

Veljača 2018.

QuantiFERON[®]-CMV ELISA

Uputa za upotrebu



Interferon gama (IFN- γ) test pune krvi za mjerenje reakcije na peptidne antigene humanog citomegalovirusa

IVD Za in vitro dijagnostičku namjenu



REF 0350-0201



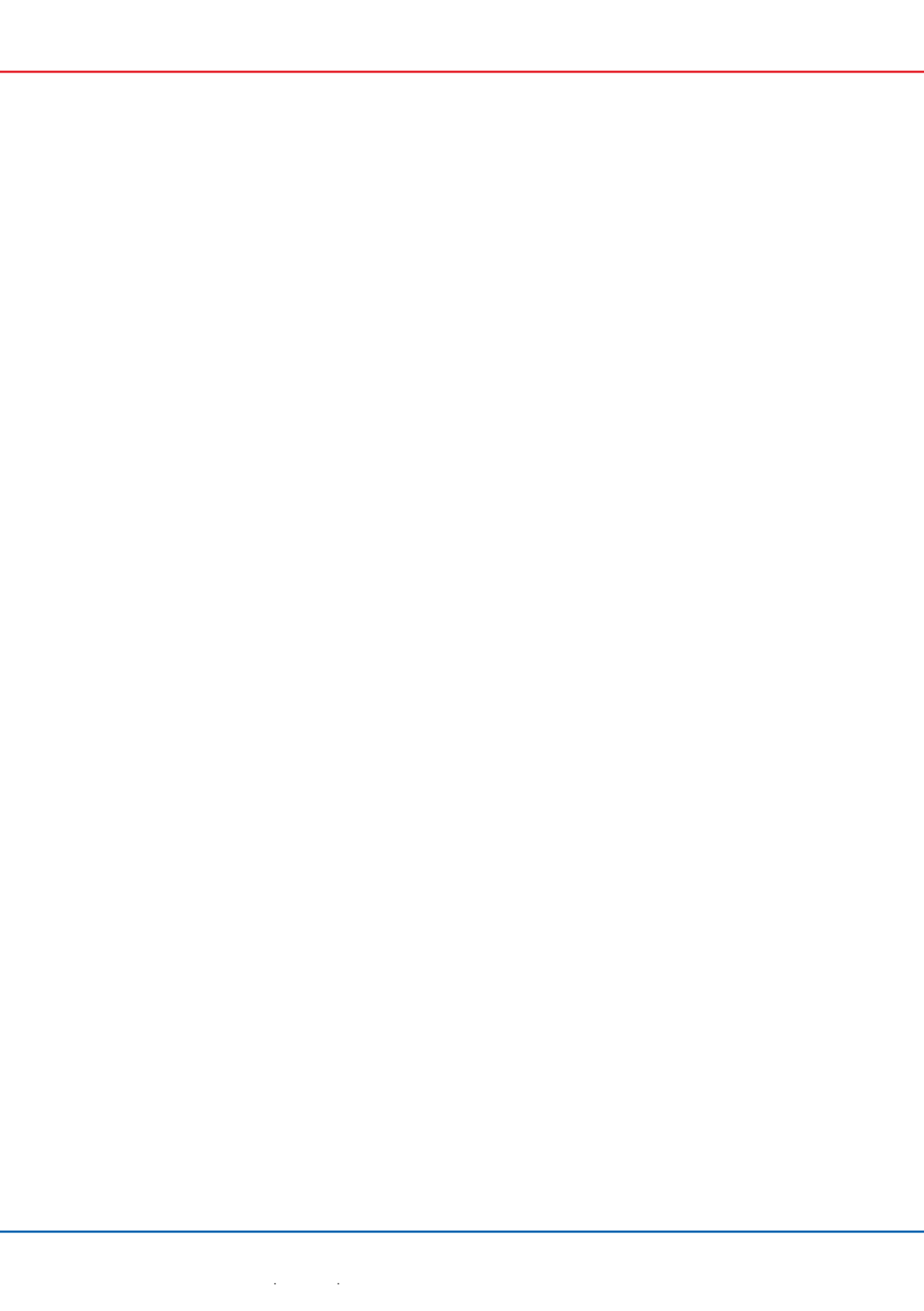
QIAGEN, 19300 Germantown Road, Germantown,
MD 20874, SAD +1-800-426-8157

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

1075110HR Rev. 05



www.QuantiFERON.com



Sadržaj

Namjena	5
Sažetak i objašnjenje.....	5
Načelo postupka.....	6
Vrijeme potrebno za testiranje.....	7
Uključeni materijali	8
Sadržaj kompleta	8
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni.....	9
Upozorenja i mjere opreza	9
Sigurnosne informacije.....	11
Pohrana i rukovanje uzorcima	12
Uzimanje uzoraka i rukovanje	13
Postupak	16
Faza 1: Inkubacija krvi i prikupljanje plazme	16
Faza 2: QuantiFERON-CMV ELISA za humani IFN-γ.....	17
Izračunavanje i tumačenje rezultata	22
Izrada standardne krivulje (ako se ne upotrebljava softver za analizu QF-CMV)....	22
Kontrola kvalitete testa	23
Tumačenje rezultata	24
Ograničenja	25
Očekivane vrijednosti	25
Radne značajke.....	28
Kliničke performanse.....	28

Granična vrijednost testa	29
Klinička ispitivanja	29
Specifičnost.....	30
Osjetljivost.....	30
Ispitivanja koja upućuju na kliničku korist.....	31
Međunarodne smjernice o postupanju s citomegalovirusom pri transplantaciji čvrstih organa	35
Radne značajke testa	36
Tehnički podaci	38
Neodređeni rezultati	38
Zgrušani uzorci plazme	38
Vodič za rješavanje problema	39
Referencije	41
Simboli.....	43
Kontaktne podaci.....	44
Skraćeni testni postupak ELISA	45
Faza 1: Inkubacija krvi	45
Faza 2: IFN- γ ELISA.....	46
Povijest revizija priručnika	48

Namjena

QuantIFERON-CMV ELISA (QF-CMV) jest in vitro test koji se izvodi s pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine humanog citomegalovirusa (cytomegalovirus, CMV) radi stimuliranja stanica heparinizirane pune krvi. Otkrivanje interferona gama (interferon-gamma, IFN- γ) enzimski vezanim imunosorbent testom (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) upotrebljava se za mjerenje in vitro reakcija na te peptidne antigene koji su povezani s imunološkim nadzorom infekcije CMV-om. Gubitak te funkcije imunološkog sustava može se povezati s razvojem CMV bolesti. Test QF-CMV namijenjen je za praćenje razine pacijentova imuniteta na anti-CMV.

QF-CMV nije test za utvrđivanje infekcije CMV-om i ne bi se trebao upotrebljavati za isključivanje infekcije CMV-om.

Sažetak i objašnjenje

CMV je herpesvirus koji pogađa 50 – 85 % odrasle populacije. Riječ je o čestoj komplikaciji imunosupresijske terapije, osobito nakon transplantacije, koja može značajno utjecati na morbiditet i mortalitet primatelja transplantacije. Trenutačne imunosupresijske terapije koje se upotrebljavaju za sprječavanje odbacivanja transplantiranog organa imaju štetne učinke na T limfocite i stanicama posredovane imunološke (cell-mediated immune, CMI) reakcije koje rezultiraju povećanom osjetljivošću na posttransplantacijske virusne infekcije. Važnost funkcije T stanica u supresiji replikacije CMV-a također ističe činjenica da citotoksični T limfociti CD8⁺ (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) specifični za CMV mogu zaštititi od patogeneze povezane s virusima. Broj CTL-ova CD8⁺ specifičnih za CMV u imunosupresivnih pacijenata i proizvodnja IFN- γ mogu pomoći u predviđanju rizika od razvoja CMV bolesti. Proizvodnja IFN- γ može biti funkcionalni surogat za identifikaciju CTL-ova specifičnih za CMV.

QF-CMV je test za CMI reakcije na peptidne antigene koji simuliraju proteine CMV-a. CMV peptidi namijenjeni su za T stanice CD8⁺, uključujući haplotipove A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 i Cw6 (A30, B13) HLA klase I koji obuhvaćaju >98 % ljudske populacije. Osobe zaražene CMV-om obično u krvi imaju limfocite CD8⁺ koji prepoznaju te antigene. U tom postupku prepoznavanja stvara se i otpušta citokin, IFN- γ . Glavna je svrha testa dokazivanje i nakon toga utvrđivanje količine IFN- γ .

Načelo postupka

Test QF-CMV provodi se u dvije faze. Najprije se puna krv prikuplja u svaku QF-CMV epruvetu za uzimanje krvi, što uključuje epruvetu Nulta kontrola, epruvetu CMV Antigen i Mitogen epruvetu.

Mitogen epruveta upotrebljava se u QF-CMV testu kao pozitivna kontrola. To može biti od posebne važnosti ako je imunološki status bolesnika nejasan. Mitogen epruveta može poslužiti i kao kontrola pravilnog postupanja s uzorkom krvi i pravilne inkubacije.

Epruvete treba inkubirati što prije, a svakako u roku od 16 sati nakon uzimanja krvi, na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije u trajanju od 16 do 24 sata epruvete se centrifugiraju, a potom se oduzima plazma i utvrđuje se količina IFN- γ u (IU/ml) metodom QF-CMV ELISA.

Količina IFN- γ u uzorcima plazme iz CMV Antigen i Mitogen epruveta često može biti iznad gornjih granica većine čitača ELISA, čak i kada su osobe umjereno imunosupresivne. Za kvalitativne rezultate upotrijebite vrijednosti izračunate za nultu kontrolnu plazmu. Za kvantitativne rezultate, gdje su potrebne stvarne vrijednosti IU/ml, uzorci plazme trebaju se razrijediti u omjeru 1/10 u zelenom diluensu i testirati testom ELISA zajedno s nultom kontrolnom plazmom.

Napomena: Za uzorke koji se nalaze unutar raspona QF-CMV ELISA (tj. do 10 IU/ml) treba upotrijebiti rezultate dobivene s pomoću uzorka nulte kontrolne plazme. Za takve koncentracije IFN- γ vrijednosti dobivene razrjeđivanjem uzoraka plazme u omjeru 1/10 mogu biti netočne.

Test se smatra reaktivnim za IFN- γ reakciju kada epruveta CMV Antigen očitava vrijednosti koje se nalaze znatno iznad nulte vrijednosti IFN- γ izražene u IU/ml. Mitogenom stimuliran uzorak plazme služi kao pozitivna kontrola IFN- γ svakog testiranog uzorka. Neznatna reakcija na mitogen ukazuje na nejasan rezultat kada uzorak krvi također ima negativnu reakciju na CMV antigene. Takav rezultat može nastati u slučaju nedovoljnog broja limfocita, smanjene aktivnosti limfocita zbog nepravilnog postupanja s uzorkom, nepravilnog punjenja/miješanja Mitogen epruvete ili ako limfociti bolesnika nisu u stanju stvarati IFN- γ , kao što je slučaj s pacijentima koji su nedavno bili podvrgnuti transplantaciji. Nulti uzorak prilagođava se pozadini ili nespecifičnom IFN- γ u uzorcima krvi. Razina IFN- γ nulte epruvete oduzima se od razine IFN- γ za CMV Antigen i Mitogen epruvete (za pregled načina interpretacije QF-CMV rezultata pogledajte „Tumačenje rezultata” na stranici 24 ovih uputa za upotrebu).

Vrijeme potrebno za testiranje

U nastavku se navodi procijenjeno vrijeme provođenja QF-CMV testa; naznačeno je i vrijeme testiranja većeg broja uzoraka metodom skupne obrade:

Inkubacija epruveta s uzorcima krvi pri 37 °C:	16 – 24 sata
ELISA:	Pribl. 3 sata za jednu ELISA ploču
	Manje od 1 sat rada
	Dodajte 10 – 15 minuta za svaku dodatnu ploču

Uključeni materijali

Sadržaj kompleta

Blood Collection Tubes (Single Patient Pack)	
Kataloški br.	0192-0301
Broj preparata	1
QuantIFERON Nil Control (Nulta kontrola QuantIFERON) (sivi čep)	1 epruveta
QuantIFERON CMV Antigen (CMV antigen QuantIFERON) (plavi čep)	1 epruveta
QuantIFERON Mitogen Control (Mitogen kontrola QuantIFERON) (ljubičasti čep)	1 epruveta
QF-CMV Blood Collection Tubes Package Insert (Uputa za upotrebu QF-CMV epruveta za uzimanje krvi)	1

QuantIFERON-CMV ELISA	Komplet ELISA s 2 ploče
Kataloški br.	0350-0201
Mikrotitar pločice (12 x 8 udubljenja) obložene anti-humanim mišjim IFN- γ monoklonalnim protutijelom/	2 kompleta mikrotitar pločica s 12 x 8 udubljenja
Human IFN- γ Standard, lyophilized (Humani IFN- γ standard, liofiliziran) (sadržava rekombinantni humani IFN- γ , goveđi kazein, 0,01 % w/v timerosala)	1 x bočica (8 IU/ml kada se rekonstituira)
Green Diluent (Zeleni diluents) (sadržava goveđi kazein, obični serum miša, 0,01 % w/v timerosala)	1 x 30 ml
Conjugate 100x Concentrate, lyophilized (100x koncentrirani konjugat, liofiliziran) (anti-humanu mišji IFN- γ HRP, sadržava 0,01 % w/v timerosala)	1 x 0,3 ml
Wash Buffer 20x Concentrate (20x koncentrirani pufer za ispiranje) (pH 7,2, sadržava 0,05 % v/v ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Otopina enzimskog supstrata) (sadržava H ₂ O ₂ , 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimaska otopina za zaustavljanje reakcije) (sadržava 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert (Uputa za upotrebu proizvoda QF-CMV ELISA)	1

* Sadržava sumpornu kiselinu. Za mjere opreza pogledajte stranicu 9.

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Kad radite s kemikalijama uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (safety data sheet, SDS) dostupnima kod dobavljača proizvoda.

- Inkubator za 37 °C; CO₂ nije potreban
- Kalibrirane pipete s varijabilnim volumenom za doziranje od 10 µl do 1000 µl, s jednokratnim vrhovima
- Kalibrirane višekanalne pipete za doziranje 50 µl i 100 µl s jednokratnim vrhovima
- Tresilica za mikrotitar ploče
- Deionizirana ili destilirana voda, 2 litre
- Uređaj za ispiranje mikrotitar ploča (po mogućnosti automatiziran)
- Čitač mikrotitar ploča s filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm

Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku namjenu

Kad radite s kemikalijama uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, jednokratne rukavice i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (SDS). Oni su dostupni na mreži u praktičnom i kompaktnom PDF formatu na web-adresi **www.qiagen.com/safety**. Ondje možete pronaći, pregledati i ispisati sigurnosno-tehnički list za svaki komplet QIAGEN® i komponentu kompleta.

OPREZ



S ljudskom krvlju postupajte kao s potencijalno infektivnom. Pridržavajte se odgovarajućih smjernica o postupanju s krvlju.

Sljedeće izjave o opasnosti i mjerama opreza odnose se na komponente kompleta QuantiFERON-CMV ELISA.

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Sadrži: sumporna kiselina. Pozor! Može nagrizati metale. Nadražuje kožu. Uzrokuje jako nadraživanje oka. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Pozor! Uzrokuje blagu iritaciju kože. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

QuantiFERON Green Diluent



Sadrži: trinatrijev 5-hidroksi-1-(4-sulfofenil)-4-(4-sulfofenilazo)pirazol-3-karboksilat. Sadrži: tartrazin. Pozor! Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Nositi zaštitne rukavice/zaštitno odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice.

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

Sadrži: ProClin 300. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima. Izbjegavati ispuštanje u okoliš.

Sigurnosne informacije

Dodatne informacije

- Nepridržavanje uputa za QF-CMV može dovesti do netočnih rezultata. Prije upotrebe pažljivo pročitajte upute.
- Nemojte upotrebljavati komplet ako bilo koja bočica reagensa pokazuje znakove oštećenja ili curenja prije upotrebe.
- **Važno:** Pregledajte bočice prije upotrebe. Nemojte upotrebljavati bočice konjugata ili IFN- γ standarda koje pokazuju znakove oštećenja ili kojima je oštećena gumena brtva. Nemojte rukovati razbijenim bočicama. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza i odložite bočice na siguran način.

Preporuka: Upotrijebite instrument za otvaranje bočica da biste otvorili bočice konjugata ili IFN- γ standarda kako biste minimizirali opasnost od ozljede metalnim krimp čepom.

- Nemojte miješati ili upotrebljavati mikrotitar trake, humani IFN- γ standard, zeleni diluens ili 100x koncentrirani konjugat iz različitih serija kompleta QF-CMV. Ostali reagensi (20x koncentrirani pufer za ispiranje, otopina enzimskog supstrata i enzimska otopina za zaustavljanje reakcije) iz drugih kompleta mogu se mijenjati, pod uvjetom da ne prekoračuju datum isteka valjanosti i da se podaci o seriji zabilježe.
- Odložite neupotrijebljene reagense i biološke uzorke u skladu s lokalnim i državnim propisima.
- Nemojte upotrebljavati epruvete za uzimanje krvi QF-CMV ili komplete QF-CMV ELISA nakon datuma isteka valjanosti.
- Provjerite je li laboratorijska oprema kao što su uređaji za ispiranje i čitači ploča kalibrirana/testirana za upotrebu.

Pohrana i rukovanje uzorcima

Epruvete za uzimanje krvi

- Epruvete za uzimanje krvi QF-CMV čuvajte na temperaturi od 4 do 25 °C.
- U vrijeme punjenja krvlju epruvete za uzimanje krvi QF-CMV moraju biti na temperaturi od 17 do 25 °C.
- Vijek trajanja epruveta za uzimanje krvi QF-CMV iznosi najviše 15 mjeseci od datuma proizvodnje ako se pohranjuju na temperaturama od 4 do 25 °C.

Reagensi kompleta ELISA

- Komplet čuvajte na temperaturi od 2 do 8 °C.
- Otopinu enzimskog supstrata uvijek zaštitite od izravne sunčeve svjetlosti.

Rekonstituirani i neupotrijebljeni reagensi

Za upute o rekonstituiranju reagensa pogledajte „Faza 2: QuantiFERON-CMV ELISA za humani IFN- γ ” (koraci 3 i 5 na stranicama 17 i 19).

- Rekonstituirani humani IFN- γ standard može se čuvati do 3 mjeseca pohranjen na temperaturi od 2 do 8 °C.
Zabilježite datum rekonstitucije humanog IFN- γ standarda.
- Nakon rekonstitucije neupotrijebljeni 100x koncentrirani konjugat mora se i dalje čuvati na temperaturi od 2 do 8 °C i potrošiti u roku od 3 mjeseca.
Zabilježite datum rekonstitucije konjugata.
- Konjugat pripremljen za uporabu mora se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme.
- Pufer za ispiranje koji je pripremljen za uporabu može se čuvati na sobnoj temperaturi (22 °C \pm 5 °C) do 2 tjedna.

Uzimanje uzoraka i rukovanje

QF-CMV upotrebljava sljedeće epruvete za uzimanje krvi:

- Nulta kontrola (sivi čep)
- CMV antigen (plavi čep)
- Mitogen kontrola (ljubičasti čep)

Antigeni su osušeni na unutarnjoj stijenci epruveta za uzimanje krvi, stoga se uzorci u epruveti moraju dobro promiješati s krvlju. Epruvete zatim treba što prije, ali najkasnije u roku od 16 sati nakon uzimanja krvi, staviti u inkubator na temperaturu od 37 °C.

Optimalni rezultati postižu se pridržavanjem sljedećih uputa:

1. Uzmite od svakog pacijenta 1 ml venske krvi izravno u svaku QF-CMV epruvetu za uzimanje krvi. Taj bi postupak trebao provoditi tehničar osposobljen za vađenje krvi. QF-CMV epruvete za uzimanje krvi mogu se upotrebljavati na nadmorskoj visini do 810 metara.

Ako se QF-CMV epruvete za uzimanje krvi upotrebljavaju na nadmorskim visinama većima od 810 metara ili ako je izvađena mala količina krvi, za uzimanje krvi može se upotrijebiti i štrcaljka. U tom slučaju u sve tri epruvete treba odmah staviti po 1 ml krvi. Iz sigurnosnih razloga, to je najbolje izvesti tako da uklonite iglu sa štrcaljke, pridržavajući se odgovarajućih sigurnosnih mjera, uklonite čepove s triju QF-CMV epruveta za uzimanje krvi i dodate 1 ml krvi u svaku (do crne oznake s bočne strane naljepnice na epruveti). Na siguran način uklonite čepove s epruveta i promiješajte prema uputama u nastavku. Budući da se epruvete od 1 ml relativno polako pune krvlju, ostavite epruvetu, nakon što se čini da je puna, još 2 – 3 sekunde na igli. Tako ćete osigurati uzimanje potrebne količine.

Crna oznaka s bočne strane epruveta označava razinu punjenja od 1 ml. QF-CMV epruvete za uzimanje krvi validirane su za razine punjenja od 0,8 do 1,2 ml. Ako razina krvi u bilo kojoj epruveti nije blizu crte, preporučuje se uzimanje drugog uzorka.

Ako za uzimanje krvi upotrebljavate leptirastu iglu, najprije treba upotrijebiti praznu epruvetu kako bi se osiguralo da je napunjena krvlju prije upotrebe QF-CMV epruveta za uzimanje krvi.

Ili krv možete izvaditi u jednu zajedničku epruvetu za uzimanje krvi koja sadržava litij-heparin kao antikoagulans, a zatim je prenijeti u QF-CMV epruvete za uzimanje krvi. Upotrebljavajte samo litij-heparin kao krvni antikoagulans jer ostali antikoagulansi mogu utjecati na rezultate testa. Napunite epruvetu za uzimanje krvi (s najmanje 5 ml krvi) i blago promiješajte nekoliko je puta preokrećući da bi se heparin otopio. Taj bi postupak trebao provoditi tehničar osposobljen za vađenje krvi. Prije stavljanja epruveta za uzimanje krvi QF-CMV u inkubator, što se mora učiniti u roku od 16 sati od vađenja krvi, krv treba držati na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2. Odmah nakon punjenja epruveta za uzimanje krvi QF-CMV, protresite ih 10 puta, onoliko snažno koliko je potrebno da bi se cijela unutarnja površina epruvete obložila krvlju, odnosno da bi se otopili antigeni na stijenkama epruvete.

Epruvete treba držati na temperaturama od 17 do 25 °C za vrijeme punjenja krvlju.

Prejako protresanje može poremetiti gel i dovesti do pogrešnih rezultata.

Ako je krv izvađena u epruvetu koja sadržava litij-heparin, uzorci krvi moraju se ravnomjerno izmiješati prije pretakanja u epruvete za uzimanje krvi QF-CMV. Pazite da se krv dobro izmiješa tako što ćete lagano okrenuti epruvetu neposredno prije pretakanja. Rasporedite 1 ml alikvota (jedan po QF-CMV epruveti za uzimanje krvi) u odgovarajuću epruvetu Nulta kontrola, CMV Antigen i Mitogen kontrola. To bi trebalo obaviti aseptično, uz pridržavanje odgovarajućih sigurnosnih mjera, uklanjanjem čepova s triju QF-CMV epruveta za uzimanje krvi i dodavanjem 1 ml krvi u svaku (do crne oznake s bočne strane naljepnice na epruveti). Nakon toga epruvete treba dobro začepiti i promiješati, kao što je ranije opisano.

3. Označite epruvete na odgovarajući način.

Pazite da se svaka epruveta (Nulta kontrola, CMV Antigen, Mitogen kontrola) može identificirati s pomoću svoje naljepnice ili na neki drugi način.

4. Nakon punjenja, protresanja i označivanja, epruvete se moraju što prije prenijeti u inkubator temperature $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, i to u roku od 16 sati od uzimanja uzoraka. Prije inkubacije epruvete držite na sobnoj temperaturi ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$). Uzorke krvi nemojte stavljati u hladnjak ili zamrzavati.

Postupak

Faza 1: Inkubacija krvi i prikupljanje plazme

1. Epruvete inkubirajte u **USPRAVNOM** položaju na temperaturi od $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ u trajanju od 16 do 24 sata. Za inkubator nisu potrebni CO_2 ni ovlaživanje.

Važno: Ako krv nije inkubirana odmah nakon prikupljanja, potrebno je ponovno promiješati epruvete tako da ih se preokrene 10 puta prije inkubacije.

Nakon inkubacije epruvete za uzimanje krvi mogu se držati na temperaturama od 4 °C do 27 °C najviše 3 dana prije izvođenja centrifugiranja.

2. Nakon inkubacije epruveta na 37 °C epruvete se centrifugiraju 15 minuta na 2000 do 3000 RCF (*g*) radi lakšeg prikupljanja plazme. Čep od gela odvojiti će stanice od plazme. Ako se to ne dogodi, epruvete treba ponovno centrifugirati.

Plazma se može prikupljati i bez centrifugiranja, ali potreban je dodatan oprez da bi se plazma uklonila bez poremećaja stanica.

3. Nakon centrifugiranja nemojte pipetirati prema gore ili prema dolje niti bilo kako miješati plazmu prije uzimanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

Važno: Uzorci plazme trebali bi se uzimati samo pipetom.

Uzorci plazme mogu se prenijeti izravno iz centrifugiranih epruveta za uzimanje krvi u QF-CMV ELISA ploču, uključujući i situacije kada se upotrebljavaju automatske ELISA radne stanice.

Uzorci plazme mogu se pohranjivati u centrifugiranim epruvetama za uzimanje krvi QF-CMV do najviše 28 dana na temperaturama od 2 °C do 8 °C ili, ako se uzimaju na ispod -20 °C (po mogućnosti na manje od -70 °C), na dulje vrijeme.

Da biste dobili odgovarajuće testne uzorke, prikupite najmanje 150 μl plazme.

Faza 2: QuantiFERON-CMV ELISA za humani IFN- γ

Pogledajte „Sadržaj kompleta” na stranici 8 i „Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni” na stranici 9 za materijale potrebne za izvođenje postupka ELISA.

1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim 100x koncentriranog konjugata, moraju prije upotrebe postići sobnu temperaturu ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ostavite najmanje 60 minuta za postizanje toplinske ravnoteže.
2. Uklonite nepotrebne trake ELISA ploče s okvira, vratite ih u foliju i pohranite ih do upotrebe u hladnjaku.
Pripremite najmanje jednu traku za QF-CMV ELISA standarde i dovoljan broj traka za pacijente koji se testiraju. Nakon upotrebe sačuvajte okvir i poklopac za uporabu s preostalim trakama.
3. Rekonstituirajte humani IFN- γ standard količinom deionizirane ili destilirane vode koja je naznačena na etiketi bočice. Pažljivo promiješajte kako biste minimizirali stvaranje pjene i uvjerite se da je sadržaj potpuno rastopljen. Rekonstitucijom IFN- γ standarda na točan volumen dobivamo otopinu koncentracije 8,0 IU/ml.

Napomena: Volumen humanog IFN- γ standarda (standard iz kompleta) potreban za rekonstituciju nije isti za svaku seriju.

Upotrijebite rekonstituirani standard za pripremljanje serije otopina četiriju koncentracija IFN- γ u zelenom diluentu (Green Diluent, GD) (Slika 1, sljedeća stranica).

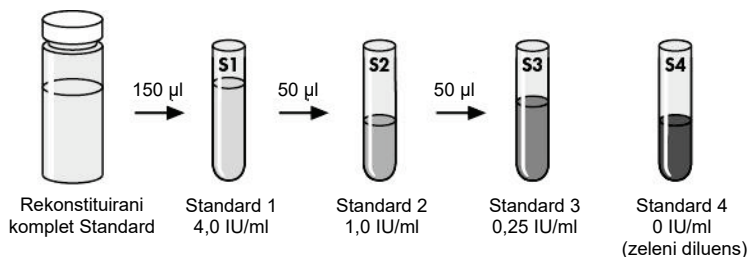
S1 (Standard 1) sadržava 4,0 IU/ml, S2 (Standard 2) sadržava 1,0 IU/ml,

S3 (Standard 3) sadržava 0,25 IU/ml i S4 (Standard 4) sadržava 0 IU/ml (samo GD).

Standarde treba testirati najmanje u duplikatu. Pripremite svježe otopine standarda iz kompleta za svaku postupak ELISA.

Primjer postupka za duplikate standarda

Primjer postupka za duplikate standarda	
A	Označite četiri epruvete: S1, S2, S3, S4
B	Dodajte 150 μ l GD-a u S1, S2, S3, S4
C	Dodajte 150 μ l standarda iz kompleta u S1 i dobro promiješajte
D	Prenesite 50 μ l iz S1 u S2 i dobro promiješajte
E	Prenesite 50 μ l iz S2 u S3 i dobro promiješajte
F	Samo GD služi kao nulti standard (S4)



Slika 1. Pripremanje standardne krivulje serijskim razrjeđivanjem.

4. Rekonstituirajte liofilizirani 100x koncentrirani konjugat s 0,3 ml deionizirane ili destilirane vode. Pažljivo promiješajte kako biste minimizirali stvaranje pjene i uvjerite se da je konjugat potpuno otopljen.

Konjugat spreman za upotrebu priprema se tako da se potrebna količina rekonstituiranog 100x koncentriranog konjugata razrijedi zelenim diluensom (pogledajte Tablica 1, sljedeća stranica).

Promiješajte temeljito, ali nježno kako ne bi došlo do stvaranja pjene.

Neupotrijebljeni 100x koncentrirani konjugat odmah nakon upotrebe vratite na temperaturu od 2 do 8 °C.

Upotrebljavajte samo zeleni diluens.

Tablica 1. Pripremanje konjugata spremnog za upotrebu

Broj traka	Količina 100x koncentriranog konjugata	Količina zelenog diluensa
2	10 μ l	1,0 ml
3	15 μ l	1,5 ml
4	20 μ l	2,0 ml
5	25 μ l	2,5 ml
6	30 μ l	3,0 ml
7	35 μ l	3,5 ml
8	40 μ l	4,0 ml
9	45 μ l	4,5 ml
10	50 μ l	5,0 ml
11	55 μ l	5,5 ml
12	60 μ l	6,0 ml

5. U slučaju uzoraka plazme koji su odvojeni iz epruveta za uzimanje krvi i potom zamrznuti ili pohranjeni na dulje od 24 sata prije testiranja, dobro promiješajte prije dodavanja u ELISA udubljenje.

Važno: Ako se uzorci plazme planiraju dodati izravno iz centrifugiranih QF-CMV epruveta za uzimanje krvi, potrebno je izbjegavati bilo kakvo miješanje plazme. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

6. Ako su potrebni kvantitativni rezultati, razrijedite CMV i Mitogen plazme u omjeru 1/10 u zelenom diluensu (10 μ l plazme + 90 μ l GD-a). Nultu plazmu ne treba razrijeđivati.

Preporučuje se paralelno ispitivanje sljedećih uzoraka:

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

Međutim, softver za analizu QuantiFERON-CMV podržava i sljedeće opcije pacijentovih uzoraka:

Nulta, CMV Antigen, Mitogen

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

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

Nulta, CMV Antigen (1/10), Mitogen

7. Višekanalnom pipetom dodajte 50 µl svježije pripremljenog konjugata spremnog za upotrebu u odgovarajuća ELISA udubljenja.
8. Dodajte 50 µl testnih uzoraka plazme u odgovarajuća udubljenja. Na kraju dodajte po 50 µl Standarda 1 do 4 u odgovarajuća udubljenja. Standarde treba testirati najmanje u duplikatu.
9. Prekrijte ELISA ploču i dobro izmiješajte uzorke/standarde konjugata i plazme u tresilici za mikrotitar ploče u trajanju od 1 minute na 500 do 1000 o/min. Izbjegavajte prskanje.
10. ELISA ploču prekrijte poklopcem i inkubirajte na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) u trajanju od 120 ± 5 minuta.

Za vrijeme inkubacije ploče se ne bi trebale izlagati izravnoj sunčevoj svjetlosti. Odstupanje od navedenog temperaturnog raspona može rezultirati pogrešnim rezultatima.

11. Za vrijeme inkubacije pripremite pufer za ispiranje spreman za upotrebu. Razrijedite jedan dio 20x koncentriranog pufera za ispiranje s 19 dijelova deionizirane ili destilirane vode i dobro promiješajte. U kompletu se nalazi dovoljno 20x koncentriranog pufera za ispiranje da bi se dobile 2 litre gotovog pufera za ispiranje.
12. Nakon završetka inkubacije ELISA ploče isperite udubljenja s 400 µl pufera za ispiranje spremnog za upotrebu u najmanje šest ciklusa. Preporučujemo upotrebu automatskog uređaja za ispiranje mikrotitar ploča.

Važno: Pažljivo ispiranje veoma je važno za učinak testa. Pazite da pri svakom ciklusu ispiranja sva udubljenja budu do vrha potpuno napunjena puferom za ispiranje. Preporučujemo da između svakog ciklusa ispiranja ostavite najmanje 5 sekundi za namakanje.

U sabirni spremnik za otpadnu tekućinu treba dodati standardno dezinfekcijsko sredstvo koje se upotrebljava u laboratorijima. Pridržavajte se propisanih uputa za dekontaminaciju potencijalno infektivnih materijala.

-
13. Lupkanjem istresite ploče okrenute prema dolje na upijajućem ručniku koji ne ispušta dlačice kako biste uklonili ostatak pufera za ispiranje. Dodajte 100 µl otopine enzimskog supstrata u svako udubljenje, prekrijte ploču poklopcem i dobro promiješajte s pomoću tresilice za mikrotitar ploče 1 minutu na 500 do 1000 o/min.
 14. Svaku ploču prekrijte poklopcem i inkubirajte na sobnoj temperaturi ($22\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) u trajanju od 30 minuta.

Za vrijeme inkubacije ploče se ne bi trebale izlagati izravnoj sunčevoj svjetlosti.
 15. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta dodajte 50 µl enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje istim redoslijedom kojim ste dodavali supstrat i dobro promiješajte na 500 do 1000 o/min s pomoću tresilice za mikrotitar ploče.
 16. Izmjerite optičku gustoću (optical density, OD) svakog udubljenja u roku od 5 minuta nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije s pomoću čitača za mikrotitar ploče opremljenog filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm. Izračunavanje rezultata izvodi se s pomoću vrijednosti OD-a.

Izračunavanje i tumačenje rezultata

Softver za analizu QuantiFERON-CMV, koji služi za analizu neobrađenih podataka i izračun rezultata, možete nabaviti od tvrtke QIAGEN na adresi **www.QuantiFERON.com**. Pobrinite se da upotrebljavate najnoviju verziju softvera za analizu QF-CMV.

Softver provodi kontrolu kvalitete testa, formira standardnu krivulju i daje rezultat za svakog testiranog pacijenta, kao što je objašnjeno u odjeljku „Tumačenje rezultata” na stranici 24. Softver izvješćuje o najnižoj otopini koja daje rezultat u rasponu QF-CMV ELISA testa uzimajući u obzir faktor razrjeđivanja.

Kao alternativa QF-CMV softveru za analizu, rezultati se mogu utvrditi i na osnovu sljedeće metode.

Izrada standardne krivulje (ako se ne upotrebljava softver za analizu QF-CMV)

Utvrdite srednje vrijednosti OD-a replika standarda iz kompleta na svakoj ploči.

Izradite standardnu krivulju $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ grafičkim prikazom $\log_{(e)}$ srednje vrijednosti OD-a (y os) u usporedbi s $\log_{(e)}$ IFN- γ koncentracije standarda u IU/ml (x os), izostavivši nulti standard iz izračuna. Izračunajte liniju najboljeg oblika standardne krivulje regresijskom analizom.

Upotrebljavajte standardnu krivulju za utvrđivanje IFN- γ koncentracije (IU/ml) za svaki testirani uzorak plazme s pomoću vrijednosti OD-a svakog uzorka.

Za te izračune mogu se upotrijebiti softverski paketi koji su dostupni uz čitače mikrotitar ploča, kao i standardne proračunske tablice ili programi za statistiku (kao npr. Microsoft® Excel®). Preporučujemo primjenu tih softverskih paketa za izračunavanje regresijske analize, koeficijenta varijacije standarda (coefficient of variation, %CV), kao i koeficijenta korelacije (r) za standardnu krivulju.

Rezultat iz izvješća treba uzeti od najniže otopine koja daje rezultat u rasponu QF-CMV ELISA testa; pobrinite se da se faktor razrjeđivanja uzme u obzir ako je to primjenjivo.

Kontrola kvalitete testa

Točnost rezultata testa ovisi o formiranju točne standardne krivulje. Stoga se rezultati izvedeni iz standarda moraju preispitati prije tumačenja rezultata uzorka testa.

Test ELISA je valjan ako su ispunjeni sljedeći kriteriji:

- Srednja vrijednost OD-a Standarda 1 mora biti $\geq 0,600$.
- %CV repliciranih vrijednosti OD-a Standarda 1 i Standarda 2 mora biti $< 15 \%$.
- Replicirane vrijednosti OD-a Standarda 3 i Standarda 4 ne smiju odstupati od srednjih vrijednosti za više od 0,040 OD jedinica.
- Koeficijent korelacije (r) dobiven iz srednjih vrijednosti apsorpcije standarda mora biti $\geq 0,98$.

Softver za analizu QF-CMV izračunava i izvješćuje o tim parametrima za kontrolu kvalitete. Ako ovi kriteriji nisu ispunjeni, test nije valjan i mora se ponoviti.

Srednja vrijednost OD-a nultog standarda (zeleni diluens) trebala bi biti $\leq 0,150$. Ako je srednja vrijednost OD-a $> 0,150$, preporučuje se kontrola postupka ispiranja ploča.

Tumačenje rezultata

Rezultati testa QuantiFERON-CMV tumače se prema kriterijima navedenima u tablici Tablica 2.

Tablica 2. Tumačenje rezultata testa QuantiFERON-CMV

Nulta (IU/ml)	CMV minus Nulta (IU/ml)	Mitogen minus Nulta (IU/ml)*	QF-CMV rezultat	Izvešće/tumačenje
≤ 8,0	≥ 0,20 i ≥ 25 % Nulte	Svejedno koliko	Reaktivno [†]	Otkriven imunitet na anti-CMV
	< 0,20 ILI ≥ 0,20 i <25 % Nulte	≥ 0,5	Nereaktivno	NIJE otkriven imunitet na anti-CMV
> 8,0 [§]	Svejedno koliko	< 0,5	Neodređeno [‡]	Rezultati su neodređeni za reakciju na CMV
		Svejedno koliko	Neodređeno [‡]	Rezultati su neodređeni za reakciju na CMV

* Reakcije na Mitogen pozitivnu kontrolu (i povremeno na CMV antigene) često su izvan raspona čitača mikrotirar ploča. To ne utječe na rezultate testa.

† Ako se ne sumnja na infekciju citomegalovirusom, prvobitno reaktivni rezultati mogu se potvrditi ponovnim testiranjem izvornih uzoraka plazme u duplikatu s pomoću testa QF-CMV ELISA. Ako je ponovno testiranje jedne ili dviju replika pozitivno, osoba bi se trebala smatrati reaktivnom na test.

‡ Pogledajte „Vodič za rješavanje problema” (stranica 39) za moguće uzroke.

U kliničkim se ispitivanjima (1) neodređen rezultat među pacijentima koji su podvrgnuti transplantaciji čvrstog organa, pri čemu je davatelj reaktivan na CMV, ali je Mitogen kontrola iznosila manje od 0,5 IU/ml, pokazao kao klinički relevantan. Ti pacijenti imaju najveći rizik od razvoja CMV bolesti.

§ U kliničkim je ispitivanjima manje od 0,25 % pacijenata imalo razine IFN- γ u vrijednosti od > 8,0 IU/ml za nultu vrijednost.

Napomena: Izmjerena razina IFN- γ trebala bi se upotrebljavati u kombinaciji s kliničkom prezentacijom, povijesti bolesti i drugim dijagnostičkim procjenama pri utvrđivanju imunološke reakcije na CMV antigene. QF-CMV nije test za utvrđivanje infekcije CMV-om i ne bi se trebao upotrebljavati za isključivanje infekcije CMV-om.

Ograničenja

Rezultate testa QuantiFERON-CMV treba promatrati u kombinaciji s epidemiološkom anamnezom svakog pacijenta, njegovim trenutačnim zdravstvenim stanjem i drugim dijagnostičkim pretragama.

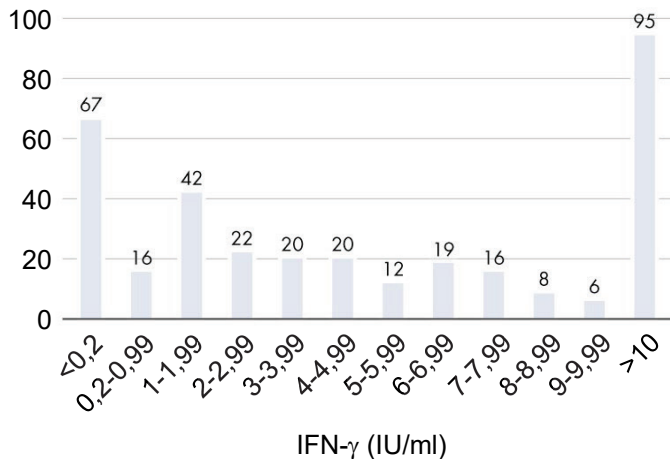
Do nepouzdanih ili neodređenih rezultata može doći iz sljedećih razloga:

- Odstupanje od postupka opisanog u priloženim Uputama za upotrebu proizvoda QuantiFERON-CMV ELISA
- Previsoka razina IFN- γ u epruveti kontrola
- Prekoračenje roka od 16 sati između uzimanja uzorka krvi i inkubacije na temperaturi od 37 °C.

Očekivane vrijednosti

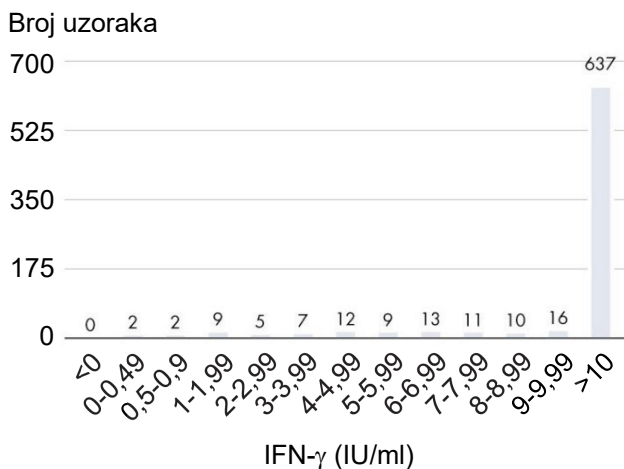
Očekivane vrijednosti IFN- γ za QuantiFERON-CMV dobivene su testiranjem 591 uzorka dobivena od zdravih pacijenata. Za 343 uzorka utvrđeno je da su seropozitivni, a za 248 uzoraka utvrđeno je da su seronegativni na CMV IgG. CMV serološki status bio je nepoznat u vrijeme provođenja testa QF-CMV. Od 248 uzoraka od CMV seronegativnih pacijenata 100% (248/248) testiranih uzoraka bilo je nereaktivno prema QF-CMV ELISA testu i proizvelo je IFN- γ reakcije od < 0,2 IU/ml za CMV Antigen epruvetu (minus Nulta). Prikazana je distribucija IFN- γ reakcija za CMV Antigen epruvetu (minus Nulta) kod 343 CMV seropozitivna pacijenta (Slika 2).

Broj uzoraka



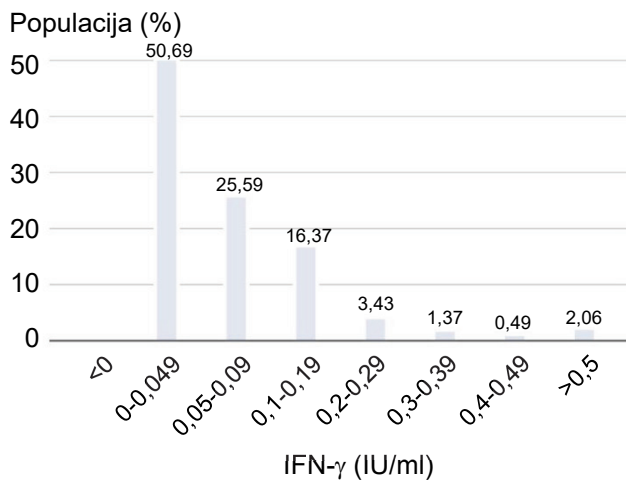
Slika 2. Distribucija QF-CMV IFN- γ reakcija (minus Nulta) u seropozitivnih zdravih pacijenata (n = 343).

Distribucija IFN- γ reakcija na Mitogen (minus Nulta) utvrđena je na 733 uzorka zdravih odraslih pacijenata s pomoću QF-CMV ELISA testa, bez obzira na CMV IgG serologiju (Slika 3). Mitogen rezultat (minus Nulta) od manje od 0,5 IU/ml označava neispravnost testa ili da se osoba nalazi u imunokompromitiranom stanju. U zdrave populacije, samo 2/733 rezultata pripalo je u tu kategoriju.



Slika 3. Distribucija Mitogen-IFN- γ reakcija (minus Nulta) u zdravih pacijenata (n = 733).

Distribucija IFN- γ reakcija na Nulte epruvete utvrđena je na 1020 uzoraka plazme zdravih pacijenata s pomoću QF-CMV ELISA testa, bez obzira na CMV IgG serologiju (Slika 4).



Slika 4. Distribucija Nultih IFN- γ reakcija u zdravih pacijenata (n = 1020) izražena kao postotak populacije.

Radne značajke

Kliničke performanse

Granična vrijednost testa za utvrđivanje prethodne izloženosti CMV-u metodom QF-CMV utvrđena je na temelju analize rezultata dobivenih od skupine zdravih pacijenata (n = 223), pri čemu su QF-CMV rezultati uspoređeni s CMV IgG serološkim rezultatima. ROC analizom utvrđeno je da je granična vrijednost testa od 0,04 IU/ml (nakon oduzimanja nulte) dala optimalne pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti za QF-CMV (područje ispod krivulje = 0,9679 [95 % CI: 0,9442 do 0,9915, p < 0,0001]) te predstavlja graničnu vrijednost pri kojoj je ovaj test najučinkovitiji u upotrebi za zdravu populaciju.

Test QF-CMV uspoređen je sa serološkim testom SeraQuest™ CMV IgG (Quest International). QF-CMV test pokazao je 95 %-tno (294/310 osoba) slaganje s CMV IgG serološkim testom u zdravih pacijenata, pri čemu nijedan od 149 seronegativnih davatelja nije pokazao reakciju s QF-CMV testom. Ukupno 145 od 161 seropozitivnog davatelja pokazalo je QF-CMV reakciju. Cjelokupno pozitivno slaganje iznosilo je 90 % s vrijednošću negativnog slaganja od 100 %. Razina slaganja u zdravih pacijenata između QF-CMV reakcija i CMV IgG serološkog statusa prikazana je u Tablica 3.

Tablica 3. Slaganje između QuantiFERON-CMV i CMV IgG serološkog testa u zdravih pacijenata

	CMV serologija		Ukupno
	Pozitivno	Negativno	
QuantiFERON-CMV	Reaktivno	145	145 (46,8 %)
	Nereaktivno	16	165 (53,2 %)
	Ukupno	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)

Granična vrijednost testa

Preporučena granična vrijednost kliničkog testiranja za ovaj test iznosi 0,2 IU/ml u CMV Antigen epruveti (minus Nulta), premda se za različite kliničke postavke mogu utvrditi različite granične vrijednosti.

Klinička ispitivanja

Budući da nema utvrđenog standarda za potvrđivanje ili isključivanje dijagnoze citomegalovirusne infekcije, procjena osjetljivosti i specifičnosti za QF-CMV ne može se praktično ocijeniti. Približna vrijednost specifičnosti i osjetljivosti za QF-CMV utvrđena je procjenom razine slaganja između QF-CMV reakcija i CMV IgG serološkog statusa zdravih pacijenata.

Specifičnost za QF-CMV približno je utvrđena procjenom broja lažno pozitivnih rezultata (QF-CMV reakcija) u uzorcima zdravih davatelja koji nisu bili ranije izloženi CMV-u (CMV IgG seronegativne osobe). Osjetljivost je približno utvrđena procjenom QF-CMV reaktivnosti u uzorcima zdravih davatelja koji su ranije bili izloženi CMV-u (CMV IgG seropozitivne osobe). QF-CMV upotrebljava velik broj epitopa specifičnih za CMV od različitih CMV proteina i tako omogućuje široku pokrivenost populacije s različitim haplotipovima HLA klase I (približno 98 % populacije). Budući da su haplotipovi HLA pacijenata testiranih na CMV serologiju bili nepoznati, očekivalo se da mali postotak seropozitivnih osoba neće reagirati na QF-CMV epruvete za uzimanje krvi.

Specifičnost

U ispitivanju provedenom na 591 uzorku dobivenom od zdravih pacijenata nisu otkriveni lažno pozitivni QF-CMV rezultati u osoba za koje je utvrđeno da su seronegativne za CMV IgG uz 248/248 uzoraka za koje je utvrđeno da nisu reaktivni prema QF-CMV ELISA testu i da su negativni prema CMV IgG serološkom testu. Stoga su rezultati dobiveni QF-CMV testom i CMV IgG serološkim testom pokazali podudarnost od 100 %.

U svim drugim procjenama specifičnosti provedenima na primateljima čvrstih organa (1 – 8), primateljima hematopoetskih matičnih stanica (9, 10) i pacijentima zaraženima virusom HIV-a (11) podudarnost između QF-CMV-a i CMV IgG serologije također je iznosila 100 %.

Osjetljivost

U ispitivanju provedenom na 343 uzorka dobivena od zdravih pacijenata koji su CMV IgG seropozitivni, razina slaganja između QF-CMV reakcija i CMV IgG seroloških rezultata iznosila je 80,5 % uz 276/343 uzorka za koje je testiranjem utvrđena QF-CMV reaktivnost i koji su bili pozitivni na CMV IgG serološkom testu. Zamijećeno je odstupanje možda uzrokovano lažno pozitivnom CMV serologijom ili nedostatkom reaktivnih HLA tipova među testiranim osobama.

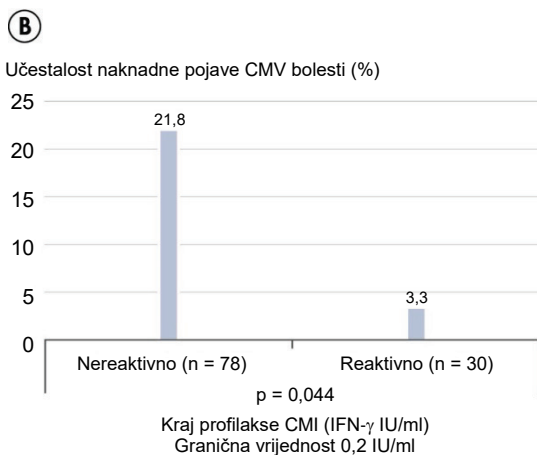
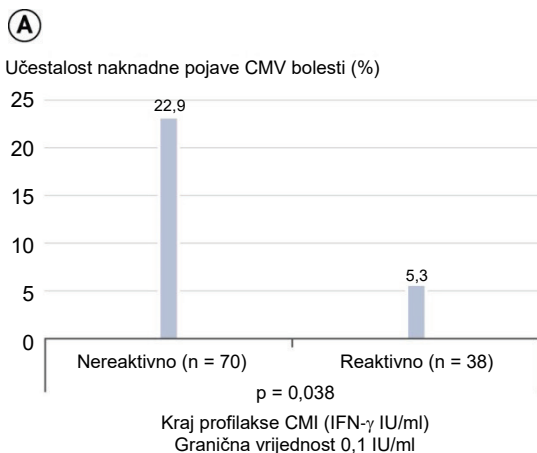
Razine slaganja u procjenama osjetljivosti provedenima na primateljima čvrstih organa (1–8), primateljima hematopoetskih matičnih stanica (9, 10) i pacijentima zaraženima virusom HIV a (11) bile su niže, što je možda uzrokovano lažno pozitivnom CMV serologijom, nedostatkom reaktivnih HLA tipova među testiranim osobama ili nedostatkom reaktivnih T stanica u tih pacijenata koji je uzrokovan imunosupresijom.

Ispitivanja koja upućuju na kliničku korist

I CMV IgG serologija i QF-CMV opisuju svoju namjenu kao omogućivanje otkrivanja imunosti na CMV. U slučaju transplantacije, CMV serologija upotrebljava se u velikoj mjeri prije transplantacije da bi se utvrdio rizik od CMV komplikacija nakon transplantacije, ali ima ograničenu vrijednost nakon transplantacije. Alternativno, QF-CMV može se upotrebljavati za primatelje transplantacije da bi se procijenila razina imunosti na CMV u pacijenata u kojih postoji opasnost od razvoja simptomatske CMV infekcije i/ili bolesti zbog imunosupresije (12–15).

Brojna objavljena klinička ispitivanja različitih skupina podvrgnutih transplantaciji potvrdila su korisnost testa QuantiFERON-CMV (1 – 11, 15, 16).

U velikom ispitivanju na 108 primatelja čvrstih organa (4) pacijenti s QF-CMV reaktivnim rezultatom pri dovršetku anti-CMV profilakse imali su značajno manji broj kasnijih pojava CMV bolesti (3,3% ili 1/30; uz primjenu granične vrijednosti od 0,2 IU/ml) u usporedbi s pacijentima koji su imali QF-CMV nereaktivan rezultat (21,8% ili 17/78, $p = 0,044$) (Slika 5).



Slika 5. Broj kasnijih pojava CMV bolesti u pacijenata s QuantiFERON-CMV reaktivnim rezultatom u odnosu na QuantiFERON-CMV nereaktivni rezultat na kraju profilakse. Podaci preuzeti iz Kumar et al. (4).

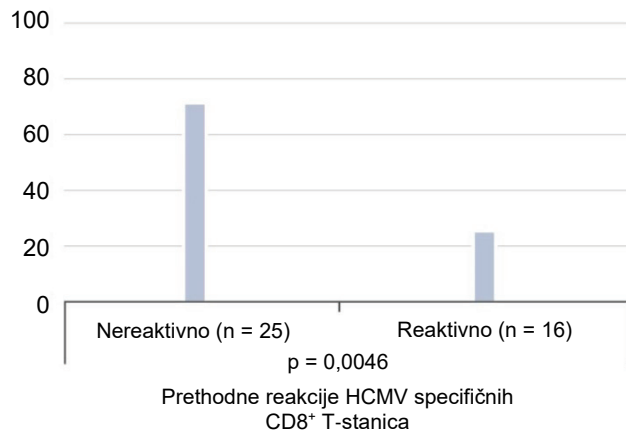
Osim toga, CMV seronegativni primatelji organa od CMV pozitivnog davatelja (D+R-) s reaktivnim rezultatom QF-CMV testa pri završetku profilakse češće i duže nisu imali CMV bolest, što znači da se QF-CMV može upotrebljavati za identificiranje rizika od kasnijeg razvoja CMV bolesti.

Ovo je ispitivanje također ukazalo na to da je kod skupine pacijenata s transplantiranim organom s najvećim rizikom od razvoja CMV bolesti (D+/R-) reaktivni rezultat bilo kada poslije profilakse bio povezan s većom vjerojatnošću izostanka CMV bolesti.

U ispitivanju 37 primatelja čvrstih organa (6), procjena CD8⁺ T staničnih reakcija specifičnih za CMV s pomoću testa QF-CMV pomogla je u predviđanju spontanog nestanka virusa u usporedbi s napretkom CMV bolesti, uz povećanje CMV viremije. U ovom ispitivanju 24/26 pacijenata (92,3 %) s QF-CMV reaktivnim rezultatom (uz primjenu granične vrijednosti IFN- γ \geq 0,2 IU/ml) spontano se riješilo CMV virusa, dok je samo 5/11 (45,5 %) pacijenata s QF-CMV nereaktivnim rezultatom imalo isti ishod.

Ispitivanje provedeno na 67 pacijenata s transplantiranim plućima kojima su se procijenile epizode CMV viremije nakon transplantacije (7) pokazalo je da se 18/25 (72 %) epizoda CMV viremije dogodilo nakon QF-CMV nereaktivnog rezultata, dok je 4/16 (25 %) epizoda nastupilo nakon QF-CMV reaktivnog rezultata (Fisherov test, $p = 0,0046$, pogledajte Slika 6).

% epizoda pojave HCMV DNA u uzorku s količinom virusa od > 1000 kopija/ml



Slika 6. Statistička analiza CD8⁺ T staničnih reakcija specifičnih za CMV kao što je otkriveno testom QuantiFERON-CMV i razvoj CMV viremije (Fisherov test, $p = 0,0046$). Podaci preuzeti iz Weseslindtner et al. (7).

U velikom multicentričnom prospektivnom ispitivanju koje je provedeno na 127 CMV seronegativnih primatelja čvrstih organa od CMV seropozitivnih davatelja (8), od kojih su svi primili antivirusnu profilaksu, pacijenti s QF-CMV reaktivnim rezultatom (s graničnom vrijednošću testa od 0,1 IU/ml) u bilo kojem trenutku nakon završetka anti-CMV profilakse imali su značajno manji broj kasnijih pojava bolesti 12 mjeseci nakon transplantacije (6,4 %), u usporedbi s onima koji su imali QF-CMV nereaktivni rezultat (22,2 %) i neodređen rezultat (58,3 %, $p < 0,001$). Prilikom klasifikacije neodređenih rezultata koji su i „nereaktivni”, učestalost naknadne CMV bolesti bila je 6,4 % u odnosu na 26,8 %, $p = 0,024$. Pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti testa QF-CMV za zaštitu od CMV bolesti iznosile su 0,90 (95 % CI 0,74 – 0,98) te 0,27 (95 % CI 0,18 – 0,37). Ovo ispitivanje utvrdilo je da QF-CMV može biti koristan za predviđanje niske, srednje ili visoke razine opasnosti u pacijenta od razvoja CMV bolesti nakon profilakse.

U prospektivnom ispitivanju provedenom na 55 primatelja čvrstih organa (8) u kojem se analizirao odnos između QF-CMV rezultata prije transplantacije i epizoda CMV replikacije nakon transplantacije, utvrđena je veća učestalost CMV replikacije nakon transplantacije u CMV seropozitivnih primatelja s nereaktivnim QF-CMV rezultatom prije transplantacije (7/14 ili 50 %) (uz primjenu granične vrijednosti 0,2 IU/ml), u usporedbi s CMV seropozitivnim primateljima koji su imali reaktivan QF-CMV rezultat prije transplantacije (4/30 ili 13,3 %, $p = 0,021$).

Tim ispitivanjem utvrđeno je da je u primatelja koji su imali nereaktivan QF-CMV rezultat prije transplantacije, a primili su organ od CMV seropozitivnog davatelja, rizik od CMV replikacije deset puta veći u usporedbi s primateljima koji su imali reaktivan QF-CMV rezultat prije transplantacije (prilagođeni OR 10,49, 95 % CI 1,88 – 58,46). Stoga, QF-CMV test prije transplantacije može biti koristan za predviđanje rizika od CMV replikacije nakon transplantacije i tako može omogućiti individualizirano postupanje s CMV infekcijom nakon transplantacije čvrstog organa.

Niz drugih ispitivanja koja su se bavila otkrivanjem CD8⁺ T staničnih reakcija specifičnih za CMV s pomoću testa QF-CMV u skupini primatelja organa dovršeno je (2, 3, 5, 9, 10, 15, 16) ili se trenutačno provodi.

Međunarodne smjernice o postupanju s citomegalovirusom pri transplantaciji čvrstih organa

Značaj praćenja CMV specifične imunosti prepoznat je i objavljen u dokumentu „*Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation*” (Ažurirane međunarodne smjernice o postupanju s citomegalovirusom pri transplantaciji čvrstih organa) (12). Ove međunarodne smjernice, koje je razvio tim stručnjaka za CMV i transplantaciju čvrstih organa okupljenih u udruženju The Infectious Diseases Section of The Transplantation Society, predstavljaju dokaz i konsenzus temeljen na stručnom mišljenju o postupanju s CMV-om, što uključuje: dijagnostiku, imunologiju, prevenciju i terapiju.

Ove smjernice utvrđuju da „praćenje imuniteta na CMV specifične T stanične reakcije može u pojedinaca predvidjeti rizik od razvoja CMV bolesti nakon transplantacije i može biti koristan za profilaksu i preventivnu terapiju” (12).

Nadalje, smjernice pružaju i preporuke za atribute idealnog testa za praćenje imuniteta, što uključuje sljedeće:

- mogućnost procjene kvantitete i funkcije CD4⁺ i CD8⁺ T stanica primatelja transplantacije
- mogućnost mjerenja IFN- γ
- jednostavno provođenje, povoljno i ponovljivo
- brzo vrijeme provođenja
- mogućnost jednostavnog slanja uzoraka u specijalizirane laboratorije

QF-CMV ispunjava sve kriterije koji su navedeni u ovim smjernicama i predstavlja jedini standardizirani test za praćenje imuniteta koji može otkriti IFN- γ , specifičan za CMV.

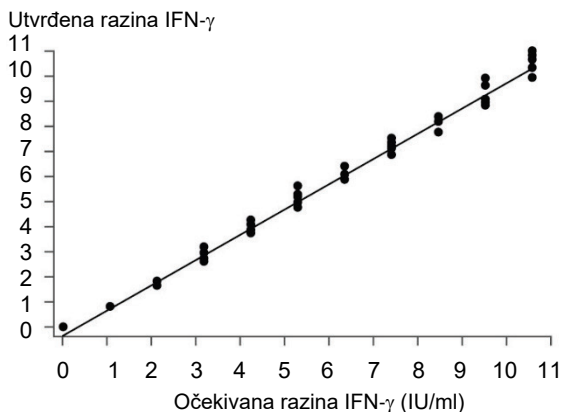
Radne značajke testa

QF-CMV ELISA upotrebljava rekombinantni humani IFN- γ standard, koji je testiran u odnosu na referentni IFN- γ pripravak (NIH ref.: Gxg01-902-535). Rezultati testnih uzoraka izražavaju se u internacionalnim jedinicama (international units, IU) u odnosu na standardnu krivulju pripremljenu testiranjem otopine sekundarnog standarda isporučenog s kompletom.

Heterofilna (npr. humana anti-mišja) protutijela u serumu ili plazmi određenih osoba mogu uzrokovati smetnje u imunoanalizama. Djelovanje heterofilnih protutijela u QF-CMV ELISA testu umanjeno je dodavanjem običnog mišjeg seruma u zeleni diluens i upotrebom fragmenata F(ab')₂ monoklalnog protutijela kao protutijela za hvatanje IFN- γ koje je naneseo na udubljenja na mikrotitar pločicama.

Granica za očitavanje testa QF-CMV ELISA iznosi 0,065 IU/ml i nema dokaza za prozonski učinak visoke razine izlaganja s koncentracijama za IFN- γ do 10.000 IU/ml. Utvrđeno je da QF-CMV ELISA protutijela ne reagiraju ni s jednim od testiranih citokina, uključujući IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL10 i IL12.

Linearnost testa QF-CMV ELISA dokazana je nasumičnim postavljanjem pet replika iz 11 spremnika plazme poznatih IFN- γ koncentracija na ploči ELISA. Crta linearne regresije ima nagib od $1,002 \pm 0,011$ i koeficijent korelacije od 0,99 (slika 7.).



Slika 7. Profil linearnosti QF-CMV ELISA koji je utvrđen testiranjem pet replika 11 uzoraka plazme poznatih IFN- γ koncentracija.

Mogućnost ponavljanja testa QF-CMV ELISA procijenjena je testiranjem 20 uzoraka plazme s različitim koncentracijama IFN- γ u replikama po tri uzorka, u tri laboratorija, na tri nasumična dana, koje su testirala tri različita operatora. Tako je svaki uzorak testiran 27 puta, u devet neovisnih testiranja. Jedan je uzorak bio Nulta kontrola s izračunatom koncentracijom IFN- γ od 0,08 (95 % CI 0,07 – 0,09) IU/ml. Od preostalih 19 uzoraka plazme raspon koncentracija bio je 0,33 (95 % CI 0,31 – 0,34) do 7,7 IU/ml (95 % CI 7,48 – 7,92).

Nepreciznost za vrijeme rada ili unutar testa procijenjena je određivanjem prosjeka %CV-a za svaku testnu plazmu koja sadržava IFN- γ sa svake ploče (n = 9) s rasponom od 4,1 do 9,1 %CV. Prosjek tijekom rada %CV (\pm 95 % CI) bio je 6,6 % \pm 0,6 %. Nulta IFN- γ plazma imala je prosjek od 14,1 %CV.

Ukupna nepreciznost ili nepreciznost između testova utvrđena je usporedbom 27 izračunanih koncentracija IFN- γ za svaki uzorak plazme, i imala je raspon od 6,6 do 12,3 %CV. Opći prosjek %CV (\pm 95% CI) bio je 8,7 % \pm 0,7 %. Nulta IFN- γ plazma pokazala je 26,1%CV. Ova se razina varijacije treba očekivati jer je izračunata koncentracija IFN- γ niska i varijacija za niske procjene koncentracije bit će veća nego za više koncentracije.

Tehnički podaci

Neodređeni rezultati

Neodređeni rezultati mogu biti povezani sa statusom imuniteta testiranog pojedinca, a mogu biti uzrokovani brojnim tehničkim čimbenicima:

- razdoblje između uzimanja uzorka krvi i inkubacije na temperaturi od 37 °C dulje od 16 sati
- pohrana uzoraka krvi izvan preporučenog temperaturnog raspona (22 °C ± 5 °C)
- nedovoljno miješanje epruveta za uzimanje krvi
- nepotpuno oprana ELISA ploča

Ako se sumnja na tehnički problem prilikom uzimanja krvi ili rukovanja uzorcima, ponovite cijeli QF-CMV test s novim uzorcima krvi. ELISA test sa stimuliranim uzorcima plazme može se ponoviti ako se sumnja u odstupanja od propisane ELISA metode testiranja. Neodređeni rezultati (iz niskih Mitogen vrijednosti) neće se mijenjati ponavljanjem testa, osim ako je došlo do pogreške prilikom provedbe ELISA testa.

Zgrušani uzorci plazme

Ako pri duljem pohranjivanju uzoraka plazme nastanu ugrušci fibrina, centrifugirajte uzorke kako bi se zgrušani materijal nataložio i plazma lakše pipetirala.

Vodič za rješavanje problema

Ovaj vodič za rješavanje problema može biti koristan pri rješavanju bilo kojih problema koji mogu nastati. Za više informacija pogledajte i tehničke podatke na stranici: www.QuantiFERON.com. Informacije za kontakt potražite na poledini.

Komentari i prijedlozi

Niska očitavanja optičke gustoće za standarde

- | | |
|---|---|
| a) Pogreška pri razrjeđivanju standarda | Razrjeđivanje Standarda iz kompleta provodite točno prema priloženoj Uputi za upotrebu proizvoda QF-CMV ELISA. |
| b) Pogrešno pipetiranje | Provjerite jesu li pipete kalibrirane i upotrijebljene točno prema uputama proizvođača. |
| c) Temperatura inkubacije preniska | Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| d) Vrijeme inkubacije prekratko | Inkubacija ploče s konjugatom, standardima i uzorcima treba trajati 120 ± 5 minuta. Otopina enzimskog supstrata inkubira se na ploči 30 minuta. |
| e) Pogrešan filter za čitač ploče | Ploču treba čitati pri 450 nm referentnim filtrom od 620 i 650 nm. |
| f) Reagensi su prehladni | Svi reagensi, osim 100x koncentriranog konjugata, moraju postići sobnu temperaturu prije početka testa. To traje oko 1 sat. |
| g) Vijek trajanja kompleta/komponenti istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije. |

Nespecifična boja reakcije

- | | |
|---|--|
| a) Nepotpuno pranje ploča | Ploču operite najmanje šest puta s 400 µl pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za ispiranje, može biti potrebno i više od šest ciklusa pranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Unakrsna kontaminacija ELISA udubljenja | Pažljivo pipetirajte i miješajte uzorak da biste smanjili rizik. |
| c) Vijek trajanja kompleta/komponenti istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije. |
| d) Otopina enzimskog supstrata kontaminirana | Otklonite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Uvjerite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici. |

Komentari i prijedlozi

- | | |
|--|--|
| e) Miješanje plazme u epruvetama za centrifugiranje prije prikupljanja | Osigurajte da se uzorci plazme pažljivo prikupljaju iznad gela bez pipetiranja gore i dolje, pazeći na materijal na površini gela. |
|--|--|

Jaka obojenost pozadine

- | | |
|--|--|
| a) Nepotpuno pranje ploča | Ploču operite najmanje šest puta s 400 µl pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za ispiranje, može biti potrebno i više od šest ciklusa pranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Temperatura inkubacije previsoka | Inkubaciju za ELISA test treba provoditi na sobnoj temperaturi (22 °C ± 5 °C). |
| c) Vijek trajanja kompleta/ komponenti istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca nakon rekonstitucije. |
| d) Otopina enzimskog supstrata kontaminirana | Otklonite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Uvjerite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici. |

Nelinearna standardna krivulja i odstupanja između duplikata

- | | |
|---|--|
| a) Nepotpuno pranje ploča | Ploču operite najmanje šest puta s 400 µl pufera za ispiranje po udubljenju. Ovisno o primijenjenom uređaju za ispiranje, može biti potrebno i više od šest ciklusa pranja. Preporučuje se između ciklusa pričekati najmanje 5 sekundi radi namakanja. |
| b) Pogreška pri razrjeđivanju standarda | Razrjeđivanje standarda iz kompleta provodite točno prema ovoj Uputi za upotrebu proizvoda. |
| c) Nedovoljno miješanje | Prije nego što ih dodate na ploču, dobro promiješajte reagense okretanjem ili laganim kružnim mućkanjem. |
| d) Nedosljedna tehnika pipetiranja ili prekid tijekom pripremanja testa | Uzorke i standarde treba dodavati kontinuirano. Svi reagensi trebaju biti pripremljeni prije početka testiranja. |

Informacije o proizvodu i tehničke priručnike možete dobiti besplatno od tvrtke QIAGEN, putem svoga distributera ili na adresi www.QuantiFERON.com.















Referencije

1. Manuel, O., et al. (2013) Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 56, 817.
2. Walker, S., et al. (2007) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using QuantiFERON-CMV. *Transpl. Infect. Dis.* 9, 165.
3. Westall, G.P., et al. (2008) Linking CMV serostatus to episodes of CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV reactivation following lung transplantation by measuring CMV-specific CD8⁺ T cell immunity. *Am. J. Transplant.* 8, 1749.
4. Kumar, D., et al. (2009) Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am. J. Transpl.* 9, 1214.
5. Lachmanova, A.I., et al. (2010) QuantiFERON-CMV test in prediction of cytomegalovirus infection after kidney transplantation. *Transpl. Proc.* 42, 3574.
6. Lisboa, L.F., et al. (2012) Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. *Transplant.* 93, 195.
7. Weseslindtner, L., et al. (2012) Prospective analysis of human cytomegalovirus DNAemia and specific CD8⁺ T-cell responses in lung transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 12, 2172.
8. Cantisán, S., et al. (2013) Pre-transplant interferon- γ secretion by CMV-specific CD8⁺ T cells informs the risk of CMV replication after transplantation. *Am. J. Transplant.* 13, 738.
9. Fleming, T., et al. (2010) Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish Hospital. *J. Med. Virol.* 82, 433.
10. Clari, M.A., et al. (2012) Performance of the QuantiFERON-cytomegalovirus (CMV) assay for detection and estimation of the magnitude and functionality of the CMV-specific interferon-producing CD8⁺ T-cell response in allogeneic stem cell transplant recipients. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 791.

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

Simboli

Na ambalaži i naljepnicama mogu se pojaviti sljedeći simboli:

Simbol	Definicija simbola
	Sadržava reagensa dovoljno za <N> reakcija
	Upotrijebiti do
	Oznaka CE
	In vitro dijagnostički medicinski uređaj
	Kataloški broj
	Broj šarže
	Broj materijala
	Global Trade Item Number (globalni broj trgovačke jedinice)
	Ograničenja temperature
	Za jednu upotrebu
	Čuvajte podalje od sunčeve svjetlosti
	Prije upotrebe pročitajte upute
	Proizvođač
	Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici

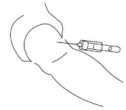
Kontaktни podaci

Za tehničku pomoć i više informacija posjetite naš Centar za tehničku pomoć na **www.qiagen.com/Support**, nazovite broj 00800-22-44-6000 ili se obratite jednom od tehničkih odjela tvrtke QIAGEN ili lokalnim distributerima (pogledajte poledinu ili posjetite stranicu **www.qiagen.com**).

Skraćeni testni postupak ELISA

Faza 1: Inkubacija krvi

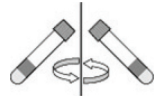
1. Uzmite krv od pacijenta u epruvete za uzimanje krvi i promiješajte je tako da protresete uzorke deset (10) puta onoliko jako koliko je potrebno kako bi se cijela unutarnja površina epruveta prekrila krvlju i kako bi se rastopili antigeni na stijenjkama epruvete.



2. Epruvete inkubirajte u uspravnom položaju na $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 16 do 24 sata.



3. Poslije inkubacije centrifugirajte epruvete 15 minuta pri obrtaju od 2000 to 3000 RCF (*g*) da biste odvojili plazmu od crvenih krvnih stanica.



4. Nakon centrifugiranja izbjegavajte pipetiranje prema gore i dolje ili miješanje plazme prije prikupljanja plazme. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.



Faza 2: IFN- γ ELISA

1. ELISA komponente, osim 100x koncentriranog konjugata, ostavite da se stabiliziraju na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta.



2. Rekonstituirajte standard iz kompleta destiliranom ili deioniziranom vodom na 8,0 IU/ml. Pripremite četiri (4) standardne otopine.



3. Rekonstituirajte liofilizirani 100x koncentrirani konjugat s pomoću destilirane ili deionizirane vode.

4. Pripremite konjugat spreman za upotrebu s pomoću zelenog diluensa i dodajte 50 μ l u svako udubljenje.



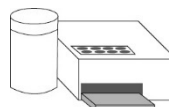
5. Dodajte 50 μ l testnog uzorka plazme i 50 μ l standarda u odgovarajuća udubljenja. Promiješajte tresilicom.



6. Inkubirajte 120 minuta na sobnoj temperaturi.



7. Isperite udubljenja najmanje 6 puta s 400 μ l pufera za ispiranje po udubljenju.



8. Dodajte 100 μ l otopine enzimskog supstrata u svako udubljenje. Promiješajte tresilicom.



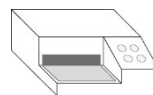
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.



10. Dodajte 50 μ l enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svako udubljenje. Promiješajte tresilicom.



11. Očitajte rezultate na 450 nm s referentnim filtrom od 620 do 650 nm.



12. Analizirajte rezultate.



Povijest revizija priručnika

Dokument	Izmjene	Datum
L1075110-R5	Dodavanje sigurnosnih informacija o slomljenim bočicama Ažuriranje tablice 2., Tumačenje rezultata testa QF-CMV, stranica 24.	Veljača 2018.
L1075110-R5	Ažurirane informacije Globalno usklađenog sustava razvrstavanja i označivanja kemikalija (Globally Harmonized System, GHS), stranica 10.	Veljača 2018.

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom

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

Ugovor o ograničenoj licenciji za komplet QuantiFERON-CMV ELISA

Upotrebom ovog proizvoda svaki kupac ili korisnik proizvoda pristaje na sljedeće uvjete:

1. Proizvod se može upotrebljavati samo u skladu s protokolima koji su isporučeni s proizvodom i ovim priručnikom i namijenjen je samo za upotrebu s komponentama koje su sadržane na ploči. QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za upotrebu ili ugrađivanje komponenata ove ploče s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom ploči, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na stranici www.qiagen.com. Neke od tih dodatnih protokola ustupili su korisnici tvrtke QIAGEN drugim korisnicima. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. QIAGEN ne daje na njih nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licencija, QIAGEN ne jamči da ova ploča i/ili njezina upotreba ne krši prava trećih strana.
3. Ova ploča i njezine komponente licencirani su samo za jednokratnu upotrebu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati.
4. QIAGEN se odriče svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ove ploče potvrđuju da neće dopustiti drugim osobama poduzimanje koraka koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. QIAGEN može provesti zabrane navedene u ovom Ugovoru o ograničenoj licenciji na bilo kojem sudu te će potraživati sve sudske troškove i troškove postupka istraživanja, uključujući troškove odvjetnika, za svaku radnju s ciljem provedbe ovog Ugovora o ograničenoj licenciji ili bilo kojeg svojeg prava intelektualnog vlasništva povezanog s pločom i/ili njezinim komponentama.

Ažurirane uvjete licencije potražite na adresi www.qiagen.com.

Velj.-18 © 2018 QIAGEN, sva prava pridržana.

Narudžbe www.qiagen.com/shop | Tehnička podrška support.qiagen.com | Web-mjesto www.qiagen.com