMV-Serostatus war zum Zeitpunkt der QF-CMV-Tests nicht bekannt. Von den 248 Proben von CMV-seronegativen Probanden waren 100 % (248/248) der getesteten Proben mit dem QF-CMV ELISA-Test nicht-reaktiv, d. h. zeigten eine IFN- $\gamma$ -Antwort auf das CMV-Antigen-Röhrchen  $< 0,2$  IU/ml (nach Subtraktion der Negativkontrolle). Die Verteilung der IFN- $\gamma$ -Antworten auf das CMV-Antigen-Röhrchen (nach Subtraktion der Negativkontrolle) ist für die 343 CMV-seropositiven Probanden in Abbildung 2 dargestellt.

Anzahl der Proben

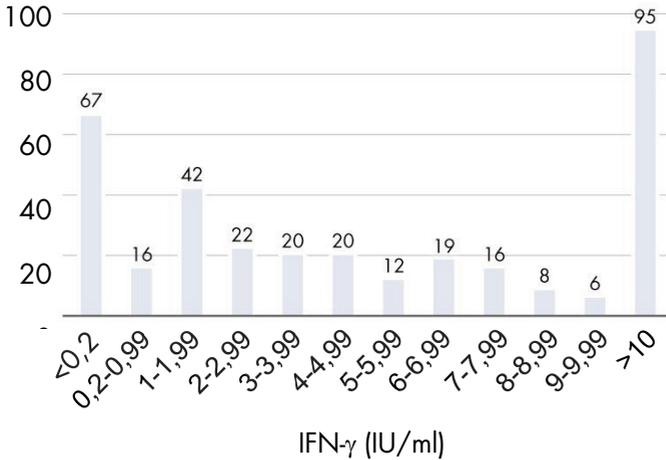


Abbildung 2. Verteilung der QF-CMV IFN- $\gamma$ -Antworten (nach Subtraktion der Negativkontrolle) bei seropositiven gesunden Probanden (n = 343).

Bei 733 Proben von gesunden erwachsenen Probanden wurde die Verteilung der IFN- $\gamma$ -Antworten auf Mitogen (nach Subtraktion der Negativkontrolle) mit dem QF-CMV ELISA-Test ungeachtet des CMV-IgG-Serostatus bestimmt (Abbildung 3). Ein Mitogenergebnis von unter 0,5 IU/ml (nach Subtraktion der Negativkontrolle) zeigt entweder auf ein Versagen des Tests oder auf einen immunsupprimierten Probanden an. In einer gesunden Population fielen nur 2 von 733 Ergebnissen in diese Kategorie.

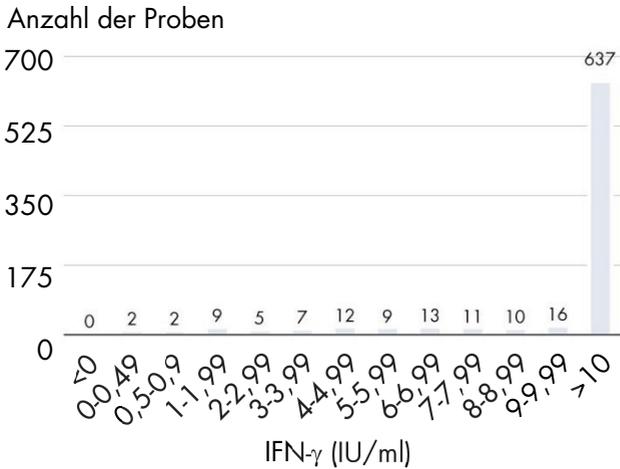


Abbildung 3. Verteilung der IFN- $\gamma$ -Antworten auf Mitogen (nach Subtraktion der Negativkontrolle) bei gesunden Probanden (n = 733).

Bei 1020 Proben von gesunden erwachsenen Probanden wurde die Verteilung der IFN- $\gamma$ -Antworten auf die Negativkontrollen mit dem QF-CMV ELISA-Test ungeachtet des CMV-IgG-Serostatus bestimmt (Abbildung 4).

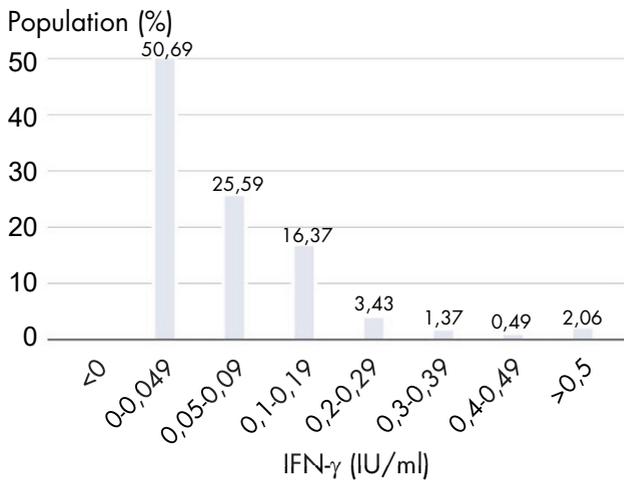


Abbildung 4. Verteilung der IFN $\gamma$ -Antworten auf die Negativkontrollen bei gesunden Probanden (n = 1020) in Prozent relativ zur Gesamtpopulation.

# Leistungsmerkmale

## Klinische Leistungsmerkmale

Nach Analyse der Ergebnisse von einer Gruppe gesunder Probanden (n = 223) wurde ein Grenzwert zum Nachweis einer vorangegangenen CMV-Exposition mit Hilfe des QF-CMV-Tests festgelegt. Dazu wurden die QF-CMV-Ergebnisse mit dem jeweiligen CMV-IgG-Serostatus verglichen. Eine ROC-Analyse ergab, dass ein Testgrenzwert von 0,04 IU/ml (nach Subtraktion der Negativkontrollen) die besten positiven und negativen Vorhersagewerte für QF-CMV ergab (Fläche unter der Kurve = 0,9679 [95%-KI: 0,9442–0,9915, p < 0,0001]). Dieser Wert stellte daher den Grenzwert dar, bei dem dieser Test bei einer gesunden Population mit Blick auf seine Indikation am effektivsten war.

Die Leistung des QF-CMV-Tests wurde mit dem serologischen SeraQuest™ CMV IgG-Test (Quest International) verglichen. Der QF-CMV-Test stimmte bei 95 % der gesunden Probanden (294/310 Probanden) mit dem Ergebnis des serologischen CMV-IgG-Vergleichstests überein. Keiner der 149 seronegativen Spender zeigte eine positive Reaktion im QF-CMV-Test, und 145 der 161 seropositiven Spender zeigten ein reaktives QF-CMV-Ergebnis. Die positive Übereinstimmung betrug insgesamt 90 % und die negative Übereinstimmung 100 %. Die Übereinstimmung zwischen den QF-CMV-Ergebnissen und dem CMV-IgG-Serostatus bei gesunden Probanden ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3. Übereinstimmung von QuantiFERON-CMV-Test und serologischem CMV-IgG-Test bei gesunden Probanden

		CMV-Serologie		Insgesamt
		Positiv	Negativ	
QuantiFERON-CMV	Reaktiv	145	0	145 (46,8 %)
	Nicht reaktiv	16	149	165 (53,2 %)
	Insgesamt	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

---

## Grenzwert des Tests

Für den klinischen Einsatz wird für diesen Test ein Grenzwert von 0,2 IU/ml für das CMV-Antigen-Röhrchen (nach Subtraktion der Negativkontrolle) empfohlen; je nach klinischer Situation können aber auch andere Grenzwerte validiert werden.

## Klinische Studien

Da kein definitiver Standard für die Bestätigung oder den Ausschluss der Diagnose Zytomegalievirus-Infektion existiert, ist eine Bestimmung der Sensitivität und Spezifität des QF-CMV-Tests nicht möglich. Spezifität und Sensitivität des QF-CMV-Tests wurden jedoch näherungsweise bestimmt, indem die Übereinstimmung zwischen den QF-CMV-Ergebnissen und dem CMV-IgG-Serostatus bei gesunden Probanden evaluiert wurde.

Die Spezifität des QF-CMV-Tests wurde näherungsweise bestimmt, indem die Falsch-positiv-Rate (reaktives QF-CMV-Ergebnis) bei gesunden Probanden ohne Hinweis auf eine vorangegangene CMV-Exposition (d. h. bei CMV-IgG-seronegativen Probanden) evaluiert wurde. Die Sensitivität wurde näherungsweise bestimmt, indem die QF-CMV-Reaktionsfähigkeit der Proben gesunder Spender mit Hinweis auf eine vorangegangene CMV-Exposition (d. h. bei CMV-IgG-seropositiven Probanden) evaluiert wurde. Da im QF-CMV-Test eine große Anzahl CMV-spezifischer Epitope von unterschiedlichen CMV-Proteinen zum Einsatz kommt, ist dieser Test für eine große Population mit unterschiedlichen HLA-Klasse-I-Haplotypen geeignet (ungefähr 98 % der Gesamtbevölkerung). Da die HLA-Haplotypen der Probanden nicht bekannt waren, entsprach es den Erwartungen, dass ein kleiner Anteil der seropositiven Proben in QF-CMV-Blutentnahmeröhrchen keine Reaktion zeigte.

---

## Spezifität

Eine Studie mit 591 Proben von gesunden Probanden ergab keine falsch-positiven QF-CMV-Ergebnisse für Probanden, die CMV-IgG-seronegativ getestet wurden (248/248 Proben nicht-reaktiv gemäß QF-CMV ELISA-Test und negativ gemäß serologischem CMV-IgG-Test). Zwischen den Ergebnissen des QF-CMV-Tests und des serologischen CMV-IgG-Tests besteht somit eine Übereinstimmung von 100 %.

In allen anderen Spezifitätsstudien mit Empfängern von soliden Organtransplantaten (1–8), Empfängern hämatopoetischer Stammzelltransplantate (9,10) und HIV-infizierten Patienten (11) betrug die Übereinstimmung zwischen dem QF-CMV-Test und dem CMV-IgG-Serostatus ebenfalls 100 %.

## Sensitivität

In einer Studie, in der 343 Proben von gesunden, CMV-IgG-seropositiven Patienten getestet wurden, lag die Übereinstimmung zwischen den QF-CMV-Ergebnissen und den Ergebnissen des serologischen CMV-IgG-Tests bei 80,5 %. Dabei waren 276/343 Proben gemäß QF-CMV-Test reaktiv und gemäß serologischem CMV-IgG-Test positiv. Diese fehlende Übereinstimmung ist u. U. auf eine falsch-positive CMV-Serologie oder die Abwesenheit reaktionsfähiger HLA-Typen bei den getesteten Probanden zurückzuführen.

Die Übereinstimmungen in den Sensitivitätsstudien, die an Empfängern solider Organtransplantate (1–8), Empfängern hämatopoetischer Stammzelltransplantate (9, 10) und HIV-infizierten Patienten (11) durchgeführt wurden, waren geringer. Dies ist u. U. auf eine falsch-positive CMV-Serologie, die Abwesenheit reaktionsfähiger HLA-Typen bei den getesteten Probanden oder die Abwesenheit reaktiver T-Zellen bei diesen Patienten infolge der Immunsuppression zurückzuführen.

---

## Studien zum klinischen Nutzen

Der vorgesehene Verwendungszweck sowohl des serologischen CMV-IgG-Tests als auch des QF-CMV-Tests ist der Nachweis der Immunität gegenüber CMV. Bei Transplantationen wird die CMV-Serologie häufig vor der Transplantation genutzt, um beim Empfänger das Risiko von CMV-Komplikationen nach der Transplantation abschätzen zu können; nach der Transplantation ist sie jedoch nur von begrenztem Nutzen. Alternativ kann der QF-CMV-Test bei Transplantatempfängern zur Abschätzung der CMV-Immunität bei solchen Patienten eingesetzt werden, die aufgrund einer Immunsuppression ein erhöhtes Risiko für eine symptomatische CMV-Infektion und/oder -erkrankung aufweisen (12–15).

Eine Reihe veröffentlichter klinischer Studien an unterschiedlichen Transplantationskohorten hat den Nutzen des QuantiFERON-CMV-Tests gezeigt (1–11, 15, 16).

In einer großen Studie an 108 Empfängern von soliden Organtransplantaten (4) wiesen Patienten mit einem reaktiven QF-CMV-Ergebnis nach Abschluss einer CMV-Prophylaxe eine signifikant niedrigere Rate für eine nachfolgende CMV-Krankheit auf (3,3 % oder 1/30, mit einem Grenzwert von 0,2 IU/ml) als solche mit einem nicht-reaktiven QF-CMV-Ergebnis (21,8 % oder 17/78,  $p = 0,044$ ) (Abbildung 5).

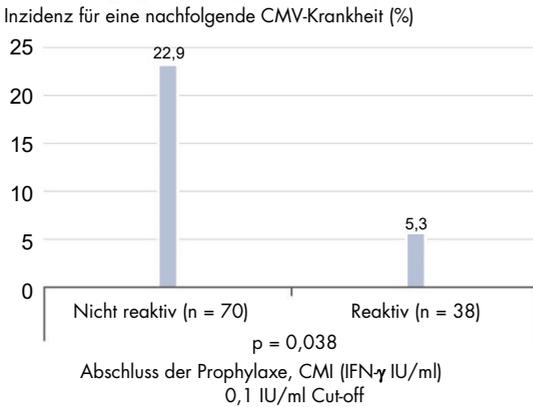
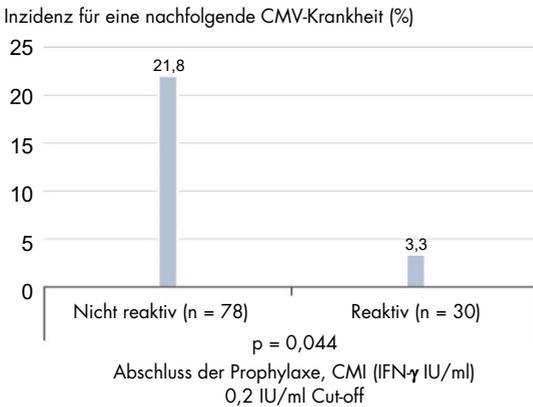
**A****B**

Abbildung 5. Vergleich der Inzidenz spät einsetzender CMV-Krankheit bei Patienten mit reaktivem QuantiFERON-CMV-Ergebnis gegenüber Patienten mit einem nicht-reaktiven QF-CMV-Ergebnis nach Abschluss der Prophylaxe. Zugrunde liegende Daten aus Kumar et al. (4).

Darüber hinaus blieben CMV-seronegative Transplantatempfänger, die ein Organ von einem CMV-positiven Spender (D+R-) mit einem reaktiven QF-CMV-Ergebnis erhielten, nach

---

Abschluss der Prophylaxe häufiger und über längere Zeiträume CMV-krankheitsfrei. Dies weist darauf hin, dass der QF-CMV-Test zur Identifizierung von Personen eingesetzt werden kann, bei denen das Risiko einer spät einsetzenden CMV-Krankheit besteht.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie war auch, dass in dieser Gruppe der Transplantatempfänger mit dem höchsten Risiko einer CMV-Krankheit (D+/R-) ein reaktives Ergebnis zu einem beliebigen Zeitpunkt nach der Prophylaxe mit einer höheren Wahrscheinlichkeit verbunden war, CMV-krankheitsfrei zu bleiben.

In einer Studie an 37 Empfängern von soliden Organtransplantaten (6) half eine Bestimmung der CMV-spezifischen Antwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels QF-CMV-Test bei der Vorhersage spontaner Viruselimination gegenüber Progression der CMV-Krankheit nach erhöhter CMV-Virämie. In dieser Studie trat bei 24 von 26 Patienten (92,3 %) mit einem reaktiven QF-CMV-Ergebnis (Grenzwert des Tests: IFN- $\gamma$   $\geq$  0,2 IU/ml) eine spontane CMV-Viruselimination auf, während dieses klinische Ergebnis nur bei 5 von 11 Patienten (45,5 %) mit einem nicht-reaktiven QF-CMV-Ergebnis beobachtet wurde.

In einer Studie an 67 Lungentransplantatempfängern, in der das Auftreten von CMV-Virämie nach der Transplantation untersucht wurde (7), traten bei 18 von 25 (72 %) Patienten mit vorangehendem nicht-reaktivem QF-CMV-Ergebnis Virämieepisoden auf, während dies nur bei 4 von 16 (25 %) Patienten mit vorangehendem reaktivem QF-CMV-Ergebnis der Fall war (Fisher-Test:  $p = 0,0046$ ; Abbildung 6).

% HCMV-DNAämie-Episoden mit einer  
Viruslast von > 1000 Kopien/ml

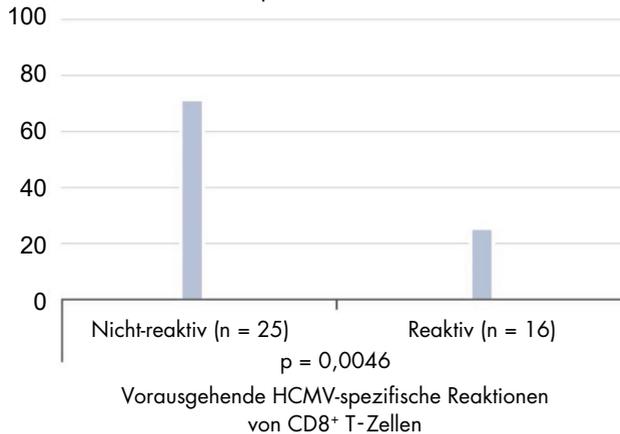


Abbildung 6. Statistische Analyse der CMV-spezifischen Antwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, gemessen mittels QuantiFERON-CMV-Test, und der Entwicklung einer CMV-Virämie (Fisher-Test: p = 0,0046). Zugrunde liegende Daten aus Weseslindtner et al (7).

Eine große prospektive multizentrische Studie an 127 Empfängern von soliden Organtransplantaten (8) (Spender CMV-seropositiv, Empfänger CMV-seronegativ), die alle eine antivirale Prophylaxe erhielten, zeigte, dass Patienten, die zu einem beliebigen Zeitpunkt nach Abschluss der CMV-Prophylaxe ein reaktives QF-CMV-Ergebnis (Grenzwert des Tests 0,1 IU/ml) aufwiesen, 12 Monate nach der Transplantation eine signifikant niedrigere Rate an spät einsetzender CMV-Krankheit aufwiesen (6,4 %) als solche mit einem nicht-reaktiven (22,2 %) bzw. unbestimmten (58,3 %) QF-CMV-Ergebnis (p < 0,001). Wenn die unbestimmten Ergebnisse ebenfalls in die Kategorie „nicht-reaktiv“ eingestuft wurden, betrug die Inzidenz einer nachfolgenden CMV-Krankheit 6,4 % vs. 26,8 % (p = 0,024). Die positiven und negativen Vorhersagewerte des QF-CMV-Tests für den Schutz vor CMV-Krankheit betragen jeweils 0,90 (95%-KI: 0,74–0,98) und 0,27 (95%-KI: 0,18–0,37). Im Ergebnis zeigte diese Studie, dass der QF-CMV-Test für die Vorhersage nützlich sein kann,

---

ob bei Patienten ein niedriges, mittleres oder hohes Risiko für die Entwicklung einer CMV-Krankheit nach einer Prophylaxe vorliegt.

In einer prospektiven Studie an 55 Empfängern solider Organtransplantate (8), in der der Zusammenhang zwischen den QF-CMV-Testergebnissen vor der Transplantation und dem Auftreten von CMV-Replikation nach der Transplantation untersucht wurde, wurde bei CMV-seropositiven Empfängern mit einem nicht-reaktiven QF-CMV-Ergebnis (Grenzwert des Tests 0,2 IU/ml) vor der Transplantation eine höhere Inzidenz einer CMV-Replikation gefunden (7 von 14 oder 50 %) als in CMV-seropositiven Empfängern mit einem reaktiven QF-CMV-Ergebnis vor der Transplantation (4 von 30 oder 13,3 %,  $p = 0,021$ ).

Diese Studie ergab, dass bei Empfängern, die ein Organ von einem CMV-seropositiven Spender erhielten, bei einem nicht-reaktiven QF-CMV-Ergebnis vor der Transplantation im Vergleich zu einem reaktiven QF-CMV-Ergebnis ein 10fach erhöhtes Risiko einer CMV-Replikation besteht (adjustierte Odds Ratio (OR): 10,49, 95%-KI: 1,88–58,46). Ein vor der Transplantation durchgeführter QF-CMV-Test kann daher nützlich sein, um das Risiko einer CMV-Replikation nach der Transplantation vorherzusagen, so dass nach einer Organtransplantation fallspezifisch wichtige Entscheidungen bezüglich des CMV-Infektionsmanagements getroffen werden können.

Weitere Studien zur Untersuchung des Nachweises von CMV-spezifischen Reaktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels QF-CMV-Test bei Transplantatempfängern wurden abgeschlossen (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) oder werden derzeit weltweit durchgeführt.

---

## Internationale Konsensusleitlinien zum CMV-Infektionsmanagement bei Transplantationen solider Organe

Die internationalen Konsensusleitlinien „*Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation*“ (12) stellen die Bedeutung eines CMV-spezifischen Immunmonitorings heraus. Diese internationalen Leitlinien, die von einem von der Fachgruppe Infektionskrankheiten der TTS (The Transplantation Society) berufenen Expertengremium mit den Fachgebieten CMV und Transplantation solider Organe ausgearbeitet wurden, stellen auf Evidenz und Expertenmeinung beruhende Konsensusleitlinien zum CMV-Infektionsmanagement dar, in denen Aspekte der Diagnostik, Immunologie, Prävention und Therapie berücksichtigt werden.

Diese Leitlinien kommen zu folgendem Ergebnis: „Das Immunmonitoring der CMV-spezifischen T-Zell-Antwort kann möglicherweise Patienten mit einem Risiko für eine CMV-Krankheit nach der Transplantation identifizieren und bei Entscheidungen zur Prophylaxe oder präemptiven Therapie nützlich sein.“ (12).

In den Leitlinien werden außerdem Empfehlungen zu den Eigenschaften des idealen Tests für das Immunmonitoring gegeben, darunter:

- Möglichkeit der Bestimmung der Menge und Funktion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen des Transplantatempfängers
- Möglichkeit zur Bestimmung von IFN- $\gamma$
- Einfache Durchführung, Wirtschaftlichkeit und Reproduzierbarkeit
- Schnelle Durchführung
- Einfacher Versand der Proben an spezialisierte Referenzlabore

Der QF-CMV-Test erfüllt praktisch alle in diesen Leitlinien geforderten Kriterien und ist der einzige standardisierte Test für das Immunmonitoring, mit dem CMV-spezifisches IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden kann.

# Assay-Leistungsmerkmale

Der QF-CMV ELISA verwendet einen rekombinanten Human-IFN- $\gamma$ -Standard, der gegen ein IFN- $\gamma$ -Referenzpräparat getestet wurde (NIH-Ref.: Gxg01-902-535). Die Ergebnisse der Testproben werden in internationalen Einheiten (International Units, IU) angegeben und anhand einer Standardkurve bestimmt, die durch Tests einer Verdünnung des im Kit vorhandenen Sekundärstandards erstellt wurde.

Es ist bekannt, dass im Serum oder Plasma vorliegende heterophile (z. B. humane Anti-Maus-) Antikörper bestimmter Personen Immunassays stören. Der Effekt heterophiler Antikörper wurde im QF-CMV ELISA dadurch minimiert, dass der grünen Verdünnungslösung Normalserum von Mäusen zugegeben wurde und als IFN- $\gamma$ -Fängerantikörper monoklonale F(ab')<sub>2</sub>-Antikörperfragmente verwendet werden, mit denen die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet sind.

Die Nachweisgrenze des QF-CMV ELISA beträgt 0,065 IU/ml und es liegen keine Hinweise auf einen High-Dose-Hook-Effekt (Prozoneneffekt) bei IFN- $\gamma$ -Konzentrationen bis zu 10.000 IU/ml vor. Die Antikörper des QF-CMV ELISA zeigen keine Kreuzreaktion mit den getesteten Zytokinen (IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 und IL12).

Die Linearität des QF-CMV ELISA wurde nachgewiesen. Hierzu wurden 11 Plasmapools mit bekannten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen jeweils in Fünffachbestimmungen in zufälliger Anordnung auf der ELISA-Platte untersucht. Die Regressionsgerade hat eine Steigung von  $1,002 \pm 0,011$  und einen Korrelationskoeffizienten von 0,99 (Abbildung 7).

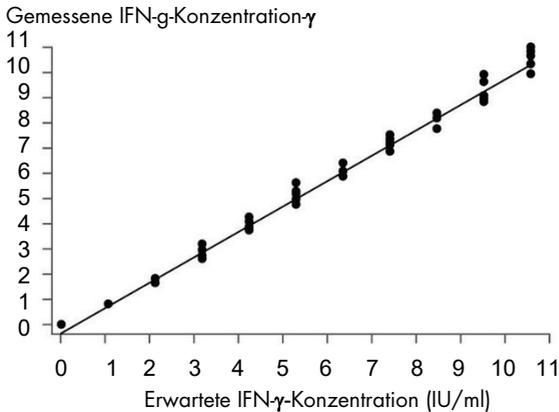


Abbildung 7. Bestimmung der Linearität des QF-CMV ELISA durch die Messung von 11 Plasmaproben mit bekannten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Fünffachbestimmung.

Die Reproduzierbarkeit des QF-CMV ELISA wurde bestimmt, indem 20 Plasmaproben mit verschiedenen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Dreifachbestimmungen, in drei Laboren, an drei nicht aufeinander folgenden Tagen und von drei verschiedenen Anwendern getestet wurden. Jede Probe wurde also 27-mal in 9 unabhängigen Testläufen getestet. Eine Probe war die Negativkontrolle; ihre IFN- $\gamma$ -Konzentration wurde mit 0,08 IU/ml (95%-KI: 0,07–0,09) bestimmt. Die übrigen 19 Plasmaproben umspannten einen Konzentrationsbereich von 0,33 (95%-KI: 0,31–0,34) bis 7,7 IU/ml (95%-KI: 7,48–7,92).

Die Präzision eines Laufs („Intraassay“) wurde bestimmt, indem die prozentualen Variationskoeffizienten (%VK) der IFN- $\gamma$ -haltigen Plasmaproben von den einzelnen Plattenläufen (n = 9) gemittelt wurden. Sie lag zwischen 4,1 und 9,1 %VK. Im Mittel betrug der %VK ( $\pm$ 95%-KI) der Intra-Assay-Präzision  $6,6 \pm 0,6$  %. Für die Plasmaprobe ohne IFN- $\gamma$  betrug der mittlere %VK 14,1 %.

Die Gesamtungenauigkeit bzw. Ungenauigkeit im Vergleich von Läufen („Interassay“) wurde bestimmt, indem die 27 berechneten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen jeder Plasmaprobe miteinander verglichen wurden. Sie lag zwischen 6,6 und 12,3 %VK. Der mittlere Gesamt-%VK ( $\pm$  95%-

---

KI) lag bei  $8,7 \pm 0,7$  %. Die Plasmaprobe ohne IFN- $\gamma$  betrug der %VK 26,1 %. Diese Größenordnung ist zu erwarten, da die berechnete IFN- $\gamma$ -Konzentration niedrig ist die Variation um einen niedrigen Konzentrationswert stärker ist als bei höheren Konzentrationen.

## Technische Informationen

### Unbestimmte Ergebnisse

Unbestimmte Ergebnisse können auf den Immunstatus des untersuchten Patienten zurückzuführen sein, sie können aber auch mit verschiedenen technischen Faktoren zusammenhängen:

- Überschreitung des Zeitraums von 16 Stunden zwischen Blutabnahme und Inkubation bei 37 °C
- Lagerung der Blutprobe außerhalb des empfohlenen Temperaturbereichs ( $22 \pm 5$  °C)
- Unzureichendes Mischen der Blutentnahmeröhrchen
- Unzureichendes Waschen der ELISA-Platte

Falls technische Probleme bei der Blutabnahme oder der Handhabung der Blutproben vermutet werden, muss der gesamte QF-CMV-Test mit neuen Blutproben wiederholt werden. Falls Verfahrensabweichungen bei der Durchführung des ELISA-Tests vermutet werden, kann der ELISA-Test mit den stimulierten Plasmaproben wiederholt werden. Bei unbestimmten Ergebnissen (aufgrund niedriger Mitogen-Werte) wird auch bei einer Wiederholung kein anderes Ergebnis erwartet, es sei denn, bei der Durchführung des ELISA-Tests trat ein Fehler auf.

---

## Geronnene Plasmaproben

Wenn bei der Langzeitlagerung von Plasmaproben Fibringerinnsel auftreten, zentrifugieren Sie die Proben, damit sich das geronnene Material absetzt und das Plasma abpipettiert werden kann.

# Fehlerbehebung

In diesem Abschnitt zur Fehlerbehebung finden Sie hilfreiche Informationen zur Behebung möglicher Probleme. Weitere Informationen finden Sie auch in den Technischen Informationen unter: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com). Kontaktangaben finden Sie auf der Rückseite.

## Kommentare und Vorschläge

### Niedrige OD-Messwerte für die Standards

- |  |   |
|--|---|
| a) Fehler beim Verdünnen der Standards         | Stellen Sie sicher, dass die Verdünnungen des Kit-Standards wie in der QF-CMV ELISA Packungsbeilage angegeben hergestellt werden.   |
| b) Pipettierfehler                             | Stellen Sie sicher, dass die Pipetten gemäß den Herstellerempfehlungen kalibriert und verwendet werden.   |
| c) Inkubationstemperatur zu niedrig            | Die Inkubation des ELISA muss bei Raumtemperatur ( $22 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) durchgeführt werden.   |
| d) Inkubationszeit zu kurz                     | Die Inkubation der Platte mit Konjugat, Standards und Proben muss über $120 \pm 5$ Minuten erfolgen. Die Enzymsubstratlösung wird 30 Minuten lang auf der Platte inkubiert.                                     |
| e) Falscher Filter im Platten-Reader verwendet | Die Platte muss bei 450 nm gemessen werden, mit einem Referenzfilter zwischen 620 und 650 nm.   |
| f) Reagenzien sind zu kalt                     | Alle Reagenzien, mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats, müssen vor Durchführung des Tests auf Raumtemperatur gebracht werden. Dies dauert etwa 1 Stunde.  |
| g) Kit/Komponenten abgelaufen                  | Vergewissern Sie sich, dass das Verfallsdatum des Kits nicht abgelaufen ist. Achten Sie darauf, dass Standard und 100x Konjugatkonzentrat nur innerhalb von 3 Monaten nach der Rekonstitution verwendet werden. |

### Nicht-spezifische Farbentwicklung

- |  |   |
|--|---|
| a) Platte unzureichend gewaschen       | Waschen Sie die Platte mindestens sechsmal mit 400 $\mu\text{l}$ Waschpuffer pro Well. Je nach verwendetem Waschgerät können mehr als sechs Waschzyklen erforderlich sein. Der Waschpuffer muss in jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken können. |
| b) Kreuzkontamination der ELISA-Wellen | Gehen Sie beim Pipettieren und Mischen von Proben mit Vorsicht vor, um das Risiko von Kreuzkontaminationen möglichst gering zu halten.  |

## Kommentare und Vorschläge

- |   |   |
|---|---|
| c) Kit/Komponenten abgelaufen   | Vergewissern Sie sich, dass das Verfallsdatum des Kits nicht abgelaufen ist. Achten Sie darauf, dass Standard und 100x Konjugatkonzentrat nur innerhalb von 3 Monaten nach der Rekonstitution verwendet werden. |
| d) Enzymsubstratlösung ist verunreinigt                                   | Verwerfen Sie die Substratlösung, wenn sie blau gefärbt ist. Stellen Sie sicher, dass die verwendeten Reagenzbehälter sauber sind.  |
| e) Mischen des Plasmas in den Zentrifugenröhrchen vor Abnahme des Plasmas | Achten Sie darauf, dass die Plasmaproben vorsichtig von oberhalb des Gels ohne Auf- und Abpipettieren abgenommen werden und dass dabei nicht das Material an der Oberfläche des Gels aufgewirbelt wird.         |

### Hoher Hintergrund

- |   |  |
|---|--|
| a) Platte unzureichend gewaschen        | Waschen Sie die Platte mindestens sechsmal mit 400 µl Waschpuffer pro Well. Je nach verwendetem Waschgerät können mehr als sechs Waschzyklen erforderlich sein. Der Waschpuffer muss in jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken können. |
| b) Inkubationstemperatur zu hoch        | Die Inkubation des ELISA muss bei Raumtemperatur ( $22 \pm 5$ °C) durchgeführt werden.   |
| c) Kit/Komponenten abgelaufen           | Vergewissern Sie sich, dass das Verfallsdatum des Kits nicht abgelaufen ist. Achten Sie darauf, dass Standard und 100x Konjugatkonzentrat nur innerhalb von 3 Monaten nach der Rekonstitution verwendet werden.                              |
| d) Enzymsubstratlösung ist verunreinigt | Verwerfen Sie die Substratlösung, wenn sie blau gefärbt ist. Stellen Sie sicher, dass die verwendeten Reagenzbehälter sauber sind.   |

### Nicht lineare Standardkurve und Variabilität bei Doppelbestimmungen

- |   |  |
|---|--|
| a) Platte unzureichend gewaschen  | Waschen Sie die Platte mindestens sechsmal mit 400 µl Waschpuffer pro Well. Je nach verwendetem Waschgerät können mehr als sechs Waschzyklen erforderlich sein. Der Waschpuffer muss in jedem Zyklus mindestens 5 Sekunden einwirken können. |
| b) Fehler beim Verdünnen der Standards  | Stellen Sie sicher, dass die Verdünnungen des Kit-Standards wie in dieser Packungsbeilage angegeben hergestellt werden.  |
| c) Unzureichendes Mischen   | Mischen Sie die Reagenzien gründlich durch Überkopfdrehen oder vorsichtiges Mischen mit dem Vortex-Mischer, bevor sie zur Platte zugegeben werden.   |
| d) Nicht einheitliche Pipettierung oder Unterbrechung bei der Assay-Konfiguration | Die Zugabe von Proben und Standards muss in einem kontinuierlichen Prozess erfolgen. Alle Reagenzien sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.  |

Produktinformationen und technische Anleitungen können kostenlos von QIAGEN oder Ihrem Händler angefordert oder unter [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com) eingesehen werden.

# Literatur

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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 12, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- $\gamma$  secretion by CMV-specific CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T-cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4<sup>+</sup> 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.

## Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:

Symbol	Bedeutung des Symbols
 <N>	Kit enthält Reagenzien für <N> Reaktionen
	Verwendbar bis
	CE-Kennzeichnung
	In-vitro-Diagnostikum
	Katalognummer
	Chargenbezeichnung

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Materialnummer
	Global Trade Item Number (GTIN)
	Zulässiger Temperaturbereich
	Nicht zur Wiederverwendung
	Vor Sonneneinstrahlung schützen
	Gebrauchsanweisung beachten
	Hersteller
	Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft

## Kontakt

Technische Hinweise und weitere Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support). Sie können uns außerdem telefonisch unter 00800-22-44-6000 erreichen oder unseren Technischen Service kontaktieren oder sich an Ihren örtlichen Distributor wenden (Kontaktinformationen siehe Rückseite oder unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Kurzanleitung zum ELISA-Test

## Stufe 1: Inkubation des Bluts

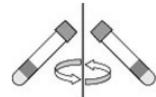
1. Blut des Patienten in Blutentnahmeröhrchen abnehmen und die Röhrchen dann zehnmal (10x) gerade so stark schütteln, dass die gesamte Innenwand des Röhrchens mit Blut bedeckt ist, um die Antigene an der Röhrchenwand zu lösen.



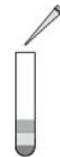
2. Röhrchen senkrecht stellen und 16–24 Stunden lang bei  $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubieren.



3. Die Röhrchen nach der Inkubation 15 Minuten lang bei 2000–3000 g RZB (g) zentrifugieren, um das Plasma von den Erythrozyten zu trennen.



4. Vermeiden Sie nach der Zentrifugation unbedingt ein Auf- und Abpipettieren oder Mischen des Plasmas vor der Entnahme. Achten Sie stets darauf, das Material an der Geloberfläche nicht zu verwirbeln.

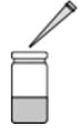


## Stufe 2: IFN- $\gamma$ -ELISA

1. Alle Komponenten des ELISA, mit Ausnahme des 100x Konjugatkonzentrats, mindestens 60 Minuten lang auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen.



2. Den Kit-Standard mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf 8,0 IU/ml rekonstituieren. Vier (4) Standardverdünnungen herstellen.



3. Das lyophilisierte 100× Konjugatkonzentrat mit entionisiertem oder destilliertem Wasser rekonstituieren.



4. Gebrauchsfertig verdünntes Konjugat mit Hilfe von grüner Verdünnungslösung herstellen und 50 µl in jedes Well geben.

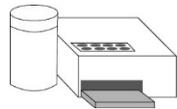


5. 50 µl der zu testenden Plasmaproben und 50 µl der Standards in die entsprechenden Wells geben. Auf dem Schüttler mischen.



6. 120 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.

7. Die Wells mindestens 6-mal mit 400 µl Waschpuffer pro Well waschen.



8. Je 100 µl Enzymsubstratlösung in die Wells geben. Auf dem Schüttler mischen.



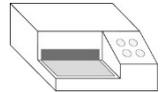
9. 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.



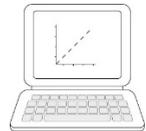
10. 50  $\mu$ l Enzymstopplösung in jedes Well geben. Auf dem Schüttler mischen.



11. Ergebnisse bei 450 nm mit einem Referenzfilter zwischen 620 und 650 nm ablesen.



12. Ergebnisse auswerten.



# Bearbeitungsverlauf des Dokuments

Dokument	Änderungen	Datum
L1075110-R5	Hinzufügung von Sicherheitshinweisen zu beschädigten Fläschchen Aktualisierung von Tabelle 2 „Interpretation der QuantiFERON-CMV- Ergebnisse“ auf Seite 25.	Februar 2018
L1075110-R5	Aktualisierung der GHS-Informationen auf Seite 10.	Februar 2018

---

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

---

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

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

#### Eingeschränkte Lizenzvereinbarung für QuantiFERON-CMV ELISA

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer oder Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Panel mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Panels gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Panels gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN-Anwendern für andere QIAGEN-Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
  2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
  3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
  4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
  5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen.
- Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen finden Sie im Internet unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Feb-18 © 2018 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

---

Bestellungen [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technischer Support [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Website [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)