

Listopad 2019.

Upute u pakiranju QuantiFERON[®]-CMV ELISA



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



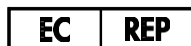
Za in vitro dijagnostičku uporabu



0350-0201



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



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NJEMAČKA

1075110 Rev. 06



www.QuantiFERON.com

Sadržaj

Predviđena uporaba	5
Sažetak i objašnjenje	5
Načelo postupka	6
Vrijeme potrebno za izvođenje ispitivanja	7
Isporučeni materijali	8
Sadržaj kompleta	8
Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni	9
Upozorenja i mjere opreza	9
Sigurnosne informacije	11
Pohrana i rukovanje reagensima	12
Uzimanje ispitaka 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 testa	22
Izrada standardne krivulje (ako se ne upotrebljava softver za analizu QF-CMV Analysis Software)	22
Kontrola kvalitete testa	23
Tumačenje rezultata	24
Ograničenja	25
Očekivane vrijednosti	25
Radne značajke	28
Kliničke radne značajke	28

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

Predviđena uporaba

QuantiFERON-CMV ELISA (QF-CMV) jest in vitro ispitivanje koje se izvodi s pomoću koktela peptida koji simuliraju proteine humanog citomegalovirusa (CMV) radi stimuliranja stanica heparinizirane pune krvi. Otkrivanje interferona gama (IFN- γ) enzimski povezanim imunosorbentnim ispitivanjem (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) upotrebljava se za kvantifikaciju 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 suzbijanju replikacije CMV-a također je naglašena činjenicom da citotoksični T-limfociti (CTL) CD8⁺ specifični za CMV mogu zaštititi od patogeneze povezane s virusom. Broj CTL-ova CD8⁺ specifičnih za CMV u imunosuprimiranih 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 ispitivanje za CMI reakcije na peptidne antigene koji simuliraju proteine CMV-a. CMV peptidi usmjereni su na 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) klase I prema sustavu humanih leukocitnih antigena (HLA), koji obuhvaćaju > 98 % ljudske populacije. Osobe zaražene CMV-om obično imaju limfocite CD8⁺ u krvi koji prepoznaju te antigene. U tom postupku prepoznavanja stvara se i otpušta citokin, IFN- γ . Glavna je svrha testa otkrivanje i nakon toga kvantifikacija IFN- γ .

Načelo postupka

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

Epruveta Mitogen upotrebljava se u QF-CMV testu kao pozitivna kontrola. To može biti od posebne važnosti ako je imunološki status osobe nejasan. Epruveta Mitogen 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 epruveta CMV Antigen i Mitogen često može biti iznad gornjih granica većine čitača ELISA, čak i kada su osobe umjereno imunosuprimirane. 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 diluensu Green Diluent i ispitati ispitivanjem 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 Nil vrijednosti IFN- γ izražene u IU/ml. Mitogenom stimuliran uzorak plazme služi kao pozitivna kontrola IFN- γ svakog testiranog ispitka. 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 ispitkom, nepravilnog punjenja/miješanja epruvete Mitogen ili ako limfociti pacijenta nisu u stanju stvarati IFN- γ , kao što je slučaj s pacijentima koji su nedavno bili podvrgnuti transplantaciji. Nil uzorak prilagođava se za pozadinski ili nespecifični IFN- γ u uzorcima krvi. Razina IFN- γ Nil epruvete oduzima se od razine IFN- γ za epruvete CMV Antigen i Mitogen (za pregled načina tumačenja rezultata za QF-CMV pogledajte „Tumačenje rezultata” na stranici 24. ovih uputa u pakiranju).

Vrijeme potrebno za izvođenje ispitivanja

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

Inkubacija epruveta s uzorcima krvi na temperaturi od 37 °C:

16 – 24 sata

ELISA:

Pribl. 3 sata za jednu pločicu ELISA

Manje od 1 sata rada

Dodajte 10 – 15 minuta za svaku dodatnu pločicu

Isporučeni materijali

Sadržaj kompleta

Blood Collection Tubes (pakiranje za jednog pacijenta)	
Katalogski br.	0192-0301
Broj priprema	1
QuantIFERON Nil Control (Nil 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	1

QuantIFERON-CMV ELISA	Komplet ELISA s 2 pločice
Katalogski br.	0350-0201
Microplate strips (Mikrotitar trake) (12 x 8 jažica) obložene anti-humanim mišjim IFN- γ monoklonskim protutijelom	2 kompleta mikrotitar traka s 12 x 8 jažica
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 nakon rekonstitucije)
Green Diluent (Zeleni diluens) (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 sredstva ProClin® 300)	1 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (Otopina enzimskog supstrata) (sadržava H ₂ O ₂ , 3,3',5,5' tetrametilbenzindin)	1 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (Enzimska otopina za zaustavljanje reakcije) (sadržava 0,5 M H ₂ SO ₄)*	1 x 15 ml
QF-CMV ELISA Package Insert	1

* Sadržava sumpornu kiselinu. Pogledajte stranicu 9 za mjere opreza.

Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni

Kada radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Više informacija potražite u odgovarajućim sigurnosno-tehničkim listovima (STL) 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 pločice
- Deionizirana ili destilirana voda, 2 litre
- Uređaj za ispiranje mikrotitar pločica (po mogućnosti automatiziran)
- Čitač mikrotitar pločica s filtrom od 450 nm i referentnim filtrom od 620 nm do 650 nm
- Poklopac pločice

Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku uporabu

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

OPREZ



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

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

QuantiFERON Enzyme Stopping Solution



Sadržava: sumpornu kiselinu. Upozorenje! Može nagrizati metale. Nadražuje kožu. Uzrokuje jako nadraživanje oka. Nositi zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

QuantiFERON Enzyme Substrate Solution

Upozorenje! Uzrokuje blago nadraživanje kože. Nositi zaštitne rukavice / zaštitno odijelo / zaštitu za oči / zaštitu za lice.

QuantiFERON Green Diluent



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

QuantiFERON Wash Buffer 20x Concentrate

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

Sigurnosne informacije

Dodatne informacije

- Nepridržavanje uputa u pakiranju proizvoda QF-CMV Package Insert 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 za konjugat ili IFN- γ standard ako bočice pokazuju znakove oštećenja ili ako je gumena brtva oštećena. Nemojte rukovati razbijenim bočicama. Poduzmite odgovarajuće mjere opreza i odložite bočice na siguran način.

Preporuka: s pomoću alata za skidanje osigurača na bočicama otvorite bočice za konjugat ili IFN- γ standard radi smanjenja rizika od ozljeda uzrokovanih poklopcem s metalnim osiguračem.

- Nemojte miješati ili upotrebljavati mikrotitar trake, humani IFN- γ standard, diluens Green Diluent 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 Blood Collection Tubes ili komplete QF-CMV ELISA nakon datuma isteka valjanosti.
- Provjerite je li laboratorijska oprema, kao što su uređaji za ispiranje i čitači pločica, kalibrirana/potvrđena za upotrebu.

Pohrana i rukovanje reagensima

Epruvete za uzimanje krvi

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

Upute o rekonstituiranju reagensa potražite pod „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 ako se pohrani na temperaturi od 2 do 8 °C. Zabilježite datum na koji je humani IFN- γ standard rekonstituiran.
- 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 spreman za upotrebu mora se potrošiti u roku od 6 sati nakon pripreme.
- Pufer za ispiranje koji je spreman za upotrebu može se čuvati na sobnoj temperaturi (22 °C $\pm$ 5 °C) do 2 tjedna.

Uzimanje ispitaka i rukovanje

U testu QF-CMV upotrebljavaju se sljedeće epruvete za uzimanje krvi:

- Nil 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 ispitanika 1 ml venske krvi izravno u svaku epruvetu za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes. Taj bi postupak trebao provoditi tehničar osposobljen za vađenje krvi.

Epruvete za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes mogu se upotrebljavati na nadmorskoj visini do 810 metara.

Ako se epruvete za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes 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 epruveta za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes i dodate 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 opisano u nastavku. Budući da se epruvete od 1 ml relativno polako pune krvlju, epruvetu ostavite još 2 – 3 sekunde na igli nakon što se čini da je puna. Tako ćete osigurati uzimanje potrebne količine.

Crna oznaka s bočne strane epruveta označava razinu punjenja od 1 ml. Epruvete za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes 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 krvi.

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

Ili krv možete izvaditi u jednu generičku epruvetu za uzimanje krvi koja sadržava litij-heparin kao antikoagulans, a zatim je prenijeti u epruvete za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes. Upotrebljavajte samo litij-heparin kao krvni antikoagulans jer ostali antikoagulansi mogu utjecati na rezultate ispitivanja. 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 prijenosa u epruvete za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes radi inkubacije, 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 Blood Collection Tubes protresite ih 10 puta, onoliko snažno koliko je potrebno da se cijela unutarnja površina epruvete obloži krvlju, odnosno da se otope antigeni na stijenkama epruvete.

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

Prejako protresanje uzrokovati remećenje gela i dovesti do pogrešnih rezultata.

Ako je krv prikupljena u epruvetu koja sadržava litij-heparin, uzorci se moraju ravnomjerno izmiješati prije pretakanja u epruvete za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes. Pazite da se krv dobro izmiješa tako što ćete lagano okrenuti epruvetu neposredno prije pretakanja. Rasporedite 1 ml alikvota (jedan po epruveti za uzimanje krvi QF-CMV) u odgovarajuću epruvetu Nil, CMV Antigen i Mitogen. To bi trebalo obaviti aseptično, uz pridržavanje odgovarajućih sigurnosnih mjera, uklanjanjem čepova s triju epruveta za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes 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 (Nil, CMV Antigen, Mitogen) 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, i to u roku od 16 sati od uzimanja uzoraka. Prije inkubacije epruvete držite na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). 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 nije potreban CO_2 niti 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 izbjegavajte pipetiranje prema gore i prema dolje ili bilo kakvo miješanje plazme prije izdvajanja. Uvijek pazite da ne poremetite materijal na površini gela.

Važno: uzorci plazme trebali bi se uzimati samo pipetom.

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

Uzorci plazme mogu se pohranjivati u centrifugiranim epruvetama za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes 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 koji su potrebni za izvođenje testa ELISA.

1. Svi uzorci plazme i reagensi, osim 100x koncentriranog konjugata, prije upotrebe moraju biti sobne temperature ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ostavite najmanje 60 minuta za postizanje toplinske ravnoteže.
2. Uklonite nepotrebne trake pločice ELISA 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 uporabe sačuvajte okvir i poklopac za uporabu s preostalim trakama.

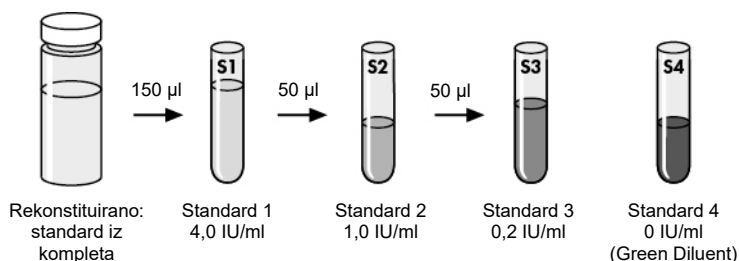
3. Rekonstituirajte humani IFN- γ standard količinom deionizirane ili destilirane vode koja je naznačena na etiketi bočice. Pažljivo promiješajte kako biste minimizirali stvaranje pjene i uvjerite se da je sadržaj potpuno rastopljen. Rekonstitucijom IFN- γ standarda na točan volumen dobivamo otopinu 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 pripravljanje serije razrjeđivanja do četiriju koncentracija IFN- γ u 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 ispitati najmanje u duplikatu. Pripremite svježe razrijeđene otopine standarda iz kompleta za svaki postupak ELISA.

Primjer postupka za duplikate standarda

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



Slika 1. Pripremanje standardne krivulje serijskim razrjeđivanjem.

- Rekonstituirajte liofilizirani 100x koncentrirani konjugat s 0,3 ml deionizirane ili destilirane vode. Nježno izmiješajte kako biste sveli stvaranje pjene na najmanju moguću mjeru i uvjerite se da je konjugat potpuno otopljen.

Konjugat spreman za upotrebu priprema se tako da se potrebna količina rekonstituiranog 100x koncentriranog konjugata razrijedi diluensom Green Diluent (pogledajte Tablica 1 na sljedećoj stranici).

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

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

Upotrebljavajte samo diluens Green Diluent.

Tablica 1. Pripremanje konjugata spremnog za upotrebu

Broj traka	Količina 100x koncentriranog konjugata	Količina diluensa Green Diluent
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. U slučaju uzoraka plazme koji su odvojeni iz epruveta za uzimanje krvi i potom zamrznuti ili pohranjeni na dulje od 24 sata prije ispitivanja, dobro promiješajte prije dodavanja u jažicu testa ELISA.

Važno: ako se uzorci plazme planiraju dodati izravno iz centrifugiranih epruveta za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes, 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 diluensu Green Diluent (10 µl plazme + 90 µl GD-a). Nil plazmu ne treba razrjeđivati.

Preporučuje se paralelno ispitivanje sljedećih uzoraka:

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

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

Nil, CMV Antigen, Mitogen

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

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

Nil, CMV Antigen (1/10), Mitogen

7. Višekanalnom pipetom dodajte 50 µl svježe pripremljenog konjugata spremnog za upotrebu u odgovarajuće jažice testa ELISA.
8. Dodajte 50 µl testnih uzoraka plazme u odgovarajuće jažice. Na kraju dodajte po 50 µl standarda 1 do 4 u odgovarajuće jažice. Standarde treba ispitati najmanje u duplikatu.
9. Prekrijte pločicu ELISA i dobro izmiješajte uzorke/standarde konjugata i plazme u tresilici za mikrotitar pločice u trajanju od 1 minute na 500 do 1000 o/min. Izbjegavajte prskanje.
10. Pločicu ELISA 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 pločice 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 pufera za ispiranje spremnog za upotrebu.

12. Nakon završetka inkubacije pločice ELISA isperite jažice s 400 µl pufera za ispiranje spremnog za upotrebu u najmanje šest ciklusa. Preporučujemo upotrebu automatskog uređaja za ispiranje mikrotitar pločica.

Važno: temeljito ispiranje vrlo je važno za učinak ispitivanja. Pazite da pri svakom ciklusu ispiranja sve jažice budu do vrha potpuno napunjene puferom za ispiranje. Preporučujemo da između svakog ciklusa ispiranja ostavite najmanje 5 sekundi za namakanje.

U sabirni spremnik za otpadnu tekućinu treba dodati standardni dezinficijens koji se upotrebljava u laboratorijima. Pridržavajte se propisanih uputa za dekontaminaciju potencijalno infektivnih materijala.

13. Lupkanjem istresite pločice okrenute prema dolje na upijajućem ručniku koji ne ispušta dlačice kako biste uklonili ostatak pufera za ispiranje. Dodajte 100 µl otopine enzimskog supstrata u svaku jažicu, prekrijte pločicu i dobro promiješajte s pomoću tresilice za mikrotitar pločice 1 minutu na 500 do 1000 o/min.

-
14. Svaku pločicu prekrijte poklopcem i inkubirajte na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) u trajanju od 30 minuta. Za vrijeme inkubacije pločice 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 svaku jažicu istim redoslijedom kojim ste dodavali supstrat i dobro promiješajte na 500 do 1000 o/min s pomoću tresilice za mikrotitar pločice.
 16. Izmjerite optičku gustoću (Optical Density, OD) svake jažice u roku od 5 minuta nakon zaustavljanja reakcije s pomoću čitača mikrotitar pločica 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 testa

Softver za analizu QuantiFERON-CMV Analysis Software, koji služi za analizu neobrađenih podataka i izračun rezultata, možete nabaviti od tvrtke QIAGEN na web-mjestu **www.QuantiFERON.com**. Pazite da upotrebljavate najnoviju verziju softvera za analizu QF-CMV Analysis Software.

Softver provodi procjenu kontrole kvalitete ispitivanja, generira standardnu krivulju i daje rezultat za svakog testiranog ispitanika, kao što je objašnjeno pod „Tumačenje rezultata” na stranici 24. Softver izvješćuje o najnižoj razini razrjeđivanja koja daje rezultat u rasponu QF-CMV ELISA testa, uzimajući u obzir faktor razrjeđivanja.

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

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

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

Izradite standardnu krivulju $\log_{(e)} - \log_{(e)}$ grafičkim prikazom $\log_{(e)}$ srednje vrijednosti OD-a (os y) u odnosu na $\log_{(e)}$ IFN- γ koncentracije standarda u IU/ml (os x), izostavivši nulti standard iz izračuna. Izračunajte pravac najbolje aproksimacije za standardnu krivulju regresijskom analizom.

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

Za te izračune mogu se upotrijebiti softverski paketi koji su dostupni uz čitače mikrotitar pločica, kao i standardne proračunske tablice ili programi za statistiku (kao npr. Microsoft® Excel®). Preporučujemo primjenu tih 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 razine razrjeđivanja koja daje rezultat u rasponu QF-CMV ELISA testa; pripazite 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 testnog uzorka.

Test ELISA valjan je 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 apsorbancije standarda mora biti $\geq 0,98$.

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

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

Tumačenje rezultata

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

Tablica 2. Tumačenje rezultata testa QuantiFERON-CMV

Nil (IU/ml)	CMV minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)*	Rezultata za QF-CMV	Izvrješće/tumačenje
≤ 8,0	≥ 0,20 i ≥ 25 % Nil	Svejedno koliko	Reaktivno [†]	Otkriven imunitet na anti-CMV
	< 0,20 ILI ≥ 0,20 i <25 % Nil	≥ 0,5	Nereaktivno	NIJE otkriven imunitet na anti-CMV
		< 0,5	Neodređeno [‡]	Rezultati su neodređeni za reakciju na CMV
> 8,0 [§]	Svejedno koliko	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 mikrotitar pločica. 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 % ispitanika imalo razine IFN-γ u vrijednosti > 8,0 IU/ml za Nil 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 ispitanika, njegovim trenutačnim zdravstvenim stanjem i drugim dijagnostičkim pretragama.

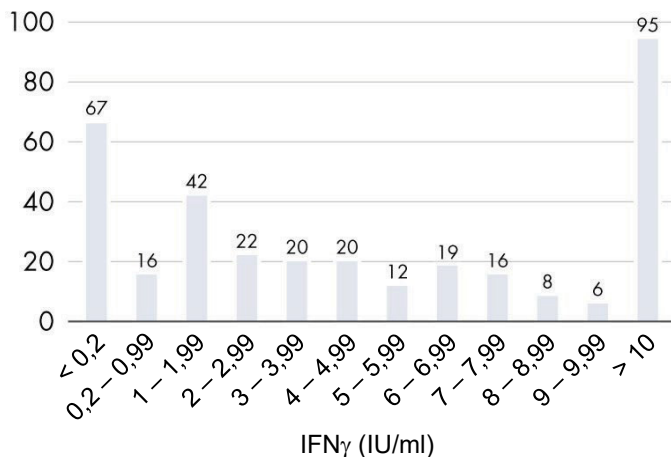
Nepouzdana ili neodređeni rezultati mogu se pojaviti iz sljedećih razloga:

- odstupanja od postupka opisanog u priloženim uputama u pakiranju proizvoda QuantiFERON-CMV ELISA Package Insert
- prekomjerne razine IFN- γ u kontrolnoj epruveti
- prekoračenja roka od 16 sati između uzimanja ispitka krvi i inkubacije na temperaturi od 37 °C.

Očekivane vrijednosti

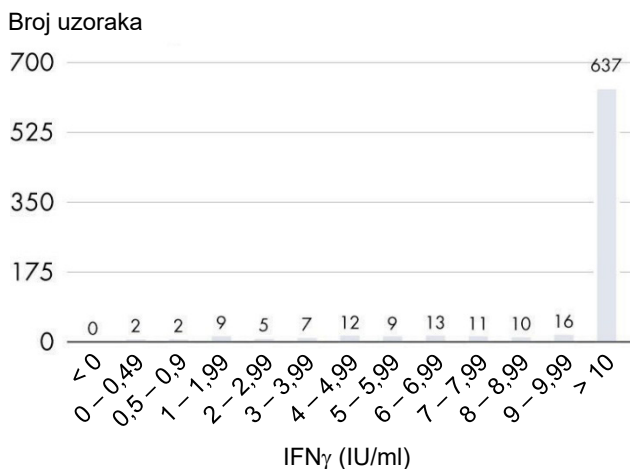
Očekivane vrijednosti IFN- γ za QuantiFERON-CMV dobivene su testiranjem 591 uzorka koji su dobiveni od zdravih ispitanika. Za 343 uzorka utvrđeno je da su seropozitivni, a za 248 uzoraka utvrđeno je da su seronegativni na CMV IgG. Serološki status za CMV bio je nepoznat u vrijeme izvođenja testa QF-CMV. Od 248 uzoraka od CMV seronegativnih ispitanika 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 Nil). Prikazana je distribucija IFN- γ reakcija za CMV Antigen epruvetu (minus Nil) kod 343 CMV seropozitivna ispitanika (Slika 2).

Broj uzoraka



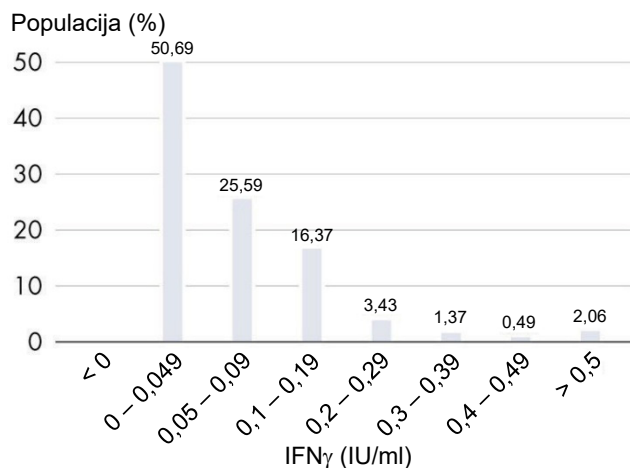
Slika 2. Distribucija QF-CMV IFN- γ reakcija (minus Nil) u seropozitivnih zdravih ispitanika (n = 343).

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



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

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



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

Radne značajke

Kliničke radne značajke

Granična vrijednost testa za utvrđivanje prethodne izloženosti CMV-u metodom QF-CMV utvrđena je na temelju analize rezultata dobivenih od skupine zdravih ispitanika (n = 223), pri čemu su rezultati za QF-CMV uspoređeni s CMV IgG serološkim rezultatima. Analizom operativne značajke prijemnika (Receiver Operating Characteristic, ROC) utvrđeno je da je granična vrijednost testa od 0,04 IU/ml (nakon oduzimanja Nil) 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 ovo ispitivanje najučinkovitije u upotrebi za zdravu populaciju.

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

Tablica 3. Slaganje između ispitivanja QuantiFERON-CMV i serološkog testa na CMV IgG u zdravih ispitanika

		CMV serologija		Ukupno
		Pozitivno	Negativno	
QuantiFERON-CMV	Reaktivno	145	0	145 (46,8 %)
	Nereaktivno	16	149	165 (53,2 %)
	Ukupno	161 (51,9 %)	149 (48,1 %)	310 (100 %)

Granična vrijednost ispitivanja

Preporučena granična vrijednost kliničkog testiranja za ovo ispitivanje iznosi 0,2 IU/ml u CMV Antigen epruveti (minus Nil), 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 reakcija na QF-CMV i serološkog statusa za CMV IgG zdravih ispitanika.

Specifičnost za QF-CMV približno je utvrđena procjenom broja lažno pozitivnih rezultata (reakcija na QF-CMV) u uzorcima zdravih davatelja koji nisu bili ranije izloženi CMV-u (CMV IgG seronegativne osobe). Osjetljivost je približno utvrđena procjenom reaktivnosti na QF-CMV 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 klase I prema sustavu HLA (približno 98 % populacije). Budući da su haplotipovi HLA ispitanika testiranih na CMV serologiju bili nepoznati, očekivalo se da mali postotak seropozitivnih osoba neće reagirati na epruvete za uzimanje krvi QF-CMV Blood Collection Tubes.

Specifičnost

U ispitivanju provedenom na 591 uzorku dobivenom od zdravih ispitanika nisu otkriveni lažno pozitivni rezultati za QF-CMV 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 ispitivanjem QF-CMV i serološkim testom na CMV IgG pokazali 100%-tnu podudarnost.

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 ispitanika koji su CMV IgG seropozitivni, razina slaganja između reakcija na QF-CMV i seroloških rezultata za CMV IgG iznosila je 80,5 % uz 276/343 uzorka za koje je testiranjem utvrđena reaktivnost na QF-CMV i koji su bili pozitivni na serološkom testu na CMV IgG. Uočena nepodudarnost može biti posljedica lažno pozitivne CMV serologije ili odsutnosti reaktivnih HLA tipova u testiranih osoba.

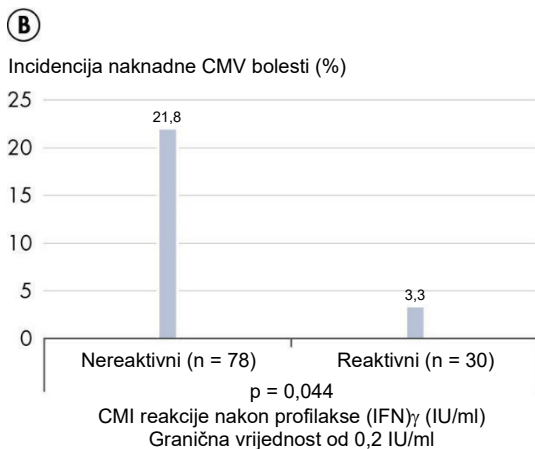
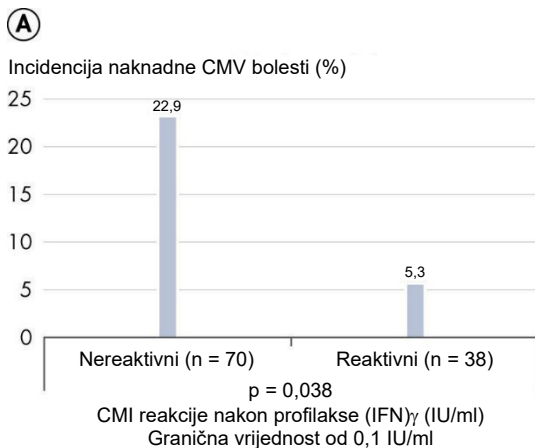
Razine slaganja u procjenama osjetljivosti provedenima na primateljima čvrstih organa (1 – 8), primateljima hematopoetskih matičnih stanica (9, 10) i pacijentima zaraženima virusom HIV-a (11) bile su niže, što je možda uzrokovano lažno pozitivnom CMV serologijom, nedostatkom reaktivnih HLA tipova među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

Ispitivanja koja ističu kliničku korisnost

Namjena serološkog testa na CMV IgG, kao i ispitivanja QF-CMV, opisana je kao omogućivanje otkrivanja imunosti na CMV. U slučaju transplantacije, CMV serologija upotrebljava se u velikoj mjeri prije transplantacije da bi se utvrdio rizik u primatelja od komplikacija CMV-a 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 rizik od razvoja simptomatske infekcije CMV-om 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 reaktivnim rezultatom za QF-CMV 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 nereaktivan rezultat za QF-CMV (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 nereaktivan rezultat nakon profilakse. Podaci preuzeti iz Kumar et al. (4).

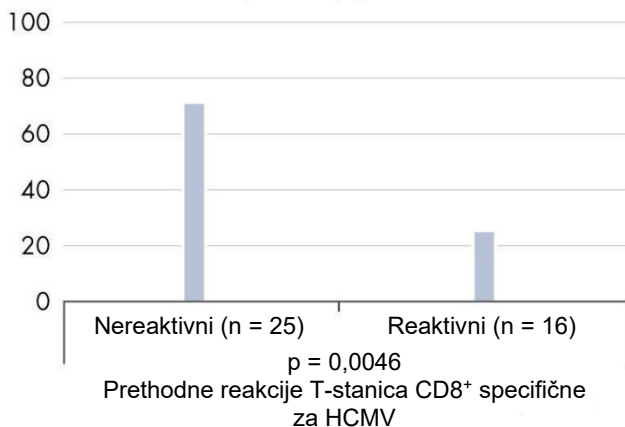
Osim toga, CMV seronegativni primatelji organa od CMV pozitivnog davatelja (D+P-) s reaktivnim rezultatom ispitivanja QF-CMV po dovršetku profilakse češće i duže nisu imali CMV bolest, što znači da se QF-CMV može upotrebljavati za prepoznavanje rizika od kasnijeg razvoja CMV bolesti.

Ovim je ispitivanjem također istaknuto da je u ovoj skupini pacijenata podvrgnutih transplantaciji s najvećim rizikom od razvoja CMV bolesti (D+/P-) reaktivni rezultat bilo kada nakon profilakse bio povezan s većom vjerojatnošću da ne dobiju ponovno CMV bolest.

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

Ispitivanjem provedenim na 67 primatelja transplantata pluća, u kojem su procjenjivane epizode CMV viremije nakon transplantacije (7), uočeno je da je 18/25 (72 %) epizoda CMV viremije prethodio nereaktivan rezultat za QF-CMV, za razliku od 4/16 (25 %) epizoda kojima je prethodio reaktivni odgovor na QF-CMV (Fisherov egzaktni test, $p = 0,0046$; Slika 6).

Epizode HCMV DNAemije s virusnim opterećenjem > 1000 kopija/ml (%)



Slika 6. Statistička analiza reakcija T-stanica CD8⁺ specifičnih za CMV koje su otkrivene ispitivanjem QuantiFERON-CMV i razvoja CMV viremije (Fisherov egzaktni 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 reaktivnim rezultatom za QF-CMV (s graničnom vrijednošću testa od 0,1 IU/ml) u bilo kojem trenutku nakon dovršetka anti-CMV profilakse imali su značajno manji broj kasnijih pojava bolesti 12 mjeseci nakon transplantacije (6,4 %), u usporedbi s onima koji su imali nereaktivni rezultat za QF-CMV (22,2 %) i neodređen rezultat (58,3 %, p < 0,001). Prilikom klasifikacije neodređenih rezultata kao „nereaktivnih” incidencija naknadne CMV bolesti bila je 6,4 % u odnosu na 26,8 %, p = 0,024. Pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti ispitivanja 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). Tim je ispitivanjem utvrđeno da QF-CMV može biti koristan za predviđanje niske, srednje ili visoke razine rizika u pacijenata od razvoja CMV bolesti nakon profilakse.

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

Ovim je ispitivanjem otkriveno da su primatelji s nereaktivnom reakcijom na QF-CMV prije transplantacije koji su primili organ od CMV seropozitivnog davatelja imali deset puta veći rizik od replikacije CMV-a u usporedbi s primateljima s reaktivnom reakcijom na QF-CMV prije transplantacije (prilagođeni OR 10,49, 95 % CI 1,88 – 58,46). Stoga ispitivanje QF-CMV prije transplantacije može biti korisno u predviđanju rizika od replikacije CMV-a nakon transplantacije i tako omogućiti individualizaciju liječenja CMV infekcije nakon transplantacije čvrstih organa.

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

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 panel stručnjaka za CMV i transplantaciju čvrstih organa, a sazvao ga je Odjel za zarazne bolesti Društva za transplantaciju, predstavljaju smjernice o liječenju CMV-a temeljene na dokazima i mišljenjima stručnjaka, uključujući dijagnostiku, imunologiju, prevenciju i liječenje.

Zaključak je tih smjernica da se „imunološkim praćenjem T-staničnih reakcija specifičnih za CMV može predvidjeti u kojih osoba postoji rizik od CMV bolesti nakon transplantacije i da ono može biti korisno u usmjeravanju profilakse i preventivnih terapija” (12).

Nadalje, smjernice pružaju i preporuke za attribute idealnog ispitivanja za praćenje imuniteta, što uključuje sljedeće:

- mogućnost procjene količine i funkcije T-stanica CD4⁺ i CD8⁺ primatelja transplantata
- mogućnost mjerenja IFN- γ
- jednostavno izvođenje, povoljno i ponovljivo
- brzo vrijeme provođenja
- mogućnost jednostavnog slanja ispitaka u specijalizirane laboratorije.

QF-CMV ispunjava gotovo sve kriterije koji su navedeni u ovim smjernicama i predstavlja jedino standardizirano ispitivanje za praćenje imuniteta koje može otkriti IFN- γ , specifičan za CMV.

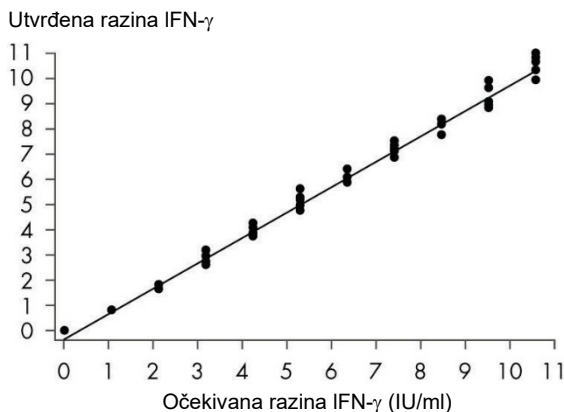
Radne značajke ispitivanja

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

Heterofilna (npr. humana anti-mišja) protutijela u serumu ili plazmi određenih osoba mogu uzrokovati smetnje u imunoispitivanjima. Djelovanje heterofilnih protutijela u ispitivanju QF-CMV ELISA umanjeno je dodavanjem običnog mišjeg seruma u diluens Green Diluent i upotrebom fragmenata F(ab')₂ monoklonskog protutijela kao protutijela za hvatanje IFN- γ koje je nanoseno na jažice na mikrotitar pločicama.

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

Linearnost ispitivanja QF-CMV ELISA dokazana je nasumičnim postavljanjem pet replika 11 skupnih uzoraka plazme poznatih koncentracija IFN- γ na pločicu ELISA. Pravac linearne regresije ima nagib od $1,002 \pm 0,011$ i koeficijent korelacije od 0,99 (Slika 7).



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

Obnovljivost ispitivanja 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 ispitivanja. Jedan je uzorak bio Nil 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 %-tni CI 0,31 – 0,34) do 7,7 IU/ml (95 % CI 7,48 – 7,92).

Nepreciznost unutar analize ili unutar ispitivanja procijenjena je određivanjem prosjeka %CV-a za svaku testnu plazmu koja sadržava IFN- γ iz analize svake pločice ($n = 9$) s rasponom od 4,1 do 9,1 %CV. Prosjek tijekom rada %CV (± 95 % CI) bio je 6,6 % $\pm$ 0,6 %. Nulti IFN- γ u plazmi u prosjeku je iznosio 14,1 %CV.

Ukupna nepreciznost ili nepreciznost između ispitivanja utvrđena je usporedbom 27 izračunatih koncentracija IFN- γ za svaki uzorak plazme i imala je raspon od 6,6 do 12,3 %CV. Opći prosjek %CV (± 95 % CI) bio je 8,7 % $\pm$ 0,7 %. Nulti IFN- γ u plazmi dao je vrijednost 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 pločica ELISA.

Ako se sumnja na tehnički problem prilikom uzimanja krvi ili rukovanja uzorcima, ponovite cijeli test QF-CMV s novim ispitcima 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 kojeg mogućeg problema. 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 priloženim uputama u pakiranju proizvoda QF-CMV ELISA Package Insert. |
| b) Pogreška u pipetiranju | Provjerite jesu li pipete kalibrirane i upotrijebljene točno prema uputama proizvođača. |
| c) Preniska temperatura inkubacije | Inkubaciju za test ELISA treba provoditi na sobnoj temperaturi ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). |
| d) Prekratko vrijeme inkubacije | Inkubacija pločice s konjugatom, standardima i uzorcima treba trajati 120 ± 5 minuta. Otopina enzimskog supstrata inkubira se na pločici 30 minuta. |
| e) Upotrijebljen je pogrešan filter za čitač pločica | Pločicu treba očitavati na 450 nm s referentnim filtrom između 620 i 650 nm. |
| f) Reagensi su prehladni | Svi reagensi, osim 100x koncentriranog konjugata, moraju postići sobnu temperaturu prije početka ispitivanja. To traje oko 1 sat. |
| g) Vijek trajanja kompleta/komponenti je istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca od datuma rekonstitucije. |

Nespecifična boja reakcije

- | | |
|--|---|
| a) Nepotpuno ispiranje pločice | Pločicu operite najmanje šest puta s 400 μl pufera za ispiranje po jažici. 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 jažica za test ELISA | Pažljivo pipetirajte i miješajte uzorak da biste smanjili rizik. |
| c) Vijek trajanja kompleta/komponenti je istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca od datuma rekonstitucije. |

Komentari i prijedlozi

- | | | |
|----|---|--|
| d) | Otopina enzimskog supstrata je kontaminirana | Bacite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Pobrinite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici. |
| e) | Miješanje plazme u epruvetama za centrifugiranje prije prikupljanja | Osigurajte da se uzorci plazme pažljivo prikupljaju iznad gela bez pipetiranja gore i dolje, pazeći da ne poremetite materijal na površini gela. |

Jaka obojenost pozadine

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Nepotpuno ispiranje pločice | Pločicu operite najmanje šest puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici. 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 test ELISA treba provoditi na sobnoj temperaturi (22 °C ± 5 °C). |
| c) | Vijek trajanja kompleta/komponenti je istekao | Pobrinite se da upotrijebite komplet prije isteka roka trajanja. Rekonstituirani standard i 100x koncentrirani konjugat svakako potrošite u roku od 3 mjeseca od datuma rekonstitucije. |
| d) | Otopina enzimskog supstrata je kontaminirana | Bacite supstrat ako je poprimio plavkastu boju. Pobrinite se da se za reagense upotrebljavaju samo čisti spremnici. |

Nelinearna standardna krivulja i odstupanja između duplikata

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Nepotpuno ispiranje pločice | Pločicu operite najmanje šest puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici. 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 ovim uputama u pakiranju. |
| c) | Nedovoljno miješanje | Prije nego što ih dodate na pločicu, dobro promiješajte reagense okretanjem ili laganim kružnim mućkanjem. |
| d) | Nedosljedna tehnika pipetiranja ili prekid tijekom pripremanja ispitivanja | Uzorke i standarde treba dodavati kontinuirano. Svi reagensi trebaju biti pripremljeni prije početka ispitivanja. |

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

Literatura

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 dovoljno reagensa za <N> reakcija
	Upotrijebiti do
	Oznaka CE
	In vitro dijagnostički medicinski proizvod
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala
	Globalni broj trgovačke jedinice
	Ograničenje temperature
	Za jednokratnu uporabu
	Čuvajte podalje od sunčeve svjetlosti
	Pogledajte upute za uporabu
	Proizvođač
	Ovlašteni predstavnik u Europskoj zajednici

Podaci za kontakt

Za tehničku pomoć i više informacija posjetite naš Centar za tehničku podršku 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 web-mjesto **www.qiagen.com**).

Skraćeni testni postupak ELISA

Faza 1: Inkubacija krvi

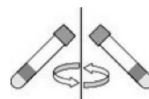
1. Uzmite krv od pacijenta u epruvete za uzimanje krvi i promiješajte je tako da protresete uzorke deset (10) puta onoliko jako koliko je potrebno kako bi se cijela unutarnja površina epruveta prekrila krvlju i kako bi se rastopili antigeni na stijenkama epruvete.



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



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



4. Nakon centrifugiranja nemojte pipetirati prema gore ili prema dolje niti bilo kako miješati plazmu prije izdvajanja. 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) standardna razrjeđivanja.



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

4. Pripremite konjugat spreman za upotrebu s pomoću diluensa Green Diluent i dodajte 50 µl u svaku jažicu.



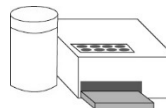
5. Dodajte 50 µl testnog uzorka plazme i 50 µl standarda u odgovarajuće jažice. Izmiješajte tresilicom.



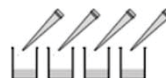
6. Inkubirajte 120 minuta na sobnoj temperaturi.



7. Isperite jažice najmanje 6 puta s 400 µl pufera za ispiranje po jažici.



8. Dodajte 100 µl otopine enzimskog supstrata u svaku jažicu. Izmiješajte tresilicom.



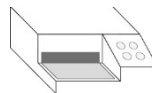
9. Inkubirajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.



10. Dodajte 50 μ l enzimske otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu. Izmiješajte 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-R06	Materijali koji su potrebni, ali nisu isporučeni, dodani poklopci za pločicu, stranica 9.	Listopad 2019.

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom

Ova stranica namjerno je ostavljena praznom

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

Ugovor o ograničenoj licenciji za QuantiFERON-CMV ELISA

Uporabom 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 uporabu s komponentama koje su sadržane na panelu. Tvrtka QIAGEN ne daje nikakvu licenciju za svoje intelektualno vlasništvo za uporabu ili ugrađivanje komponenata ovog panela s bilo kojom komponentom koja nije sadržana u ovom panelu, osim kako je opisano u protokolima koji su isporučeni s proizvodom, koji se nalaze u ovom priručniku i drugim protokolima dostupnima na web-mjestu www.qiagen.com. Neke od tih dodatnih protokola korisnici proizvoda tvrtke QIAGEN omogućili su drugim korisnicima proizvoda tvrtke QIAGEN. Tvrtka QIAGEN nije temeljito ispitala niti optimizirala te protokole. Tvrtka QIAGEN za njih ne daje nikakva jamstva niti jamči da ne krše prava trećih strana.
2. Osim izričito navedenih licencija, tvrtka QIAGEN ne jamči da ovaj panel i/ili njegova uporaba ne krši prava trećih strana.
3. Ovaj panel i njegove komponente licencirani su samo za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno upotrebljavati, prerađivati niti preprodavati.
4. Tvrtka QIAGEN odriče se svih drugih licencija, izričitih ili impliciranih, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik ovog panela potvrđuju da neće poduzeti niti dopustiti drugim osobama da poduzmu korake koji bi mogli dovesti do kršenja gore navedenih odredbi ili omogućiti njihovo kršenje. Tvrtka 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 panelom i/ili njegovim komponentama.

Za ažurirane uvjete licencije pogledajte web-mjesto www.qiagen.com.

© 2019 QIAGEN, sva prava pridržana.

