

cobas[®] EBV

**Kiekybinis nukleorūgščių tyrimas,
atliekamas su cobas[®] 6800/8800 Systems**

*Skirtas **in vitro** diagnostikai*

cobas[®] EBV	P/N: 08688206190
cobas[®] EBV/BKV Control Kit	P/N: 08688214190
cobas[®] Buffer Negative Control Kit	P/N: 07002238190

Turinys

Numatytasis naudojimas	4
Tyrimo santrauka ir paaiškinimas.....	4
Reagentai ir medžiagos	7
cobas® EBV reagentai ir kontrolės.....	7
cobas omni reagentai mėginiams paruošti.....	10
Reagentų laikymo ir naudojimo reikalavimai.....	11
Papildomos reikalingos medžiagos	12
Reikalingi instrumentai ir programinė įranga.....	12
Atsargumo priemonės ir naudojimo reikalavimai	13
Perspėjimai ir atsargumo priemonės.....	13
Reagentų naudojimas.....	13
Gera laboratorinė praktika	14
Mėginių ėmimas, transportavimas ir laikymas	14
Mėginiai.....	14
Naudojimo instrukcijos.....	16
Procedūros pastabos	16
cobas® EBV tyrimo atlikimas	16
Rezultatai	17
Kokybės kontrolė ir rezultatų patikimumas.....	17
Rezultatų aiškinimas.....	18
Procedūros apribojimai.....	18

Neklinikinis našumo įvertinimas.....	19
Pagrindinės tyrimo savybės	19
Aptikimo riba (LoD).....	19
Linijinis intervalas	20
Tikslumas (laboratoriniai duomenys)	21
Genotipo tikrinimas	21
Specifiškumas	21
Analitinis specifiškumas.....	22
Analitinis specifiškumas – interferuojančios medžiagos	22
Metodų koreliacija	23
Visos sistemos klaidų koeficientas	24
Kryžminis užteršimas	24
Papildoma informacija	25
Pagrindinės tyrimo ypatybės	25
Simboliai	26
Gamintojas ir platintojai	27
Prekių ženklai ir patentai	27
A autorių teisės.....	27
Šaltinių sąrašas	28
Dokumento leidimas.....	30

Numatytasis naudojimas

cobas® EBV yra *in vitro* nukleorūgščių amplifikacijos tyrimas Epšteino–Baro viruso (EBV) DNR kiekiui nustatyti žmogaus EDTA plazmoje.

cobas® EBV tyrimas yra skirtas naudoti kaip pagalbinė priemonė diagnozuojant ir gydant EBV transplantato recipientams. Pacientams, kuriems stebimas EBV kiekis, galima atlikti DNR matavimų sekas ir išsiaiškinti, ar reikia keisti jų gydymą ir įvertinti viruso reakciją į gydymą.

cobas® EBV rezultatai turi būti aiškinami atsižvelgiant į visus svarbius klinikinius ir laboratorinius duomenis.

Tyrimo santrauka ir paaiškinimas

Kontekstas

Transplantato recipientams kyla didesnė daugybės virusinių ir bakterinių infekcijų rizika, dėl kurių didesnė neigiamų pasekmių sveikatai tikimybė, palyginti su bendrąja sveikų žmonių populiacija. Ši padidėjusi rizika iš dalies siejama su imuninės sistemos funkcija, susilpnėjusia dėl imunitetą slopinančių vaistų, kuriuos vartoja pacientai po transplantacijos, kad sumažėtų transplantato atmetimo tikimybė.^{1,2}

EBV priklauso pūslelinės virusų grupei. Tai dviejų grandinių deoksiribonukleorūgšties (DNR) virusas su apvalkalėliu (~172 kb). Pagal EBNA-2 geno skirtumus buvo nustatyti du pagrindiniai EBV genotipai – 1 tipo ir 2 tipo. EBV infekcijos žmonėms yra gana įprastos – infekuoti yra daugiau kaip 90 % žmonių; latentinė infekcija išlieka visą gyvenimą. EBV sukelia infekcinę mononukleozę naujai užsikrėtusių paauglių ir suaugusiųjų pogrupyje ir yra siejamas su keliais vėžio tipais, įskaitant nosiaryklės karcinomą, Berkito limfomą ir Hodžkino limfomą. EBV gali sukelti limfoproliferacinių susirgimų žmonėms su įgimtu arba įgytu imunodeficitu, įskaitant transplantato recipientus ir pacientus, užsikrėtusius žmogaus imunodeficitu virusu / turinčius imunodeficitą sindromą (ŽIV / AIDS).³

Transplantato recipientams EBV susirgimus gali sukelti arba reaktyvuodamas latentinį virusą iš atminties B ląstelių, arba per naują pirminę infekciją, ypač EBV neigiamiems pacientams, kuriems buvo transplantuotas transplantatas iš EBV teigiamų donorų.³ Šiems pacientams sunkiausia su EBV susijusio susirgimo forma yra po transplantavimo pasireiškiantis limfoproliferacinis sutrikimas (PTLS), kurį sukelia nekontroliuojamas limfocitų, paprastai B ląstelių, dauginimasis.⁴ Paprastai > 70 % PTLS atvejų tarp transplantato recipientų yra siejami su EBV infekcija. Didžiausia PTLS rizika yra pirmaisiais metais po transplantavimo; > 90 % PTLS atvejų, pasireiškusių per tą laikotarpį, yra siejami su EBV. Iki 20 % PTLS atvejų, pasireiškusių po pirmųjų metų po transplantavimo, būna EBV neigiami.^{4,5}

Ankstyvos PTLS pradžios rizikos veiksniai, be kita ko, yra EBV neigiamų pacientų serologiniai žymenys transplantavimo metu, jaunesnis amžius, limfocitų kiekį mažinančių antikūnų poveikis ir persodinamo organo tipas.^{5,6}

Ankstyvas pirminės EBV infekcijos nustatymas ir DNR lygio stebėjimas gali padėti laiku pradėti gydymą ir užkirsti kelią su EBV susijusiems susirgimams progresuoti. Rekomenduojamas reguliarus EBV stebėjimas atliekant kiekybinius nukleorūgščių tyrimus (NAT), ypač transplantato recipientų, kurių EBV neigiamas, ir didelės rizikos pacientų.^{4,5} Nors dėl įvairių tyrimų rezultatų skirtumų tiksliai, medicinškai reikšminga viruso kiekio slenkstinė reikšmė vis dar yra diskusijų klausimas, kritinės slenkstinės reikšmės sąvoka atrodo patikima, o pacientų stebėjimo tyrimai parodė, kad aukštesnis EBV DNR lygis yra susijęs su didesne EBV ir PTLS rizika.^{4,5,7} EBV tyrimams buvo naudojami ir plazmos, ir neapdoroto kraujo mėginiai, tačiau iš įrodymų matyti, kad plazma yra tinkamesnė PTLS aptikti.^{4,5,7,8}

Įprasta terapinė intervencija, siekiant sumažinti EBV DNR kiekį ir užkirsti kelią PTLS pradžiai, yra imuninę sistemą slopinančių vaistų dozės mažinimas ir gydymas B ląstelių skaičių mažinančiais antikūnais.⁷ Prevencinis gydymas, kuriuo mažinamas EBV DNR kiekis, būna sėkmingas daugumai pacientų, nors iki 20 % pacientų vis tiek gali išsivystyti PTLS, ypač tiems, po kurių transplantacijos praėjo daugiau nei vieni metai.⁷

Dauguma laboratorinių EBV kiekybinių tyrimų nėra standartizuoti, todėl skirtingų laboratorijų ir skirtingomis priemonėmis atliktų DNR kiekio tyrimų rezultatai skiriasi, o tai neleidžia palyginti DNR kiekio, gauto skirtingose

laboratorijose ir atliekant skirtingus tyrimus.⁷ Šiai problemai spręsti PSO sukūrė EBV kiekybinio tyrimo tarptautinį standartą, pagal kurį standartizuotų tyrimų rezultatai pateikiami TV/ml.⁹ Siekiant užtikrinti nuoseklius rezultatus, nepriklausomai nuo to, kurioje laboratorijoje tyrimas buvo atliktas, kurie leistų patobulinti klinikinę pacientų, kuriems padidėjusi rizika susirgti su EBV susijusiomis ligomis ir PTLs, priežiūrą, būtinas formalus EBV DNR kiekio nustatymo atkartojamumo ir patikimumo vertinimas.

NAT tyrimų pagrindas

Prieš transplantavimą atliekami donoro ir recipiento EBV serologiniai tyrimai, kad būtų nustatyta transplantato recipiento su EBV susijusių komplikacijų rizika, tačiau serologiniai tyrimai nėra pakankamai jautrūs ar tikslūs pacientams stebėti po transplantavimo. EBV pasėlio tyrimas labai lėtas, be to, šiomis aplinkybėmis jo labai žema prognostinė vertė. Tiesioginis EBV DNR aptikimas realaus laiko PGR metodu gali pasiūlyti platų dinaminį diapazoną, tikslumą ir didelį jautrumą bei specifiškumą.

Tyrimo paaiškinimas

cobas® EBV – tai kiekybinis tyrimas, atliekamas su **cobas® 6800 System** ir **cobas® 8800 System**. **cobas® EBV** suteikia galimybę aptikti ir kiekybiškai įvertinti EBV DNR užsikrėtusių pacientų EDTA plazmoje. Virusų kiekis kiekybiškai nustatomas lyginant su ne EBV DNR kiekybiniu standartu (DNA-QS), kuris mėginių apdorojimo metu įvedamas į kiekvieną mėginį. DNA-QS veikia kaip vidinė kontrolė, skirta stebėti visam mėginio paruošimo ir PGR amplifikacijos procesui. Papildomai tyrime naudojamos trys išorinės kontrolės: teigiama didelio titro, teigiama mažo titro ir neigiama kontrolė.

Procedūros principai

cobas® EBV tyrimas pagrįstas visiškai automatizuotu mėginių paruošimu (nukleorūgščių išgavimu ir išgryninimu), po kurio atliekama PGR amplifikacija ir aptikimas. **cobas® 6800/8800** sistemos sudaro mėginių tiekimo modulis, perkėlimo modulis, apdorojimo modulis ir analizės modulis. **cobas® 6800/8800** programinė įranga atlieka automatizuotą duomenų valdymą, kurio metu visiems tyrimams priskiriami tyrimo rezultatai: „target not detected“ (neaptikta), „EBV DNA detected < LLoQ“ (EBV DNR aptikta < apatinės kiekybinės ribos), „EBV DNA detected > ULoQ“ (EBV DNR aptikta > viršutinės kiekybinės ribos) arba nurodant reikšmę $LLoQ < x < ULoQ$ linijiniame intervale. Rezultatus galima tiesiogiai peržiūrėti sistemos ekrane, eksportuoti arba išspausdinti kaip ataskaitą.

Nukleorūgštis iš paciento mėginių ir pridėtų lambda DNA-QS molekulių išgaunama vienu metu. Apibendrinant virusų nukleorūgštis išskiriama į mėginį pridėjus proteinazės ir lizės reagento. Išlaisvintos nukleorūgštys prisijungia prie magnetinių stiklo dalelių silicio dioksido paviršiaus. Vėlesniame etape plovimo reagentais pašalinamos neprisijungusios medžiagos ir nešvarumai, pvz., denatūruoti baltymai, ląstelių liekanos ir galimi PGR inhibitoriai, o nuo stiklo dalelių aukštoje temperatūroje išplovimo buferiniu tirpalu nuplaunamos išgrynintos nukleorūgštys.

Atrankinė tiriamosios nukleorūgšties iš mėginio amplifikacija atliekama tiriant konkretaus viruso iš itin konservatyvių EBV regionų, esančių EBV EBNA-1 gene ir EBV BMRF gene, dvigubą taikinį. Atrankinė DNA-QS amplifikacija atliekama naudojant sekai būdingus tiesioginius ir atvirkštinius pradmenis, kurie parenkami taip, kad neturėtų homologijų su EBV genomu. Amplifikacijai naudojamas aukštai temperatūrai atsparus DNR polimerazės fermentas. Tiriamos ir DNA-QS sekos amplifikuojamos vienu metu, naudojant universalų PGR amplifikavimo protokolą su iš anksto apibrėžtais temperatūros etapais bei ciklų skaičiumi. Į pagrindinį mišinį įeina deoksiridino trifosfatas (dUTP), o ne deoksitimidino trifosfatas (dTTP), kuris inkorporuojamas į naujai susintetintą DNR (amplifikacijos produktą).¹⁰⁻¹² AmpErase fermentas, įdėtas į PGR mišinį pirmojo terminio ciklo metu, pašalina bet kokius užteršiančius ankstesnių PGR procesų amplifikacijos produktus. Tačiau nauji susiformavę amplifikacijos produktai nepašalinami, kadangi AmpErase fermentas tampa neaktyvus aukštesnėje nei 55 °C temperatūroje.

cobas® EBV pagrindiniame mišinyje yra du aptikimo zondai būdingi EBV tiriamoms sekoms ir vienas – DNA-QS. Zondai pažymėti tiriamajai sričiai specifiniais fluorescenciniais signaliniais dažikliais, leidžiančiais vienu metu aptikti EBV taikinį ir DNA-QS dviejuose skirtinguose tiriamuosiuose kanaluose.^{13, 14} Nepažeistų zondu fluorescencinį signalą slopina slopinamasis dažiklis. Vykstant PGR amplifikacijai, zondas prisijungia prie specifinių viengrandės DNR taikinių

ir suskaidomas dėl DNR polimerazės 5'–3' nukleazinio aktyvumo, todėl slopiklis atskiriamas nuo signalinio dažiklio ir sugeneruojamas fluorescencinis signalas. Su kiekvienu PGR ciklu sukuriami vis daugiau suskaidytų zonų ir stiprėja kaupiamasis signalinio dažiklio signalas. PGR produktai aptinkami ir atskiriami realiuoju laiku išmatuojant atpalaiduotų virusų taikinių ir DNA-QS signalinių dažomųjų medžiagų fluorescenciją.

Reagentai ir medžiagos

cobas® EBV reagentai ir kontrolės

Visi neatidaryti reagentai ir kontrolinės medžiagos turi būti laikomi, kaip rekomenduojama 1 lentelėje – 4 lentelėje.

1 lentelė. cobas® EBV

cobas® EBV Laikyti 2–8 °C temperatūroje 192 tyrimų kasetė (P/N 08688206190)		
Rinkinio komponentai	Reagentų sudėtis	Kiekis rinkinyje 192 tyrimų
Proteinazės tirpalas (PASE)	Tris buferinis tirpalas, < 0,05 % EDTA, kalcio chloridas, kalcio acetatas, 8 % proteinazė EUH210: Saugos duomenų lapą galima gauti paprašius. EUH208: Sudėtyje yra subtilizino. Gali sukelti alerginę reakciją.	22,3 ml
DNR kiekybinis standartas (DNA QS)	Tris buferinis tirpalas, < 0,05 % EDTA, < 0,001 % ne EBV kilmės DNR konstruktas su ne EBV pradmens jungties sekomis ir unikalia zondo jungties vieta (neinfekcinė DNR), < 0,002 % poli-rA RNR (sintetinė), < 0,1 % natrio azidas	21,2 ml
Eliucijos buferinis tirpalas (EB)	Tris buferinis tirpalas, 0,2 % metil-4 hidroksibenzoatas	21,2 ml
Pagrindinio mišinio 1 reagentas (MMX-R1)	Mangano acetatas, kalio hidroksidas, < 0,1 % natrio azidas	7,5 ml
EBV pagrindinio mišinio 2 reagentas (EBV MMX-R2)	Tricino buferis, kalio acetatas, < 18 % dimetilsulfoksidas, glicerolis, < 0,1 % Tween 20, EDTA, < 0,12 % dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,01% pirmesni ir paskesni EBV pradmenys, < 0,01 % kiekybinio standarto tiesioginiai ir atvirkštiniai pradmenys, < 0,01 % fluorescenciškai pažymėti oligonukleotidų zondai, specifiniai EBV ir EBV kiekybiniam standartui, < 0,01 % oligonukleotidinis aptameras, < 0,1 % Z05D DNR polimerazė, < 0,10 % fermentas AmpErase (uracil-N-glikozilazė) (mikrobinis), < 0,1 % natrio azidas	9,7 ml

2 lentelė. cobas® EBV/BKV Control Kit**cobas® EBV/BKV Control Kit**

Laikyti 2–8 °C temperatūroje

(P/N 08688214190)

Rinkinio komponentai	Reagentų sudėtis	Kiekis rinkinyje	Saugos simbolis ir įspėjimas*
EBV/BKV silpnai teigiama kontrolė (EBV/BKV L(+))C	< 0,001 % sintetinė (plazmidės) EBV DNR, įkapsuliuota lambda bakteriofago dangos baltyme, įprasta žmogaus kraujo plazma, EBV DNR, neaptinkama PGR metodais 0,1 % ProClin® 300 konservantas**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  ATSARGIAI H317: Gali sukelti alerginę odos reakciją. P261: Stengtis neįkvėpti dulkių / dūmų / dujų / rūko / garų / aerozolio. P272: Užterštų darbo drabužių negalima išnešti iš darbo vietos. P280: Mūvėti apsaugines pirštines. P333 + P313: Jeigu sudirginama oda arba ją išberia: kreiptis į gydytoją. P362 + P364: Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl apsivelkant. P501: Turinį / talpyklą išpilti (išmesti) patvirtintoje atliekų šalinimo įmonėje. 55965-84-9 Reakcijos masė: 5-chloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onas [EB nr. 247-500-7] ir 2-metil-2H-izotiazol-3-onas [EB nr. 220-239-6] (3:1).
EBV/BKV stipriai teigiama kontrolė (EBV/BKV H(+))C	< 0,001 % sintetinė (plazmidės) EBV DNR, įkapsuliuota lambda bakteriofago dangos baltyme, įprasta žmogaus kraujo plazma, EBV DNR, neaptinkama PGR metodais 0,1 % ProClin® 300 konservantas**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  ATSARGIAI H317: Gali sukelti alerginę odos reakciją. P261: Stengtis neįkvėpti dulkių / dūmų / dujų / rūko / garų / aerozolio. P272: Užterštų darbo drabužių negalima išnešti iš darbo vietos. P280: Mūvėti apsaugines pirštines. P333 + P313: Jeigu sudirginama oda arba ją išberia: kreiptis į gydytoją. P362 + P364: Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl apsivelkant. P501: Turinį / talpyklą išpilti (išmesti) patvirtintoje atliekų šalinimo įmonėje. 55965-84-9 Reakcijos masė: 5-chloro-2-metil-4-izotiazolin-3-onas [EB nr. 247-500-7] ir 2-metil-2H-izotiazol-3-onas [EB nr. 220-239-6] (3:1).

* Produkto saugos žymėjimas atliekamas vadovaujantis ES GHS gairėmis.

** Pavojinga medžiaga.

3 lentelė. cobas® Buffer Negative Control Kit**cobas® Buffer Negative Control Kit**

Laikyti 2–8 °C temperatūroje
(P/N 07002238190)

Rinkinio komponentai	Reagentų sudėtis	Kiekis rinkinyje
cobas® buferio neigiama kontrolė (BUF (-) C)	Tris buferinis tirpalas, < 0,1 % natrio azidas, EDTA, < 0,002 % poli rA RNR (sintetinė)	16 ml (16 × 1 ml)

cobas omni reagentai mėginiams paruošti

4 lentelė. cobas omni reagentai mėginiams paruošti*

Reagentai	Reagentų sudėtis	Kiekis rinkinyje	Saugos simbolis ir įspėjimas**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Laikyti 2–8 °C temperatūroje (P/N 06997546190)	Magnetinės stiklo dalelės, Tris buferinis tirpalas, 0,1 % metil-4 hidroksibenzoatas, < 0,1 % natrio azidas	480 tyrimų	Netaikoma
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Laikyti 2–8 °C temperatūroje (P/N 06997511190)	Tris buferinis tirpalas, 0,1 % metil-4-hidroksibenzoatas, < 0,1 % natrio azidas	4 × 875 ml	Netaikoma
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Laikyti 2–8 °C temperatūroje (P/N 06997538190)	43 % (masė / masė) guanidino tiocianatas***, 5 % (masė / tūris) polidokanolis***, 2 % (masė / tūris) ditiotreitolis***, natrio citrato dihidratas	4 × 875 ml	  PAVOJINGA H302 + H332: Kenksminga prarijus arba įkvėpus. H314: Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis. H412: Kenksminga vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus. EUH032: Kontaktuojama su rūgštimis išskiria labai toksiškas dujas. P261: Stengtis neįkvėpti dulkių / dūmų / dujų / rūko / garų / aerozolio. P273: Saugoti, kad nepatektų į aplinką. P280: Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones. P303 + P361 + P353: PATEKUS ANT ODOS (arba plaukų): nusivilkite visus užterštus drabužius. Nuplaukite odą vandeniu. P304 + P340 + P310: ĮKVĖPUS: išnešti nukentėjusįjį į gryną orą; jam būtina patogi padėtis, leidžianti laisvai kvėpuoti. Nedelsiant skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ / kreiptis į gydytoją. P305 + P351 + P338 + P310: PATEKUS Į AKIS: kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Nedelsiant skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ / kreiptis į gydytoją. 593-84-0 Guanidino tiocianatas 9002-92-0 Polidokanolis 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutanas-2,3-diolis
cobas omni Wash Reagent (WASH) Laikyti 15–30 °C temperatūroje (P/N 06997503190)	Natrio citrato dihidratas, 0,1 % metil-4-hidroksibenzoatas	4,2 l	Netaikoma

* Šie reagentai neįeina į cobas® EBV tyrimų rinkinį. Žr. papildomų reikalingų medžiagų sąrašą (7 lentelė).

** Produkto saugos žymėjimas atliekamas vadovaujantis ES GHS gairėmis.

*** Pavojaus medžiaga.

Reagentų laikymo ir naudojimo reikalavimai

Reagentai turi būti laikomi ir naudojami, kaip nurodyta 5 lentelėje ir 6 lentelėje.

Kai reagentai neįkelti į **cobas®** 6800/8800 sistemas, juos laikykite atitinkamoje temperatūroje, nurodytoje 5 lentelėje.

5 lentelė. Reagentų laikymas (kai reagentas nėra sistemoje)

Reagentai	Laikymo temperatūra
cobas® EBV – 192	2–8 °C
cobas® EBV/BKV Control Kit	2–8 °C
cobas® Buffer Negative Control Kit	2–8 °C
cobas omni Lysis Reagent	2–8 °C
cobas omni MGP Reagent	2–8 °C
cobas omni Specimen Diluent	2–8 °C
cobas omni Wash Reagent	15–30 °C

Į **cobas®** 6800/8800 sistemas įkelti reagentai laikomi tinkamoje temperatūroje, o jų galiojimo laiką stebi sistema. **cobas®** 6800/8800 sistemos leidžia naudoti reagentus, tik jei laikomasi visų 6 lentelėje nurodytų sąlygų. Sistema automatiškai neleidžia naudoti nebegaliojančių reagentų. 6 lentelė padeda naudotojui suprasti reagentų naudojimo sąlygas, taikomas **cobas®** 6800/8800 sistemoms.

6 lentelė. Reagentų galiojimo sąlygos, taikomos **cobas®** 6800/8800 sistemų

Reagentai	Rinkinio galiojimo laiko pabaiga	Atidaryto rinkinio stabilumas	Tyrimo atlikimų skaičius, kiek kartų galima naudoti šį rinkinį	Buvimo prietaiso viduje stabilumas (bendras buvimo prietaise (ne šaldytuve) laikas)
cobas® EBV – 192	Galiojimo laikas nepraėjo	90 dienų nuo pirmojo naudojimo	Daugiausia 40 tyrimo atlikimų	Daugiausia 40 val.
cobas® EBV/BKV Control Kit	Galiojimo laikas nepraėjo	Netaikoma ^a	Netaikoma	Daugiausia 8 val.
cobas® Buffer Negative Control Kit	Galiojimo laikas nepraėjo	Netaikoma ^a	Netaikoma	Daugiausia 10 val.
cobas omni Lysis Reagent	Galiojimo laikas nepraėjo	30 dienų nuo įkėlimo*	Netaikoma	Netaikoma
cobas omni MGP Reagent	Galiojimo laikas nepraėjo	30 dienų nuo įkėlimo*	Netaikoma	Netaikoma
cobas omni Specimen Diluent	Galiojimo laikas nepraėjo	30 dienų nuo įkėlimo*	Netaikoma	Netaikoma
cobas omni Wash Reagent	Galiojimo laikas nepraėjo	30 dienų nuo įkėlimo*	Netaikoma	Netaikoma

^a Vienkartinio naudojimo reagentai.

* Laikas matuojamas nuo pirmo karto, kai reagentas buvo įkeltas į **cobas®** 6800/8800 sistemas.

Papildomos reikalingos medžiagos

7 lentelė. Medžiagos ir reikmenys, skirti naudoti **cobas®** 6800/8800 sistemose

Medžiaga	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Kietųjų atliekų maišas	07435967001
Kietųjų atliekų maišas ir kietųjų atliekų konteineris arba	07435967001 ir 07094361001 arba
Kietųjų atliekų maišas su įdėklų ir rinkinio stalčius	08030073001 ir 08387281001
Kietųjų atliekų konteineris	07094361001
cobas omni antriniai mėgintuvėliai 13 × 75 (pasirinktinai)	06438776001

Reikalingi instrumentai ir programinė įranga

Instrumente (-uose) turi būti įdiegti **cobas®** 6800/8800 programinė įranga ir **cobas®** EBV analizės paketas. Instrument Gateway (IG) serveris bus pateiktas su sistema.

8 lentelė. Instrumentai

Įranga	P/N
cobas® 6800 System (judantis variantas)	06379672001
cobas® 6800 System (fiksotas variantas)	05524245001
cobas® 8800 System	05412722001
Mėginių tiekimo modulis	06301037001

Papildomos informacijos žr. **cobas®** 6800/8800 sistemų naudotojo pagalbinėje medžiagoje ir (arba) naudotojo vadove.

Pastaba: kreipkitės į vietinį Roche atstovą dėl išsamaus užsakymo sąrašo, kuriame nurodyti instrumente tinkami naudoti mėginių stoveliai, antgaliams su krešuliais skirti stoveliai ir stovelių dėklai.

Atsargumo priemonės ir naudojimo reikalavimai

Perspėjimai ir atsargumo priemonės

Kaip ir bet kuriam tyrimui, šiam tyrimui tinkamai atlikti reikalinga gera laboratorinė praktika. Dėl didelio šio tyrimo jautrumo reikia imtis atsargumo priemonių, kad nebūtų užteršti reagentai ir amplifikacijos mišiniai.

- Skirta tik *in vitro* diagnostikai.
- **cobas® EBV** nebuvo patvirtintas naudoti kaip atrankinis tyrimas EBV aptikti kraujyje arba kraujo produktuose.
- Su visais paciento mėginiais reikia elgtis kaip su užkrečiamais, taikant tinkamas laboratorines procedūras, aprašytas dokumente *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* ir CLSI dokumente M29-A4.^{15, 16} Šią procedūrą turi atlikti tik su užkrėstomis medžiagomis apmokyti elgtis ir **cobas® EBV** bei **cobas® 6800/8800** sistemomis apmokyti naudotis darbuotojai.
- Visas iš žmogaus išskirtas medžiagas reikia laikyti potencialiai užkrečiamomis, todėl reikia taikyti universaliąsias atsargumo priemones. Jei medžiaga išsipila, nedelsdami dezinfekuokite šviežiai paruoštu 0,5 % natrio hipochlorito tirpalu, sumaišytu su distiliuotu ar dejonizuotu vandeniu (buityje naudojamą baliklį atskiedę santykiu 1:10) arba vadovaukitės atitinkamomis vietinėmis procedūromis.
- **cobas® EBV/BKV** kontrolių rinkinyje yra iš žmogaus kraujo gauta plazma. PGR metodais buvo tiriama pirminė medžiaga ir buvo aptikti priimtini nedidelio EBV DNR lygio pėdsakai. Nėra žinomų tyrimo metodų, galinčių visiškai užtikrinti, kad produktai, išskirti iš žmogaus kraujo, neperduos infekcijos.
- **Neužšaldykite pirminiuose mėgintuvėliuose laikomų viso kraujo ar kitų mėginių.**
- Norėdami užtikrinti didžiausią tyrimo efektyvumą, naudokite tik pateikiamus arba nurodytus reikalingus reikmenis.
- Saugos duomenų lapus (SDS) galite gauti iš vietinio Roche atstovo.
- Kad tyrimas būtų atliktas tinkamai, kruopščiai atlikite procedūras ir laikykitės pateiktų rekomendacijų. Bet koks nukrypimas nuo procedūrų ir rekomendacijų gali turėti įtakos optimaliam tyrimo atlikimui.
- Jei naudojant ir apdorojant mėginius nebus imtasi apsaugos priemonių dėl mėginių kryžminio užteršimo, galima gauti klaidingai teigiamus rezultatus.
- Kadangi > 90 % suaugusiųjų yra nuolatiniai EBV nešiotojai, galintys platinti iki 10⁸ EBV kopijų/ml per savo seiles, atsižvelgiant į didelį tyrimo jautrumą laboratorijose svarbu imtis tinkamų užteršimo kontrolės priemonių.¹⁷

Reagentų naudojimas

- Visus reagentus, kontrolines medžiagas ir mėginius naudokite laikydamiesi geros laboratorinės praktikos, kad išvengtumėte mėginių ar kontrolinių medžiagų pernašos.
- Prieš naudodami apžiūrėkite kiekvieną reagentų kasetę, skiediklį, lizės reagentą ir plovimo reagentą, kad įsitikintumėte, jog nėra išsiliejimo požymių. Jei pastebėjote kokių nors skysčio išsiliejimo žymių, tos medžiagos tyrimams nenaudokite.
- Į **cobas omni** Lysis Reagent įeina guanidino tiocianatas – galimai pavojinga cheminė medžiaga. Stenkitės, kad šių reagentų nepatektų ant odos, į akis ar ant gleivinių. Jei medžiagų vis dėlto pateko, nedelsdami nuplaukite dideliu vandens kiekiu, nes to nepadarius gali atsirasti nudegimų.
- **cobas® EBV** tyrimų rinkiniuose, **cobas omni** MGP reagente ir **cobas omni** mėginio skiediklyje yra konservanto natrio azido. Stenkitės, kad šių reagentų nepatektų ant odos, į akis ar ant gleivinių. Jei medžiagų vis dėlto pateko, nedelsdami nuplaukite dideliu vandens kiekiu, nes to nepadarius gali atsirasti nudegimų. Išpylę kurį nors reagentą, prieš valydami sausu audiniu, pirmiausia praskieskite išsipykusį reagentą.
- Saugokitės, kad **cobas omni** Lysis Reagent, kuriame yra guanidino tiocianato, neturėtų sąlyčio su natrio hipochlorito (baliklio) tirpalu. Toks mišinys gali išskirti labai nuodingas dujas.
- Visas medžiagas, kurios lietsi su mėginiais ir reagentais, išmeskite pagal šalies ir vietinės taisykles.

Gera laboratorinė praktika

- Nepipetukite burna.
- Nevalgykite, negerkite ir nerūkykite nustatytoje darbo vietoje.
- Dirbdami su mėginiais ir reagentais, mūvėkite laboratorines pirštines bei apsirenkite specialiais laboratoriniais drabužiais ir naudokite apsauginius akinius. Tarp mėginių ir **cobas®** EBV rinkinių, EBV/BKV silpnai teigiamos kontrolės (EBV/BKV L(+)C), EBV/BKV stipriai teigiamos kontrolės (EBV/BKV H(+)C), **cobas®** buferinio tirpalo neigiamos kontrolės (eBUF (-) C) ir **cobas omni** reagentų būtina persimauti pirštines, kad būtų išvengta užteršimo. Venkite pirštinių užteršimo, dirbdami su mėginiais ir kontrolinėmis medžiagomis.
- Baigę dirbti su mėginiais bei rinkinio reagentais ir nusimovę pirštines, kruopščiai nusiplaukite rankas.
- Švariai nuvalykite ir dezinfekuokite visus laboratorijos darbo vietų paviršius, naudodami šviežiai paruoštą 0,5 % natrio hipochlorito tirpalą, sumaišytą su distiliuotu ar dejonizuotu vandeniu (buityje naudojamą baliklį atskiedę santykiu 1:10). Tada nušluostykite paviršių 70 % etanolio.
- Jei ant **cobas®** 6800/8800 instrumento išsilieja skysčio, vykdydami **cobas®** 6800/8800 sistemų naudotojo pagalbinėje medžiagoje ir (arba) naudotojo vadove pateiktus nurodymus tinkamai nuvalykite ir pašalinkite instrumento (-ų) paviršiaus užterštumą.

Mėginių ėmimas, transportavimas ir laikymas

Pastaba: visus mėginius ir kontrolines medžiagas naudokite taip, lyg jie galėtų perduoti infekciją.

Visus mėginius laikykite nurodytoje temperatūroje.

Aukšta temperatūra turi įtakos mėginių stabilumui.

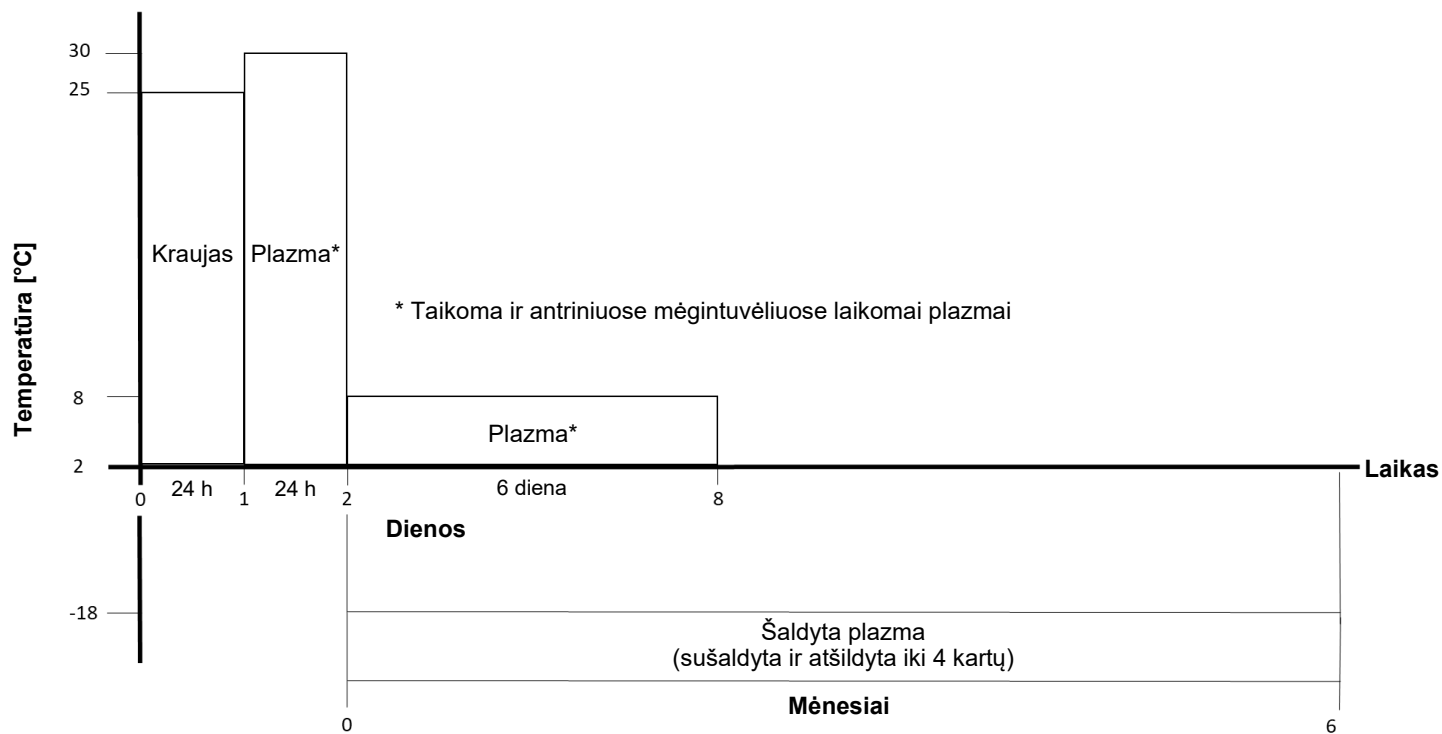
Jeigu naudojate užšaldytus mėginius antriniuose mėgintuvėliuose, palikite mėginius kambario temperatūroje (15–30 °C), kol visiškai atitirps, tada trumpai pamaišykite (pvz., sukuriniu maišytuvu 3–5 sekundes) ir centrifuguokite, kad surinktumėte visą mėginio tūrį mėgintuvėlio apačioje.

Jei yra tikimybė, kad po centrifugavimo ląstelės galėjo resuspenduotis į plazmą, prieš pradėdami tyrimo procesą apsvarstykite galimybę pakartoti centrifugavimą.

Mėginiai

- Pilno kraujo mėginiai turi būti surenkami BD Vacutainer® PPT™ plazmos paruošimo mėgintuvėliuose, skirtuose molekulinės diagnostikos tyrimo metodams, arba steriliuose mėgintuvėliuose, naudojant EDTA kaip anti-koagulantą. Vadovaukitės mėginiams surinkti naudojamų mėgintuvėlių gamintojo instrukcijomis. Žr. 1 pav.
- Neapdorotą kraują, paimtą BD Vacutainer® PPT™ plazmos paruošimo mėgintuvėliuose, skirtuose molekulinės diagnostikos tyrimo metodams, arba steriliuose mėgintuvėliuose, naudojant EDTA kaip antikoagulantą, prieš paruošiant plazmą galima laikyti ir (arba) transportuoti 2–25 °C temperatūroje ne ilgiau nei 24 valandas. Centrifuguoti reikia laikantis gamintojo instrukcijų.
- Atskyrus plazmos mėginius galima 24 valandas laikyti 2–30 °C temperatūroje pirminiuose arba antriniuose mėgintuvėliuose; po to:
 - Laikymas pirminiuose arba antriniuose mėgintuvėliuose iki 6 dienų 2–8 °C temperatūroje.
 - Laikymas antriniuose mėgintuvėliuose iki 6 mėnesių ≤ –18 °C temperatūroje.
- Plazmos mėginiai yra stabilūs po keturių užšaldymo ir atitirpinimo ciklų, jei laikomi ≤ –18 °C temperatūroje.

1 pav. Mėginio laikymo sąlygos



- Jei mėginiai bus gabenami, juos reikia supakuoti ir sužymėti pagal taikomas šalies ir (arba) tarptautines mėginių ir etiologinių medžiagų transportavimo taisykles.

Naudojimo instrukcijos

Procedūros pastabos

- **cobas®** EBV reagentų, **cobas®** EBV/BKV Control Kit rinkinio, **cobas®** Buffer Negative Control Kit ir **cobas omni** reagentų nenaudokite pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Pakartotinai nenaudokite vienkartinį priemonių. Jos yra skirtos vienkartiniam naudojimui.
- Informacijos apie tinkamą instrumentų priežiūrą žr. **cobas®** 6800/8800 sistemų naudotojo pagalbinėje medžiagoje ir (arba) naudotojo vadove.

cobas® EBV tyrimo atlikimas

cobas® EBV tyrimą galima atlikti su vienu privalomu 200 µl mėginiu. Tyrimo atlikimo procedūra išsamiai aprašyta **cobas®** 6800/8800 sistemų naudotojo pagalbinės medžiagos ir (arba) naudotojo vadove. 2 pav. pateikta šios procedūros santrauka.

2 pav. cobas® EBV procedūra

1	Sukurkite užsakymą (-us)
2	Kai sistema parągins, įdėkite reagentus ir reikmenis: • Įdėkite plovimo reagento, lizės reagento ir skiediklio • Įdėkite apdorojimo plokšteles ir amplifikacijos plokšteles • Įdėkite magnetinių stiklo dalelių • Įdėkite konkretaus tyrimo reagentus • Įdėkite kontrolinių medžiagų kasetes • Įdėkite antgalių lentynėles • Pakeiskite užsikimšusių antgalių stovėlį
3	Tyrimą pradėkite vykdyti naudotojo sąsajoje pasirinkdami mygtuką „Start manually“ arba jis bus automatiškai pradėtas po 120 minučių arba įkėlus pilną mėginių partiją
4	Peržiūrėkite ir eksportuokite rezultatus
5	Išimkite reagentus ir reikmenis: • Išimkite iš analizės modulio amplifikacijos plokšteles • Išimkite tuščias kontrolinių medžiagų kasetes • Ištuštinkite kietąsias atliekas • Ištuštinkite skystąsias atliekas

Rezultatai

cobas® 6800/8800 sistemos automatiškai nustato EBV DNR koncentraciją mėginiuose ir kontrolėse. EBV DNR koncentracija pateikiama tarptautiniais vienetais mililitre (TV/ml).

Kokybės kontrolė ir rezultatų patikimumas

- Kiekvienoje partijoje apdorojama viena neigiama kontrolė [(-) C] ir dvi teigiamos kontrolės: silpnai teigiama kontrolė [EBV/BKV L(+)C] ir stipriai teigiama kontrolė [EBV/BKV H(+)C].
- cobas® 6800/8800 programinėje įrangoje ir (arba) ataskaitoje patikrinkite žymas ir su jomis susijusius rezultatus, kad užtikrintumėte partijos rezultatų patikimumą.
- Partija yra vertinama, jeigu ties visomis trimis kontrolėmis – viena neigiama ir dviem teigiamomis – nėra žymų: EBV L(+)C, EBV H(+)C. Neigiamos kontrolės rezultatas rodomas kaip (-) C, silpnai ir stipriai teigiama kontrolė rodoma kaip EBV/BKV L(+)C ir EBV/BKV H(+)C.

Pagal neigiamų ir teigiamų kontrolių klaidas rezultatų nevertinamumą automatiškai nustato cobas® 6800/8800 programinė įranga.

Kontrolių žymos

9 lentelė. Neigiamų ir teigiamų kontrolių žymos

Neigiama kontrolė	Žyma	Rezultatas	Aiškinimas
(-) C	Q02 (Kontrolinės partijos klaida)	Invalid	Nevertinamas rezultatas arba neigiamos kontrolės suskaičiuotas titro rezultatas nėra neigiamas.
Teigiama kontrolė	Žyma	Rezultatas	Aiškinimas
EBV/BKV L(+)C	Q02 (Kontrolinės partijos klaida)	Invalid	Nevertinamas rezultatas arba silpnai teigiamos kontrolės apskaičiuotas titro rezultatas yra už priskirtos skalės ribų.
EBV/BKV H(+)C	Q02 (Kontrolinės partijos klaida)	Invalid	Nevertinamas rezultatas arba stipriai teigiamos kontrolės apskaičiuotas titro rezultatas yra už priskirtos skalės ribų.

Jei kontrolės partija nevertinama, pakartokite visų atitinkamos partijos mėginių tyrimą.

Rezultatų aiškinimas

Kad mėginių grupė būtų tinkama vertinti, patikrinkite, ar **cobas®** 6800/8800 programinėje įrangoje ir (arba) ataskaitoje prie kiekvieno atskiro mėginio nėra žymų. Rezultatai turi būti aiškinami tokiu būdu:

- vertinamą partiją gali sudaryti ir vertinami, ir nevertinami mėginių rezultatai.

10 lentelė. Tiksliniai rezultatai ir atskirų tikslinių rezultatų aiškinimas

Rezultatai	Aiškinimas
Target Not Detected	EBV DNR neaptiktas. Rezultatai pranešami taip: „EBV not detected“.
< Titer Min ^a	Apskaičiuota titro reikšmė mažesnė nei tyrimo apatinė kiekybinė riba (LLOQ). Rezultatai pranešami taip: „EBV detected, less than (Titer Min)“. Min. titras = 35,0 TV/ml
Titer	Suskaičiuotas titras patenka į tyrimo linijinį intervalą – didesnis už min. titrą arba jam lygus ir mažesnis už maks. titrą arba jam lygus. Rezultatai pranešami taip: „(Titer) of EBV detected“.
> Titer Max ^b	Apskaičiuota titro reikšmė didesnė nei tyrimo viršutinė kiekybinė riba (ULOQ). Rezultatai pranešami taip: „EBV detected, greater than (Titer Max)“. Maks. titras = 1,0E+08 TV/ml

^a Mėginio rezultatai „< Titer Min“ (taikinyis aptiktas < apatinės kiekybinės ribos) turi būti interpretuojami kitų klinikinių duomenų kontekste, negalima remtis vien jais priimančiais sprendimus dėl gydymo.

^b Mėginio rezultatas „> Titer Max“ reiškia, kad aptikti EBV teigiami mėginiai, kurių titro reikšmė yra didesnė už viršutinę kiekybinę ribą (ULOQ). Jei reikia kiekybinių rezultatų, pradinį mėginį reikia atskiesti neigiamą EBV žmogaus kraujo EDTA plazma ir tyrimą pakartoti. Gauti rezultatai dauginami iš atskiedimo koeficiento.

Procedūros apribojimai

- **cobas®** EBV buvo įvertintas tik naudojant su **cobas®** EBV/BKV Control Kit, **cobas®** Buffer Negative Control Kit, **cobas omni** MGP Reagent, **cobas omni** Lysis Reagent, **cobas omni** Specimen Diluent ir **cobas omni** Wash Reagent – tik naudojant su **cobas®** 6800/8800 sistemomis.
- Patikimi rezultatai priklauso nuo tinkamai atliktų mėginių surinkimo, laikymo ir apdorojimo procedūrų.
- Šis tyrimas buvo patvirtintas naudoti tik su EDTA plazma. Kitų tipų mėginių tyrimo su **cobas®** EBV rezultatai gali būti netikslūs. Virusų kiekio plazmoje matavimų negalima tiesiogiai palyginti su kitų tipų mėginių matavimais.
- EBV DNR kiekybiniam vertinimui įtakos gali turėti mėginio ėmimo būdai, su pacientu susiję veiksniai (pvz., amžius, pasireiškiantys simptomai) ir (arba) infekcijos stadija.
- Kaip ir atliekant kitus molekulinis tyrimus, mutacijos, vykstančios **cobas®** EBV tiriamuosiuose regionuose, gali turėti įtakos pradmens ir (arba) zondo jungimuisi, todėl gali būti nustatytas per mažas viruso kiekis arba gali nepavykti jo aptikti.
- Dėl technologijoms būdingų skirtumų naudotojams rekomenduojama prieš pakeičiant vieną technologiją kita savo laboratorijose atlikti metodų koreliacinę analizę, kad būtų įvertinti technologijų skirtumai. Naudotojai turėtų laikytis savo pačių nustatytų specifinių nurodymų/procedūrų.
- **cobas®** EBV nėra skirtas naudoti kaip atrankinis tyrimas, EBV aptikimui kraujyje arba kraujo produktuose.

Neklinikinis našumo įvertinimas

Pagrindinės tyrimo savybės

Aptikimo riba (LoD)

PSO tarptautinis standartas

cobas® EBV aptikimo riba buvo nustatyta atlikus 1-ojo PSO tarptautinio standarto, skirto Epšteino–Baro viruso tyrimui nukleorūgščių amplifikacijos metodais (1st EBV WHO International Standard), gauto iš NIBSC (NIBSC 09/260), EBV neigiamoje žmogaus kraujo EDTA plazmoje, skiedinių sekos analizę. Mėginių grupės, kurias sudarė šešių skirtingų koncentracijų skiediniai ir tuščiasis mėginys, buvo tiriamos su trimis **cobas® EBV** reagentų partijomis, atliekant kartotinius tyrimus, tiriant kelias dienas, tyrimą atliekant skirtingiems operatoriams ir su skirtingais instrumentais.

EDTA plazmos tyrimų rezultatai pateikiami nuo 11 lentelės iki 13 lentelės. Tyrimas parodė, kad mažiausio jautrumo partijos koncentracija, kuriai esant numatomas 95 % atitikimo koeficientas (pagal PROBIT), yra 18,8 TV/ml, o 95 % patikimumo intervalas EDTA plazmoje yra 14,5–27,5 TV/ml. Mažiausia koncentracija, leidžianti pasiekti ≥ 95 % atitikimo koeficientą, yra 20,0 TV/ml EDTA plazmoje.

11 lentelė. Aptikimo riba EDTA plazmoje, 1 partija

Įvedama titro koncentracija (EBV DNR TV/ml)	Tinkamus vertinti rezultatus turinčių pakartoj. skaičius	Teigiamų rezultatų skaičius	Atitikimo koef. %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	62	98,4
20,0	63	61	96,8
10,0	63	53	84,1
5,0	63	37	58,7
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
LoD pagal PROBIT esant 95 % atitikimo koef.	18,8 TV/ml 95 % patikimumo intervalas: 14,5–27,5 TV/ml		

12 lentelė. Aptikimo riba EDTA plazmoje, 2 partija

Įvedama titro koncentracija (EBV DNR TV/ml)	Tinkamus vertinti rezultatus turinčių pakartoj. skaičius	Teigiamų rezultatų skaičius	Atitikimo koef. %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	58	92,1
5,0	63	35	55,6
2,5	63	20	31,8
0,0	63	0	0,0
LoD pagal PROBIT esant 95 % atitikimo koef.	12,4 TV/ml 95 % patikimumo intervalas: 10,0–17,0 TV/ml		

13 lentelė. Aptikimo riba EDTA plazmoje, 3 partija

Ivedama titro koncentracija (EBV DNR TV/ml)	Tinkamus vertinti rezultatus turinčių pakartoj. skaičius	Teigiamų rezultatų skaičius	Atitikimo koef. %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	62	98,4
10,0	63	48	76,2
5,0	63	38	60,3
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
LoD pagal PROBIT esant 95 % atitikimo koef.	18,6 TV/ml 95 % patikimumo intervalas: 14,4–27,1 TV/ml		

Linijinis intervalas

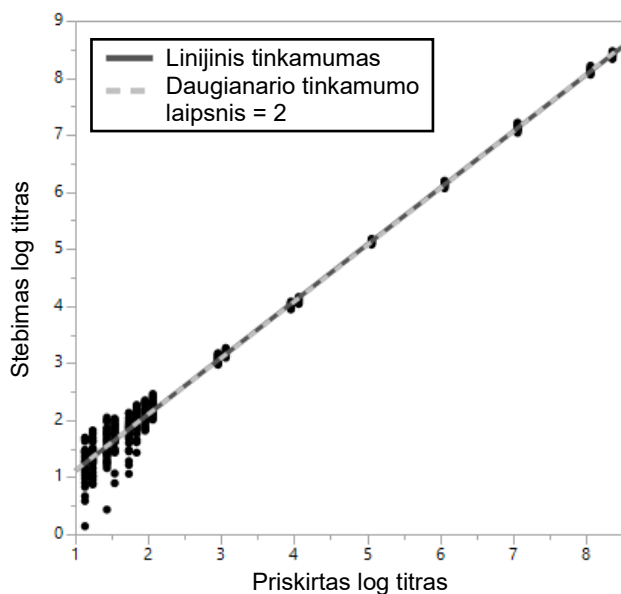
cobas® EBV linijiskumas buvo vertinamas tiriant skiedinių seriją, kurią sudarė 17 mėginių grupė su viso tyrimo linijinio intervalo EBV 1 genotipo DNR. Visą linijinį intervalą apimančios mėginių grupės sudarančių 11 mėginių paruošti buvo naudojamas aukštesnio titro lambda DNR koncentratas. Mėginių grupę sudarantiems vidurinio ir apatinio linijinio intervalo lygio 6 mėginiams paruošti buvo naudojamas klinikinis mėginys.

Kiekvienas mėginių grupės mėginys buvo tiriamas atliekant po 36 pakartotinius tyrimus su trimis **cobas®** EBV reagentų partijomis; tyrimo rezultatai pateikti 3 pav.

Buvo nustatytas **cobas®** EBV linijiskumas nuo $1,40E+01$ iki $2,30E+08$ TV/ml ir už $\pm 0,1 \log_{10}$ mažesnis arba lygus absoliutinis nuokrypis nuo geriau tinkančios nelineinės regresijos žmogaus EDTA plazmoje (žr. 3 pav.).

Linijiniame intervale tyrimo tikslumas yra $\pm 0,2 \log_{10}$.

3 pav. Aptikimo riba linijiniame intervale EDTA plazmoje



Tikslumas (laboratoriniai duomenys)

cobas® EBV tikslumas buvo nustatytas atlikus aukšto titro EBV DNR (1 genotipo) EBV neigiamoje EDTA plazmoje skiedinių sekos analizę. Naudodami tris **cobas® EBV** tyrimo reagentų partijas trys operatoriai trimis instrumentais per 12 dienų atliko šešių lygių skiedinių tyrimus, po 72 pakartotinius kiekvieno lygio mėginius. Kiekvienas mėginys buvo tiriamas laikantis visų **cobas® EBV** tyrimo procedūrų, naudojant visiškai automatizuotą **cobas® 6800/8800** sistemą. Todėl čia pateikiami tikslumo duomenys atspindi visus tyrimo procedūros aspektus. Rezultatai pateikiami 14 lentelėje.

cobas® EBV tyrimas buvo labai tikslus su trimis reagentų partijomis, tirtomis koncentracijos diapazone nuo $1,08\text{E}+02$ TV/ml iki $5,40\text{E}+07$ TV/ml.

14 lentelė. **cobas® EBV** tyrimo glaudumas vienoje laboratorijoje

Nominalioji koncentracija [TV/ml]	Priskirta koncentracija [TV/ml]	EDTA plazma			
		1 partija	2 partija	3 partija	Visos partijos
		SN	SN	SN	Jungtinis SN
$5,00\text{E}+07$	$5,40\text{E}+07$	0,03	0,04	0,04	0,04
$1,00\text{E}+06$	$1,08\text{E}+06$	0,02	0,03	0,02	0,02
$1,00\text{E}+05$	$1,08\text{E}+05$	0,02	0,02	0,03	0,02
$1,00\text{E}+04$	$1,08\text{E}+04$	0,04	0,02	0,03	0,03
$1,00\text{E}+03$	$1,08\text{E}+03$	0,05	0,05	0,05	0,05
$1,00\text{E}+02$	$1,08\text{E}+02$	0,17	0,18	0,15	0,17

Genotipo tikrinimas

cobas® EBV efektyvumas tiriant EBV 2 genotipą buvo įvertintas šiais būdais:

- Aptikimo ribos patvirtinimas
- Linijinio intervalo patvirtinimas

2 genotipo aptikimo ribos patvirtinimas

2 genotipo EBV DNR buvo atskiesta iki trijų skirtingų koncentracijų EBV neigiamoje EDTA plazmoje. Buvo nustatytas sutapimų dažnis atliekant 63 kiekvieno lygio pakartojimus. Tyrimas buvo atliktas su trimis **cobas® EBV** reagentų partijomis, atliekant kartotinius tyrimus, tiriant kelias dienas, tyrimą atliekant skirtingiems operatoriams ir su skirtingais instrumentais. Rezultatai patvirtino, kad **cobas® EBV** gali aptikti 2 genotipo EBV DNR, esant $18,8$ TV/ml koncentracijai, su ≥ 95 % atitikimo koeficientu.

2 genotipo linijinio intervalo patvirtinimas

cobas® EBV genotipų linijiskumo tyrimui patvirtinti buvo naudojama skiedinių serija, sudaryta iš viso linijinio tyrimo intervalo aštuonių grupės mėginių. Tyrimai buvo atliekami naudojant trijų partijų **cobas® EBV** reagentą; su kiekvieno lygmens EDTA plazmos skiediniu buvo atlikta po 12 pakartotinių mėginių tyrimų.

Buvo patvirtintas **cobas® EBV** 2 genotipo linijinis intervalas.

Specifiškumas

cobas® EBV specifiškumas buvo nustatytas analizuojant atskirų donorių EBV neigiamos EDTA plazmos mėginius. Buvo ištirtas 101 atskiras EDTA plazmos mėginys, naudojant tris **cobas® EBV** reagentų partijas. Visi mėginiai buvo nustatyti kaip EBV DNR neigiami. **cobas® EBV** specifiškumas tiriamųjų mėginių grupėje buvo 100 % (vienpusis žemutinis 95 % patikimumo intervalas – 97,08 %).

Analitinis specifiškumas

cobas® EBV analitinis specifiškumas buvo vertinamas atskiedus mikroorganizmų mėginių grupę iki 1,00E+06 vnt./ml (ląstelės/ml, CFU/ml, IFU/ml, CCU/ml) bakterijų ir mielių koncentracijos bei nuo 3,00E+05 iki 1,00E+06 vnt./ml (TV/ml, kopijų/ml, ląstelės/ml, TCID₅₀/ml) virusų koncentracijos EBV DNR teigiamoje ir EBV DNR neigiamoje EDTA plazmoje. Konkretūs tirti mikroorganizmai yra išvardyti 15 lentelėje. Kiekvienas mėginių grupės mėginys buvo vertinamas su **cobas® EBV**. Nė vienas iš ne EBV patogenų netrukdytų tyrimo efektyvumui.

15 lentelė. Mikroorganizmai, ištirti dėl kryžminio reaktyvumo

Virusai	Bakterijos	Mielės
5 tipo adenovirusas	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BK poliomavirusas	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Citomegalovirusas	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Hepatito B virusas	<i>Clostridium perfringens</i>	
Hepatito C virusas	<i>Enterococcus faecalis</i>	
Paprastosios pūslelinės 1 tipo virusas	<i>Escherichia coli</i>	
Paprastosios pūslelinės 2 tipo virusas	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Žmogaus pūslelinės 6 tipo virusas	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Žmogaus pūslelinės 7 tipo virusas	<i>Mycobacterium avium</i>	
Žmogaus pūslelinės 8 tipo virusas	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Žmogaus imunodeficitu 1 tipo virusas	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Žmogaus imunodeficitu 2 tipo virusas	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Žmogaus papilomos virusas	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
JC virusas	<i>Salmonella enterica</i>	
Parvovirusas B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Beždžionių 40 tipo virusas		
Varicella-zoster virusas		

Analitinis specifiškumas – interferuojančios medžiagos

Didesni trigliceridų (33,0 g/l), konjuguoto bilirubino (0,2 g/l), nekonjuguoto bilirubino (0,2 g/l), albumino (60,0 g/l), hemoglobino (2,0 g/l) ir žmogaus DNR (2 mg/l) kiekiai mėginiuose buvo ištirti, juose esant EBV DNR ir be jos. Buvo parodyta, kad tirtos endogeninės interferencinės medžiagos nedaro įtakos **cobas® EBV** tyrimo efektyvumui.

Papildomai buvo ištirtos, 16 lentelėje išvardytos vaistinės medžiagos naudojant tris kartus didesnę jų koncentraciją nei nustatyta C_{maks} , esant EBV DNR ir be jos.

Parodyta, kad jokios potencialios interferuojančios medžiagos netrukdytų tyrimo efektyvumui.

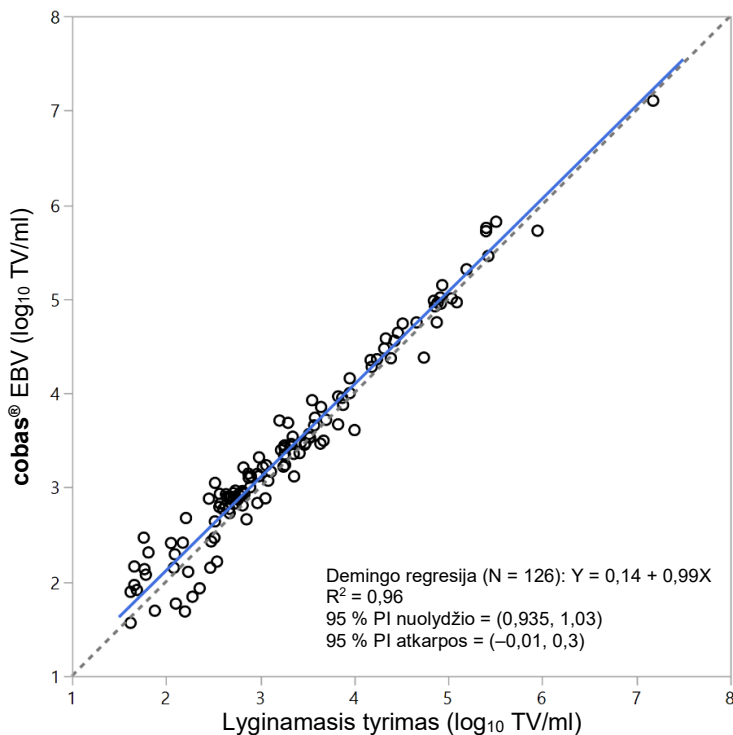
16 lentelė. Vaistinės medžiagos tirtos dėl interferencijos kiekybiškai tiriant EBV DNR, naudojant cobas® EBV

Vaisto klasė	Bendrinis vaisto pavadinimas	
Antimikrobinis	Cefotetanas	Sulfametoksazolis
	Kalio klavulanatas	Tikarcilino natrio druska
	Flukonazolis	Trimetoprimas
	Piperacilinas	Vankomicinas
	Natrio tazobaktamas	Mikafunginas
Mišiniai pūslelinės virusams gydyti	Gancikloviras	Cidofoviras
	Valgancikloviras	Foskarnetas
	Acikloviras	Letermoviras
Imunosupresantai	Azatioprinas	Prednizonas
	Ciklosporinas	Sirolimusas
	Everolimusas	Takrolimusas
	Mikofenolato mofetilas	Mikofenolio rūgštis

Metodų koreliacija

cobas® EBV efektyvumas buvo vertinamas lyginant su lyginamuoju tyrimu ir analizuojant EDTA plazmos mėginius, gautus iš EBV užsikrėtusių pacientų. Buvo atskirai pakartoti tyrimai su EDTA plazmos mėginiais, atitinkančiais abiejų tyrimų kiekybinio įvertinimo intervalą. Buvo atlikta Demingo regresinė analizė.

Demingo regresijos rezultatai pateikti 4 pav.

4 pav. cobas® EBV regresijos analizė, palyginti su lyginamuoju tyrimu

Visos sistemos klaidų koeficientas

Visos sistemos trikčių dažnis atliekant cobas® EBV tyrimą nustatytas kelis kartus tiriant 100 EDTA plazmos mėginių, į kuriuos pridėta EBV teigiamo klinikinio mėginio. Šie mėginiai buvo tirti esant $3 \times \text{LoD}$ koncentracijai.

Šio tyrimo rezultatai parodė, kad visi pakartotiniai tyrimai buvo vertinami ir buvo gauti teigiami EBV rezultatai; tai reiškia, kad visos sistemos trikčių koeficientas yra 0 % (vienpusis viršutinis 95 % patikimumo intervalas – 2,95 %).

Kryžminis užteršimas

cobas® EBV kryžminio užteršimo koeficientas buvo nustatytas atliekant 240 EBV neigiamų terpės mėginių tyrimo pakartojimų ir 225 aukšto titro ($2,00 \times 10^7$ TV/ml) EBV mėginių tyrimo pakartojimus. Iš viso buvo atliktos penkios tyrimų procedūros, išdėsčius teigiamus ir neigiamus mėginius šachmatų lentos konfigūracijoje.

Visų 240 neigiamų mėginių pakartojimų tyrimo rezultatas buvo neigiamas, t. y. kryžminio užteršimo koeficientas buvo 0 % (vienpusis viršutinis 95 % patikimumo intervalas – 1,24 %).

Papildoma informacija

Pagrindinės tyrimo ypatybės

Mėginio tipas	EDTA plazma
Minimalus reikiamas mėginio tūris	350 µl*
Apdorojamas mėginio tūris	200 µl
Analitinis jautrumas	18,8 TV/ml
Linijinis intervalas	35,0 TV/ml – 1E+08 TV/ml
Specifiškumas	100 %
Aptinkami genotipai	1 ir 2 EBV genotipai

* **cobas omni** antrinių mėgintuvėlių tūrio nuostolis yra 150 µl. Kitų tyrimams naudojamų mėgintuvėlių tūrio nuostolis gali būti kitoks, be to, gali reikėti daugiau arba mažiau minimaliojo tūrio.

Simboliai

Šie simboliai naudojami Roche PGR diagnostikos gaminiams žymėti.

17 lentelė. Simboliai, naudojami Roche PGR diagnostikos gaminiams žymėti

	Papildoma programinė įranga		Priskirtos skalės apatinė riba		Neigiama kontrolė
	Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje		Priskirtos skalės viršutinė riba		Teigiama kontrolė
	Brūkšninio kodo duomenų lentelė		Laikyti tamsoje		Kontrolinės medžiagos
	Partijos kodas		Yra pakankamai <n> tyrimų		Priskirta skalė (kop./ml)
	Biologinė rizika		Temperatūros ribojimas		Priskirta skalė (TV/ml)
	Katalogo numeris		Tyrimo nustatymų laikmena		Standartinė procedūra
	Žiūrėti naudojimo taisykles		Gamintojas		Ypač tiksli procedūra
	Rinkinio sudėtis		Galiojimo laikas		QS kopijos PGR reakcijos metu; naudokite QS kopijas PGR reakcijos metu, kai skaičiuojami rezultatai.
	Platintojas		Visuotinis prekės numeris		QS TV PGR reakcijos metu; naudokite QS tarptautinius vienetų (TV) PGR reakcijos metu, kai skaičiuojami rezultatai.
	Skirta tik IVD efektyvumui įvertinti		Serijos numeris		CE atitikties ženklavimas; ši priemonė atitinka <i>in vitro</i> diagnostikos medicinos priemonės CE ženklavimo reikalavimus
Rx Only	Taikytina tik JAV: pagal federalinius įstatymus šį prietaisą galima parduoti tik gydytojui arba gydytojo nurodymu.		Pagaminimo data		
	<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos priemonė		Nenaudokite pakartotinai		

JAV klientų techninės pagalbos tarnyba 1-800-526-1247

Gamintojas ir platintojai

18 lentelė. Gamintojas ir platintojai



Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
www.roche.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Prekių ženklai ir patentai

Žr. <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Autorių teisės

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Šaltinių sąrašas

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:453-5. doi: 10.1038/bmt.2009.254. PubMed PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. doi: 10.1111/ajt.12093. PubMed PMID: 23464993.
3. Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343:481-92. doi: 10.1056/NEJM200008173430707. PubMed PMID: 10944566.
4. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al.; Sixth European Conference on Infections in Leukemia, a joint venture of the Infectious Diseases Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation (EBMT-IDWP), the Infectious Diseases Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC-IDG), the International Immunocompromised Host Society (ICHS) and the European Leukemia Net (ELN). Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica*. 2016;101:803-11. doi:10.3324/haematol.2016.144428. Review. PubMed PMID: 27365460; PubMed Central PMCID: PMC5004459.
5. Allen UD, JK Preiksaitis; AST Infectious Diseases Community of Practice. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:107-20. doi: 10.1111/ajt.12104. PubMed PMID: 23465004.
6. San-Juan R, Comoli P, Caillard S, Moulin B, Hirsch HH, P Meylan; ESCMID Study Group of Infection in Compromised Hosts. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 7:109-18. doi: 10.1111/1469-0691.12534. PubMed PMID: 24475976.
7. Nijland ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, Ten Berge IJ. Epstein-Barr virus-positive posttransplant lymphoproliferative disease after solid organ transplantation: pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Transplant Direct*. 2015;2:e48. . doi: 10.1097/TXD.0000000000000557. eCollection 2016 Jan. PubMed PMID: 27500242; PubMed Central PMCID: PMC4946499.
8. Tsai DE, Douglas L, Andreadis C, et al. EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: results of a two-arm prospective trial. *Am J Transplant*. 2008;8:1016-24. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02183.x. PubMed PMID: 18312608.
9. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, et al.; Collaborative Study Group. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals*. 2016;44:423-33. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.04.010. Epub 2016 Jul 22. PubMed PMID: 27461128.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PubMed PMID: 2227421.
11. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PubMed PMID: 7845459.
12. Mol CD, Arvai AS, Slupphau G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78. PubMed PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992;10:413-7. PubMed PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. doi: 10.1101/gr.6.10.986. PubMed PMID: 8908518.

15. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.
17. Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. PLoS Pathog. 2009;5(7):e1000496. doi: 10.1371/journal.ppat.1000496. Epub 2009 Jul 3. PMID: 19578433.

Dokumento leidimas

Dokumento leidimo informacija	
Doc Rev. 2.0 08/2020	Mėginių laikymas antriniuose mėgintuvėliuose ($\leq -18\text{ }^{\circ}\text{C}$) pratęstas iki 6 mėnesių. Skyriuje Perspėjimai ir atsargumo priemonės įtraukta pastaba apie užteršimo kontrolės priemonės. Atnaujintas skyrius Gera laboratorinė praktika. Skyriuje Mėginių ėmimas, transportavimas ir laikymas įtraukta pastaba apie pakartotinį mėginių centrifugavimą. Į skyriaus Rezultatų aiškinimas 10 lentelę įtraukta pastaba apie „< Titer Min“ rezultatus. Atnaujintas suderintų simbolių puslapis. Jei turite klausimų, kreipkitės į vietinį Roche atstovą.