

cobas[®] WNV

Pro použití k *in vitro* diagnostice

cobas[®] WNV – 192	P/N: 09171142190
cobas[®] WNV – 480	P/N: 09040927190
cobas[®] WNV Control Kit	P/N: 09040935190
cobas[®] NHP Negative Control Kit	P/N: 09051554190
cobas omni MGP Reagent	P/N: 06997546190
cobas omni Specimen Diluent	P/N: 06997511190
cobas omni Lysis Reagent	P/N: 06997538190
cobas omni Wash Reagent	P/N: 06997503190

Obsah

Účel použití.....	4
Souhrn a výklad testu.....	4
Reagencie a materiály	7
Reagencie a kontroly cobas® WNV	7
Reagencie cobas omni pro přípravu vzorků.....	10
Požadavky na uchovávání reagentů a manipulaci s nimi	11
Další potřebný materiál	12
Požadované přístroje a software	12
Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci.....	13
Varování a bezpečnostní opatření.....	13
Manipulace s reagenty.....	13
Správná laboratorní praxe.....	14
Odběr, přeprava, uchovávání a poolování vzorků.....	15
Vzorky krve žijících dárců	15
Kadaverózní krevní vzorky	17
Návod k použití.....	18
Automatické pipetování a poolování vzorků (volitelné)	18
Procesní poznámky.....	18
Provedení testu cobas® WNV	18
Výsledky	19
Kontrola kvality a platnost výsledků.....	19
Vyhodnocení výsledků	19
Opakované testování individuálních vzorků.....	20
Procesní omezení	20

Hodnocení neklinické výkonnosti	21
Klíčové funkční charakteristiky testu – vzorky žijících dárců	21
Mez detekce (<i>Limit of Detection</i> , LoD)	21
Reprodukovatelnost	23
Inkluzivita	24
Analytická specifita	25
Analytická specifita – interferenční látky	26
Korelace	27
Selhání celého systému	27
Klíčové charakteristiky výkonu testu – kadaverózní vzorky	28
Senzitivita	28
Specifita	28
Reprodukovatelnost	29
Hodnocení klinické výkonnosti	30
Klinická senzitivita – testování známých vzorků pozitivních na západonilský virus	30
Klinická specifita	30
Výsledky testování směsí	30
Výsledky testování jednotlivých vzorků	31
Reprodukovatelnost	31
Doplňující informace	33
Hlavní parametry testu	33
Symboly	34
Technická podpora	35
Výrobce a dovozce	35
Ochranné známky a patenty	35
Autorská práva	35
Literatura	36
Revize dokumentu	38

Účel použití

Test **cobas® WNV** pro použití na systémech **cobas® 6800** a **cobas® 8800** je kvalitativní *in vitro* test k přímé detekci RNA západonilského viru (WNV) v lidské plazmě.

Tento test je určen pro skrínigové testy dárců na RNA WNV ve vzorcích plazmy od jednotlivých dárců, včetně dárců plné krve a složek krve, a také od ostatních žijících dárců. Tento test je také určen pro použití při vyšetření dárců orgánů a tkání, kdy jsou vzorky dárce odebrány, zatímco jeho srdce ještě bije, a při vyšetření kadaverózních (zemřelých) dárců (bez srdečního pulsu).

Tento test není určen pro použití na vzorcích krve z pupečníku.

Plazma od všech dárců může být otestována jako jednotlivé vzorky. U dárcovských odběrů plné krve a složek krve, mohou být vzorky plazmy testovány jednotlivě nebo mohou být testovány i ve směsích alikvotů jednotlivých vzorků. Odběry od kadaverózních dárců orgánů a tkání (bez srdečního pulsu) mohou být testovány pouze jako jednotlivé vzorky.

Tento test není určen pro použití jako pomůcka pro stanovení diagnózy infekce virem WNV.

Souhrn a výklad testu

Základní informace: skrínig krve pro virové infekce přenášené transfúzí

Západonilský virus (WNV) je arbovirus (virus přenášený členovci) s jednořetězcovou, pozitivně orientovanou RNA, který náleží do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus* a sérokomplexu japonské encefalitidy.^{1,2} Sérokomplex japonské encefalitidy také zahrnuje virus japonské encefalitidy, virus St. Louisské encefalitidy, virus encefalitidy Murray Valley a virus Kunjin (nyní je známo, že se jedná o variantu WNV).³⁻⁵ Na základě fylogenetických studií byly identifikovány 2 hlavní linie viru WNV: linie 1 a linie 2. Kmeny z linie 1 se nachází v Africe, Indii, Austrálii a na západní polokouli a jsou původci nedávných epidemií v Evropě, středomoří a v Severní i Jižní Americe. Kmeny z linie 2 byly hlášeny v subsaharské Africe⁶ a v poslední době i v jižní Evropě.^{7,8}

Stejně jako další arboviry se i WNV udržuje v enzootickém cyklu mezi komáry sajícími krev a dostupnými hostiteli z podkmene obratlovců (ptáci).⁹ Ptáci slouží jako přirozená zásobárna hostitelů z řad obratlovců a komáři rodu *Culex* jsou hlavními enzootickými přenašeči WNV, zatímco lidé a savci (např. koně) jsou náhodnými a obvykle konečnými hostiteli, protože se u nich pouze vzácně vyvine virémie o dostatečném titru, aby nakazili efektivní přenašeče z řad členovců.^{2,9,10}

WNV je široce rozšířen po Africe, Středním východě, jižní Evropě, západním Rusku, jihozápadní Asii a Austrálii (subtyp Kunjin viru WNV), vzhledem ke schopnosti WNV infikovat množství druhů komárů a ptáků.¹ Propuknutí nákazy u lidí, převážně spojené s mírným horečnatým onemocněním, bylo nepříteli často hlášeno v Izraeli a Africe do poloviny 90. let 20. století.¹ Od poloviny 90. let měly nové virové kmeny, pravděpodobně afrického původu, za následek zvýšený počet infekcí v částech Ruska a jižní a východní Evropy, s velkými vzplanutími nákaz se zvýšenou klinickou závažností v Rumunsku, Rusku, Izraeli a Řecku.^{1,8,11} WNV se nyní vyskytuje v mnoha zemích na západní polokouli, avšak pouze ve Spojených státech a Kanadě zažili významnou incidenci onemocnění u lidí.^{1,12}

Virus WNV se ve Spojených státech poprvé objevil v roce 1999 v New York City a v následujících letech se rychle šířil po celých Spojených státech.¹³ WNV je nyní endemický ve všech 48 navzájem sousedících zemích Spojených států a také ve všech kanadských provinciích.¹ Virus WNV je odpovědný za 3 největší propuknutí arbovirových neuroinvasivních onemocnění (encefalitida, meningitida nebo akutní chabé parézy), jaké kdy byly zaznamenány ve Spojených státech, s téměř 3000 případů neuroinvasivních onemocnění zaznamenaných každý rok v letech 2002, 2003 a 2012.¹ Vysoká virová aktivita nastává během teplých měsíců roku.¹ U devadesáti čtyři procent pacientů s infekcí WNV se vyvinou příznaky v letních měsících.¹

Odhaduje se, že ve Spojených státech mezi lety 1999 a 2012 virus WNV infikoval více než 4 miliony osob,¹ přičemž bylo hlášeno celkem 16 196 pacientů s neuroinvasivním onemocněním způsobeným WNV, včetně 1549 souvisejících úmrtí.¹

Důvod pro testování nukleových kyselin

To, že se virus WNV přenáší transfuzí a transplantací orgánů, se poprvé prokázalo během šetření epidemie ve Spojených státech v roce 2002.^{14, 15} WNV se může přenášet při transfuzi červených krvinek, destiček, čerstvé zmrazené plazmy a při transplantaci srdce, ledvin, jater a plic. Infekce WNV při štípnutí komárem však přesto u lidí převažují.^{1, 2, 14, 16} WNV se může také potenciálně přenášet při transplantaci hematopoetických progenitorních buněk. Transplacentální a perinatální přenos WNV byl také hlášen.¹ Mezi další vzácné způsoby přenosu WNV patří přenos mateřským mlékem, pacienti podstupující dialýzu a vystavení v zaměstnání (např. pracovníci v laboratoři [perkutánní nebo konjunktivální (spojivkové) expozice]; pracovníci na drůbežích farmách).^{1, 12} Infekce obvykle vytvoří celoživotní imunitu.⁹

K přenosu WNV při transfuzi obvykle dochází během akutní fáze infekce, když jsou infikovaní jedinci viremicií a asymptotici, avšak dosud u nich nedošlo k sérokonverzi.¹⁷ Vzhledem k tomu, že se klinicky významné onemocnění vyvinulo pouze u několika infikovaných dárců, jsou dotazy dárců krve na nedávná onemocnění naznačujících infekci WNV při zjišťování infikovaných/séropozitivních dárců neúčinné.^{18, 19} Data shromážděná z plošného testování dárců krve ukazují, že nedávno infikovaní dárce s extrémně nízkým titrem virémie WNV, u nichž se nevyvinuly protilátky proti WNV, účinně přenášejí infekci WNV.^{9, 20} Darovaná krev s velmi nízkou virovou zátěží byla příčinou případů přenosu WNV při transfuzi,²¹ což představuje nebezpečí obzvláště pro pacienty se sníženou imunitou, kteří jsou příjemci většiny krevních transfuzí.²²

Aby se zajistila bezpečnost transfuzí, bylo v roce 2003 zavedeno celonárodní testování nukleových kyselin (NAT) na RNA WNV.⁹ Během prvních 2 let plošného screeningového testování NAT viru WNV dárců krve ve Spojených státech bylo mezi 27,2 miliony dárcovských vzorků identifikováno 1039 pozitivních vzorků (0,4 na 10 000 dárců), avšak čísla se různila až po velmi vysokou hodnotu 1 ze 150 dárců v některých oblastech během epidemie.¹⁸ NAT screening dárců krve ve Spojených státech a Kanadě téměř eliminovalo riziko infekce západonilským virem při transfuzi.¹ Mezi lety 2003 a 2013 se zabránilo přibližně 3000 infekcím WNV.²³

Mezi osobami infikovanými virem WNV je přibližně 80 % asymptomatických, u 20 až 25 % se vyvine západonilská horečka,^{1, 24} a u 1 ze 150 až 250 osob se vyvine neuroinvasivní onemocnění.^{1, 25} Západonilská horečka zahrnuje náhlý nástup bolestí hlavy, malátnosti, horečky (obvykle nižší), bolesti svalů, zimnice, zvracení a další gastrointestinálních příznaků, vyrážky, únavy a bolesti očí, které mohou trvat několik dní až několik týdnů nebo dokonce měsíců.^{1, 24} Neuroinvasivní forma západonilské horečky se může projevovat jako meningitida, encefalitida, meningoencefalitida, nebo akutní chabá paréza, a může vést k nevratnému neurologickému poškození, kómatu a smrti.^{1, 26–31} Infekce WNV je také spojována s myokarditidou, pankreatitidou, fulminantní hepatitidou, rabdomyolýzou, multifokální choroiditidou, vitritidou a autonomní nestabilitou.¹

Následky neuroinvasivního onemocnění mohou přetrvávat měsíce i roky po zotavení z akutní infekce. Po propuštění z nemocnice osoby se západonilskou encefalitidou obvykle vyžadují asistenci s každodenními činnostmi.^{1, 31, 32} Neuropsychiatrické příznaky, včetně deprese a úzkosti a také neurokognitivní deficit, mohou přetrvávat celé měsíce až rok nebo i déle.^{1, 20, 33} Přibližně 10 % osob, u nichž se vyvine neuroinvasivní forma západonilské horečky, v jejím důsledku zemře; nejdůležitějším rizikovým faktorem je pokročilý věk.² V porovnání s 0,8% rizikem úmrtí u pacientů mladších 40 let činí riziko smrtelných následků u pacientů ve věku 70 let nebo starších 17 %.^{1, 33} Mezi další rizikové faktory pro úmrtí patří encefalitida se závažnou svalovou slabostí, změněná úroveň vědomí, diabetes, kardiovaskulární onemocnění, infekce virem hepatitidy C a imunosuprese.^{1, 12, 33}

Princip testu

Test **cobas®** WNV je kvalitativní test, který se provádí na systémech **cobas®** 6800 a **cobas®** 8800. Test **cobas®** WNV umožňuje současnou detekci RNA WNV s interní kontrolou v jediném testu jednotlivého infikovaného dárcovského odběru nebo smíchané plazmy z jednotlivých dárcovských odběrů.

Principy postupu

Test **cobas®** WNV je založen na principu technologie PCR v reálném čase a plně automatizovaném systému přípravy vzorků (extrakce a purifikace nukleové kyseliny), po které následuje PCR amplifikace a detekce. Systém **cobas®** 6800/8800 se skládá z modulu pro dodávání vzorků, přenosového modulu, procesního modulu a analytického modulu. Software systému **cobas®** 6800/8800 provádí automatické zpracování dat, při kterém přiřazuje všem testům výsledky nereaktivní, reaktivní nebo neplatné. Výsledky lze prohlížet přímo na obrazovce systému a vytisknout jako zprávu nebo zaslat do Laboratorního systému pro zpracování výsledků (LIMS) nebo jiného systému pro zpracování výsledků.

Vzorky lze testovat individuálně, nebo lze zvolit testování skupiny vzorků, které se skládají z více vzorků. V případě analýzy skupiny vzorků lze v předanalytickém kroku volitelně použít přístroj **cobas p 680** nebo software **cobas® Synergy** s pipetorem Hamilton MICROLAB® STAR/STARlet IVD.

Nukleové kyseliny ze vzorku a přidaná ribonukleáz-rezistentní (Armored) RNA vnitřní kontroly (IC) (které slouží jako procesní kontrola přípravy vzorku a amplifikace/detekce) jsou extrahovány zároveň. Test navíc využívá 2 kontroly ze soupravy: pozitivní a negativní kontrolu. K uvolnění virových nukleových kyselin dochází přidáním proteinázy a lyzační reagentie ke vzorku. Uvolněné nukleové kyseliny se váží na křemičitanový povrch přidaných magnetických částic. Nenavázané látky a nečistoty, jako například denaturované proteiny, buněčný odpad a případné inhibitory PCR (jako například hemoglobin) jsou odstraněny během následujících kroků promývacím činidlem; purifikované nukleové kyseliny jsou eluovány z magnetických skleněných částic elučním pufrem při zvýšené teplotě.

K selektivní amplifikaci cílových nukleových kyselin ze vzorku dárce dochází pomocí dopředných a zpětných primerů specifických pro virové sekvence vybrané z vysoce konzervovaných oblastí virové nukleové kyseliny. Tepelně stabilní enzym DNA polymeráza se používá jak pro reverzní transkripci, tak pro amplifikaci. Hlavní směs obsahuje místo deoxythymidintrifosfátu (dTTP) deoxyuridintrifosfát (dUTP), který je zabudováván do nově syntetizované DNA (amplikonu).^{34–36} Jakékoli kontaminující amplikony z předcházejících cyklů PCR jsou zničeny enzymem AmpErase [uracil-N-glykosylázou], který je zahrnut ve směsi PCR, při zahřátí v prvním kroku tepelného cyklování. Nově vytvořené amplikony však zničeny nejsou, protože enzym AmpErase je inaktivován po vystavení teplotám nad 55 °C.

Činidlo Master Mix **cobas®** WNV obsahuje detekční sondy specifické pro nukleové kyseliny WNV a IC. Specifické detekční sondy pro WNV a IC jsou označeny – každá jedním ze dvou jedinečných fluorescenčních barviv, která mají oznamovací funkci. Každá sonda obsahuje též druhé barvivo, které má tlumicí funkci. Dvě oznamovací barviva jsou měřena při definovaných vlnových délkách, což umožňuje současnou detekci a rozlišení mezi amplifikovanými cílovými sekvencemi WNV a IC.^{37, 38} Fluorescenční signál intaktních sond, které nejsou navázány na cílovou sekvenci, je potlačen tlumícím barvivem. Během kroku PCR amplifikace dochází kvůli hybridizaci sond se specifickým templátem jednořetězcové DNA k štěpení sondy 5'–3' exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy, která způsobí oddělení oznamovacího a tlumícího barviva a vznik fluorescenčního signálu. U každého PCR cyklu jsou generovány zvýšená množství rozštěpených sond a kumulativní signál oznamovacího barviva se postupně zvyšuje. Protože jsou dvě specifická oznamovací barviva měřena při definovaných vlnových délkách, je možná současná detekce a rozlišování mezi amplifikovanou cílovou sekvencí WNV a IC.

Reagencie a materiály

Reagencie a kontroly cobas® WNV

Všechny neotevřené reagencie a kontroly mají být uchovávány v souladu s doporučeními v Tab. 1 až Tab. 4.

Tab. 1 Test cobas® WNV

cobas® WNV			
Uchovávejte při 2–8 °C			
Kazeta pro 192 testů (P/N 09171142190)			
Kazeta pro 480 testů (P/N 09040927190)			
Součásti soupravy	Složky reagentů	Množství v soupravě	
		192 testů	480 testů
Roztok proteinázy (PASE)	Tris pufr, < 0,05 % EDTA, chlorid vápenatý, octan vápenatý, 8 % (w/v) proteináza EUH210: Na vyžádání je k dispozici bezpečnostní list. EUH208: obsahuje subtilisin z <i>Bacillus subtilis</i> . Může vyvolat alergickou reakci.	22,3 ml	38 ml
Vnitřní kontrola (IC)	Tris pufr, < 0,05 % EDTA, < 0,001 % konstrukt Armored RNA pro vnitřní kontrolu (neinfekční RNA enkapsulovaná v bakteriofágu MS2), < 0,002 % Poly rA RNA (syntetická), < 0,1 % azid sodný	21,2 ml	38 ml
Eluční pufr (EB)	Tris pufr, 0,2 % methyl-4-hydroxybenzoát	21,2 ml	38 ml
Reagencie Master Mix 1 (MMX-R1)	Octan hořečnatý, hydroxid draselný, < 0,1 % azid sodný	7,5 ml	14,5 ml
Reagencie WNV Master Mix 2 (WNV MMX-R2)	Tricinový pufr, octan draselný, glycerin, 18 % dimethylsulfoxid, Tween 20, EDTA, < 0,06 % dATP, dGTP, dCTP, < 0,14 % dUTP, < 0,01 % dopředné a zpětné primery WNV a vnitřní kontroly, < 0,01 % fluorescenčně značené sondy specifické pro WNV, < 0,01 % fluorescenčně značené sondy pro vnitřní kontrolu, < 0,01 % oligonukleotidový aptamer, < 0,01 % Z05D DNA polymeráza, < 0,01 % enzym AmpErase (uracil-N-glykosyláza) (mikrobiální), < 0,1 % azid sodný	9,7 ml	17,5 ml

Tab. 2 Kontrolní souprava cobas® WNV Control Kit**cobas® WNV Control Kit**

Uchovávat při 2–8 °C

(P/N 09040935190)

Součásti soupravy	Složky reagensů	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování*
Pozitivní kontrola WNV (WNV (+) C)	< 0,001 % syntetické (armored) RNA WNV enkapsulované v obalovém proteinu fágu MS2, normální lidská plazma, RNA WNV nedetekovatelná metodami PCR 0,1 % konzervant ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	  VAROVÁNÍ H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci. H412: Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. P261: Zamezte vdechování mlhy nebo par. P273: Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P280: Používejte ochranné rukavice. P333 + P313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P362 + P364: Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte. P501: Odstraňte obsah/obal předáním zařízení schválenému pro likvidaci odpadů. 55965-84-9 Reakční směs 5-chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu (3:1).

* Bezpečnostní označení produktů vychází primárně z pokynů GHS EU.

** Nebezpečná látka.

Tab. 3 Souprava negativní kontroly **cobas®** NHP Negative Control Kit**cobas® NHP Negative Control Kit**

Uchovávat při 2–8 °C

(P/N 09051554190)

Součásti soupravy	Složky reagensů	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování*
Negativní kontrola normální lidské plazmy (NHP-NC)	Normální lidská plazma, RNA WNV nedetekovatelná metodami PCR < 0,1% konzervant ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	  VAROVÁNÍ H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci. P261: Zamezte vdechování mlhy nebo par. P272: Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště. P280: Používejte ochranné rukavice. P333 + P313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. P362 + P364: Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím vyperte. P501: Odstraňte obsah/obal předáním zařízení schválenému pro likvidaci odpadů. 55965-84-9 Reakční směs 5-chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu (3:1).

* Bezpečnostní označení produktů vychází primárně z pokynů GHS EU.

** Nebezpečná látka.

Reagencie cobas omni pro přípravu vzorků

Tab. 4 Reagencie **cobas omni** pro přípravu vzorků*

Reagencie	Složky reagentů	Množství v soupravě	Bezpečnostní symboly a varování**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Uchovávat při 2–8 °C (P/N 06997546190)	Magnetické částice, Tris pufr, 0,1 % methyl-4-hydroxybenzoát, < 0,1 % azid sodný	480 testů	Nevztahuje se
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Uchovávat při 2–8 °C (P/N 06997511190)	Tris pufr, 0,1 % methyl-4-hydroxybenzoát, < 0,1 % azid sodný	4 × 875 ml	Nevztahuje se
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Uchovávat při 2–8 °C (P/N 06997538190)	42,56 % (w/w) guanidin-thiokyanát***, 5 % (w/v) polidokanol***, 2 % (w/v) dithiothreitol, dihydrát citrátu sodného	4 × 875 ml	 NEBEZPEČÍ H302: Zdraví škodlivý při požití. H314: Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. H411: Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. EUH032: Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami. EUH071: Způsobuje poleptání dýchacích cest. P273: Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P280: Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít/chrániče sluchu. P303 + P361 + P353: PŘI STYKU S KÚŽÍ (nebo s vlasy): veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou. P304 + P340 + P310: PŘI VDECHNUTÍ: přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P305 + P351 + P338 + P310: PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO/lékaře. P391: Uniklý produkt seberte. 593-84-0 Guanidin thiokyanát 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutan-2,3-diol
cobas omni Wash Reagent (WASH) Uchovávat při 15–30 °C (P/N 06997503190)	Dihydrát citrátu sodného, 0,1 % methyl-4-hydroxybenzoát	4,2 l	Nevztahuje se

* Testovací souprava **cobas® WNV** neobsahuje tato reagenty. Viz seznam dalších požadovaných materiálů (Tab. 7).

** Bezpečnostní označení produktů vychází primárně z pokynů GHS EU.

*** Nebezpečná látka.

Požadavky na uchovávání reagensů a manipulaci s nimi

Podmínky uchovávání reagensů a manipulace s nimi uvádí Tab. 5 a Tab. 6.

Pokud nejsou reagensy vloženy v systémech cobas® 6800/8800, uchovávejte je při odpovídající teplotě, kterou uvádí Tab. 5.

Tab. 5 Uchovávání reagensů (když nejsou vložena v systému)

Reagensie	Teplota uchovávání
cobas® WNV – 192	2–8 °C
cobas® WNV – 480	2–8 °C
cobas® WNV Control Kit	2–8 °C
cobas® NHP 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

Reagensy vložené do systémů cobas® 6800/8800 jsou uloženy při příslušných teplotách a systém monitoruje jejich dobu použitelnosti. Systém umožní používání reagensů, pouze pokud jsou splněny podmínky, které uvádí Tab. 6. Systém automaticky znemožňuje použití prošlých reagensů. Tab. 6 vysvětluje uživateli podmínky manipulace s reagensy, platné v systémech cobas® 6800/8800.

Tab. 6 Podmínky dodržování doby použitelnosti reagensů v systémech cobas® 6800/8800

Reagensie	Doba použitelnosti soupravy	Stabilita otevřené soupravy	Počet cyklů, pro který může být tato souprava použita	Stabilita na palubě (celková doba na palubě mimo chlazené úložiště)
cobas® WNV – 192	Doba zatím neuplynula	90 dnů od prvního použití	Maximálně 40 cyklů	Maximálně 40 hodin
cobas® WNV – 480	Doba zatím neuplynula	30 dnů od prvního použití	Maximálně 20 cyklů	Maximálně 20 hodin
cobas® WNV Control Kit	Doba zatím neuplynula	Nevztahuje se	Nevztahuje se	Maximálně 10 hodin
cobas® NHP Negative Control Kit	Doba zatím neuplynula	Nevztahuje se	Nevztahuje se	Maximálně 10 hodin
cobas omni Lysis Reagent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení*	Nevztahuje se	Nevztahuje se
cobas omni MGP Reagent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení*	Nevztahuje se	Nevztahuje se
cobas omni Specimen Diluent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení*	Nevztahuje se	Nevztahuje se
cobas omni Wash Reagent	Doba zatím neuplynula	30 dnů od vložení*	Nevztahuje se	Nevztahuje se

* Čas se měří od doby, kdy byla reagensie poprvé vložena do systémů cobas® 6800/8800.

Další potřebný materiál

Tab. 7 Materiály a spotřební materiál pro použití v systémech **cobas®** 6800/8800

Materiál	P/N
Destička pro zpracování vzorků cobas omni Processing Plate	05534917001
Destička pro amplifikaci cobas omni Amplification Plate	05534941001
Pipetovací špičky cobas omni Pipette Tips	05534925001
Nádoba na tekutý odpad 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
Vak na pevný odpad	07435967001
Nádoba na pevný odpad nebo	07094361001 nebo
Vak na pevný odpad s vložkou	08030073001

Požadované přístroje a software

Na přístroji (přístrojích) má být nainstalován software **cobas®** 6800/8800 a analytický balíček **cobas®** WNV. Se systémem je poskytnut server Instrument Gateway (IG). Je-li k dispozici, musí být nainstalován software **cobas®** Synergy.

Tab. 8 Přístroje

Systémy cobas® 6800/8800	P/N
Systém cobas® 6800 (pohyblivá platforma)	05524245001 a 06379672001
Systém cobas® 6800 (pevná platforma)	05524245001 a 06379664001
Systém cobas® 8800	05412722001
Modul zabezpečující vzorky	06301037001
Možnosti pro pipetování a tvorbu poolů	P/N
Přístroj cobas p 680	06570577001
Elektronická licence pro software cobas® Synergy (systémy cobas® 6800/8800) (volitelná)	07788339001
Hamilton MICROLAB® STAR IVD	04640535001
Hamilton MICROLAB® STARlet IVD	04872649001

Dodatečné informace o primárních a sekundárních vzorkových zkumavkách, které jsou kompatibilní s přístroji, najdete v Asistentu uživatele systémů **cobas®** 6800/8800 a Asistentu uživatele přístroje **cobas p** 680 nebo v Asistentu uživatele softwaru **cobas®** Synergy.

Pozn.: kontaktujte místního zástupce společnosti Roche ohledně podrobných seznamů pro objednávky stojánků na vzorky, stojánků pro ucpané špičky a podnosů pro stojánky, které se vejdou do přístrojů.

Bezpečnostní opatření a požadavky na manipulaci

Varování a bezpečnostní opatření

Jak je tomu při každém testovacím postupu, je pro správnou výkonnost tohoto testu zásadním požadavkem dodržovat principy správné laboratorní praxe. Vzhledem k vysoké senzitivitě testu je třeba dbát opatrnosti, aby mezi reagensii a amplifikačními směsmi nedošlo ke kontaminaci.

- Pouze pro účely diagnostiky *in vitro*.
- Se všemi vzorky je nutno zacházet, jako by byly infekční, za použití správných laboratorních postupů popsanych v publikaci Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories a v dokumentu CLSI číslo M29-A4.^{39, 40} Tento postup smí provádět pouze personál zkušený v zacházení s infekčními vzorky a obeznámený s použitím testu **cobas® WNV**, systémů **cobas® 6800/8800** a volitelně přístroje **cobas p 680** nebo pipetoru Hamilton MICROLAB® STAR/STARlet IVD se softwarem **cobas® Synergy**.
- Veškeré materiály pocházející z lidských zdrojů by měly být považovány za potenciálně infekční a musí se s nimi zacházet dle všeobecných bezpečnostních opatření. Pokud dojde k rozlití vzorku, ihned místo dezinfikujte čerstvě připraveným roztokem 0,6% chlornanu sodného v destilované nebo deionizované vodě nebo postupujte dle vlastních vhodných procedur laboratoře.
- Kontrolní sada pro test **cobas® WNV Control Kit** a negativní kontrolní sada pro test **cobas® NHP Negative Control Kit** obsahuje plazmu z lidské krve. Testování normální lidské plazmy metodami PCR také neprokázalo žádnou detekovatelnou RNA WNV. Nicméně žádná známá testovací metoda nepředstavuje dokonalou záruku, že se s deriváty z lidské krve nepřenesou nějaká infekční agens.
- Plnou krev nezmrazujte.
- Doporučuje se používat sterilní pipety na jedno použití a certifikované pipetovací špičky bez nukleáz. Pro zajištění optimální výkonnosti testu používejte pouze spotřební materiál, který je součástí dodávky, nebo specifikovaný požadovaný materiál.
- Pečlivě dodržujte uvedené postupy a předpisy, aby se zajistilo správné provedení testů. Jakákoliv odchylka od postupů a předpisů může negativně ovlivnit optimální výkonnost testu.
- Narušení rozhraní mezi buňkami a plazmou nebo rozptýlení materiálu po centrifugaci může vést k vyšším neplatným hodnotám.
- Pokud nebude během manipulace a zpracování vzorků patřičně kontrolována kontaminace přenosem, mohou vzniknout falešně pozitivní výsledky.
- Pokud dojde k jakýmkoli závažným incidentům během použití tohoto testu, informujte o tom místní odpovědný orgán.

Manipulace s reagensii

- Aby nedošlo u vzorků nebo kontrol ke kontaminaci přenosem, zacházejte se všemi reagensii, kontrolami a vzorky podle zásad správné laboratorní praxe.
- Před použitím vizuálně zkontrolujte každou reagenční kazetu, diluent, lyzační reagenii a mycí reagenii, zda nejeví žádné známky prosakování. Pokud známky prosakování vykazuje, nepoužívejte tento materiál k testování.
- Lyzační reagenie **cobas omni** Lysis Reagent obsahuje potenciálně nebezpečnou látku guanidinthiokyanát. Vyhněte se kontaktu reagenii s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud dojde ke kontaktu, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody, jinak může dojít k popáleninám.

- Testovací soupravy **cobas® WNV**, reagencie **cobas omni** MGP Reagent a diluent **cobas omni** Specimen Diluent obsahují konzervační prostředek azid sodný. Vyhněte se kontaktu reagensů s pokožkou, očima nebo sliznicemi. Pokud dojde ke kontaktu, okamžitě postiženou oblast omyjte velkým množstvím vody, jinak může dojít k popáleninám. Pokud se reagencie rozlije, zředte ji před vytřením dosucha vodou.
- Lyzační reagencie **cobas omni** Lysis Reagent, jež obsahuje guanidinthiokyanát, se nesmí dostat do styku s roztokem chlornanu sodného (bělicím prostředkem). Tato směs vytváří vysoce toxický plyn.
- Bezpečnostní listy (SDS) zašle na vyžádání Váš místní zástupce společnosti Roche.
- Všechny materiál, který se dostal do kontaktu se vzorky a reagensy, zlikvidujte dle celostátních, respektive místních předpisů.

Správná laboratorní praxe

- Nepipetujte ústy.
- V pracovních laboratorních prostorách nejezte, nepijte a nekuřte.
- Při manipulaci se vzorky a reagensy používejte laboratorní rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle. Při přechodu od manipulace se vzorky k manipulaci se soupravami testu **cobas® WNV** a reagensy **cobas omni** je nutno vyměnit rukavice, aby nedošlo ke kontaminaci. Zabraňte kontaminaci rukavic při manipulaci se vzorky a kontrolami.
- Po manipulaci se vzorky a reagensy soupravy si důkladně umyjte ruce, jakož i po svléknutí rukavic.
- Všechny pracovní plochy důkladně očistěte a vydezinfikujte čerstvě připraveným 0,6% roztokem chlornanu sodného v destilované nebo deionizované vodě. Dále povrch otřete 70 % etanolem.
- Pokud dojde k rozlití kapaliny na systémy **cobas® 6800/8800**, řádně povrch systémů vyčistěte a dekontaminujte podle pokynů v Asistentu uživatele systémů **cobas® 6800/8800**.

Odběr, přeprava, uchovávání a poolování vzorků

Pozn.: zacházejte se vzorky a kontrolami jako s potenciálně infekčním materiálem.

Všechny vzorky dárců uchovávejte při stanovených teplotách.

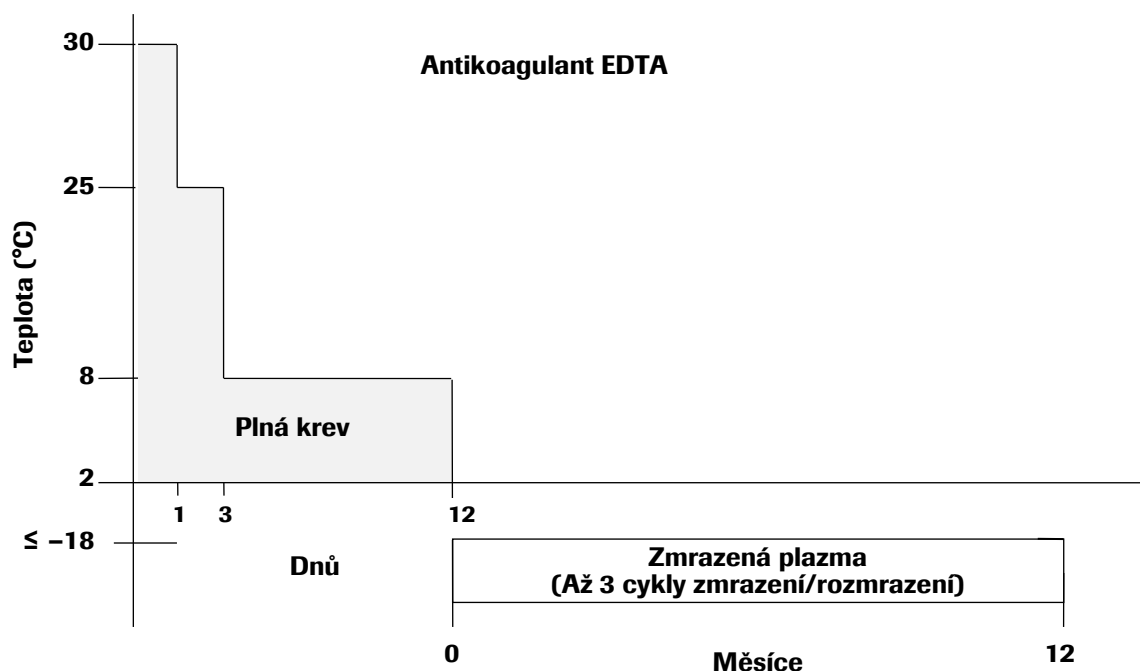
Zvýšené teploty ovlivňují stabilitu vzorků.

Vzorky krve žijících dárců

- Pro test cobas® WNV může být použita plazma s antikoagulanty EDTA, CPD, CPDA1 a CP2D. Postupujte dle pokynů výrobce zkumavky/vaku na odběr vzorků týkajících se manipulace a odstředování.
- Krev odebraná do zkumavek s antikoagulantem EDTA, zkumavek pro přípravu plazmy EDTA Plasma Preparation Tubes společnosti Becton-Dickinson (BD PPT™) nebo plazmových zkumavek se separačním gelem K2EDTA společnosti Greiner Vacuette® K2EDTA Plasma Gel Tubes může být před vkládáním, možným poolováním nebo opakovaným testováním navíc centrifugována rychlostí 600 × g po dobu 5 minut.
- Krev odebraná s antikoagulantem EDTA může být uchovávána až po dobu 12 dnů za následujících podmínek:
 - Vzorky je nutno odstředit do 72 hodin po odběru.
 - Při uchovávání vzorků při teplotě nad 8 °C lze vzorky uchovávat po dobu 72 hodin při teplotě do 25 °C a z těchto 72 hodin mohou být 24 hodin při teplotě do 30 °C.

S výjimkou výše uvedeného se vzorky uchovávají při teplotě 2–8 °C. Navíc lze plazmu oddělenou od buněk uchovávat až po dobu 12 měsíců při teplotě ≤ –18 °C se třemi cykly zmrazení a rozmrazení. Viz Obr. 1.

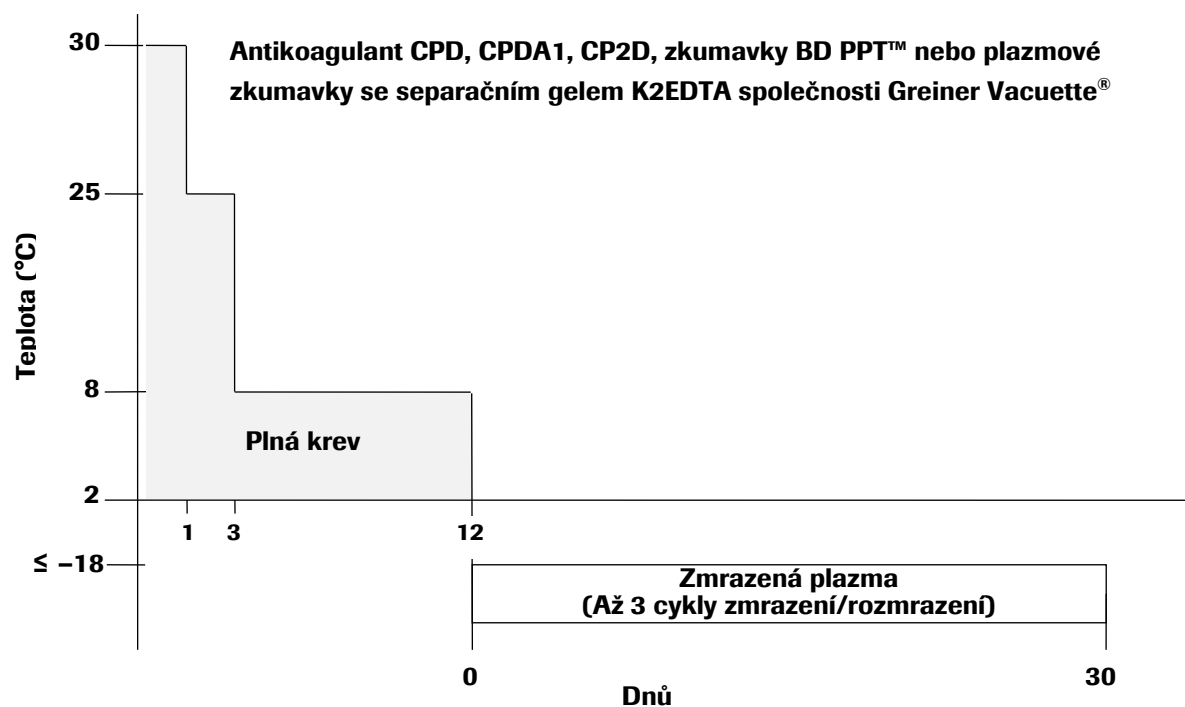
Obr. 1 Podmínky uchovávání vzorků s antikoagulantem EDTA



- Krev odebraná do zkumavek s antikoagulantem CPD, CPDA1 nebo CP2D, zkumavek na přípravu plazmy s EDTA společnosti Becton-Dickinson (BD PPT™) nebo gelových zkumavek na plazmu K2EDTA společnosti Greiner Vacuette® může být uchovávána až po dobu 12 dnů za následujících podmínek:
 - Vzorky je nutno odstředit do 72 hodin po odběru.
 - Při uchovávání vzorků při teplotě nad 8 °C lze vzorky uchovávat po dobu 72 hodin při teplotě do 25 °C a z těchto 72 hodin mohou být 24 hodin při teplotě do 30 °C.

S výjimkou výše uvedeného se vzorky uchovávají při 2–8 °C. Navíc lze plazmu oddělenou od buněk uchovávat až po 30 dnů při teplotě ≤ -18 °C se třemi cykly zmrazení a rozmrazení. Viz Obr. 2.

Obr. 2 Podmínky uchovávání vzorků žijících dárců

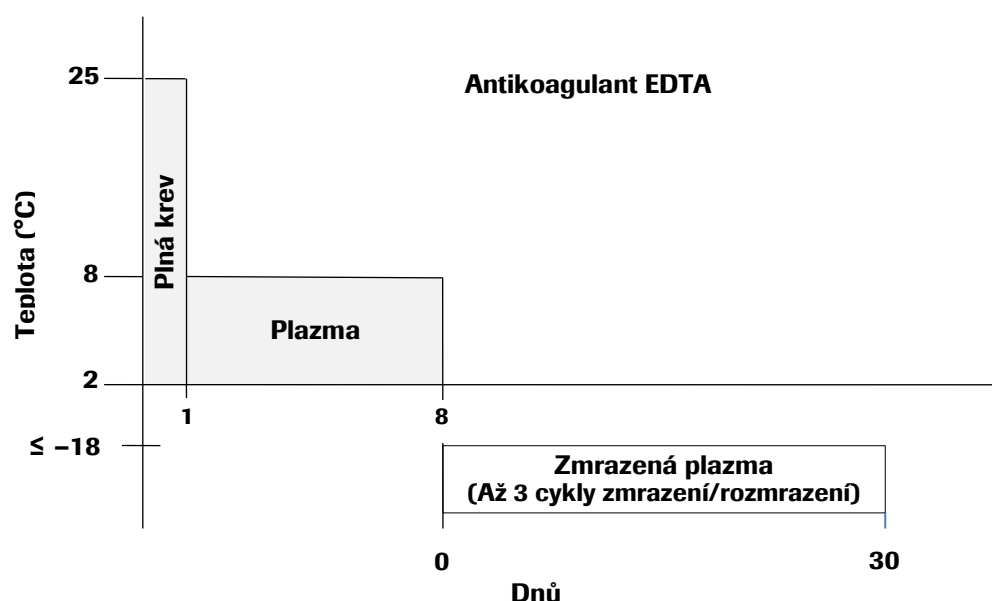


Kadaverózní krevní vzorky

- Kadaverózní krevní vzorky odebrané do zkumavek s antikoagulantem EDTA nebo do srážecích zkumavek na sérum lze použít s testem **cobas® WNV**. Postupujte dle pokynů výrobce zkumavky/vaku na odběr vzorků týkajících se manipulace a odstředování.
- Kadaverózní krev odebraná s antikoagulantem EDTA může být uchovávána až po dobu 8 dnů při teplotě 2–8 °C za následujících podmínek:
 - Vzorky je nutné odstředít a plazmu separovat od buněk do 24 hodin od odběru.
 - Při uchovávání vzorků při teplotě nad 8 °C lze vzorky uchovávat při teplotě do 25 °C po dobu 24 hodin.

S výjimkou výše uvedeného lze vzorky kadaverózní EDTA plazmy oddělené od buněk uchovávat až 30 dnů při teplotě ≤ -18 °C. Viz Obr. 3.

Obr. 3 Podmínky uchovávání kadaverózních vzorků



- Vzorky kadaverózní krve odebrané do sérových srážecích zkumavek mohou být skladovány až po dobu 4 dnů při teplotě 2–8 °C za následujících podmínek:
 - Vzorky je nutné odstředít a sérum separovat od buněk do 24 hodin od odběru.
 - Při uchovávání vzorků při teplotě nad 8 °C lze vzorky uchovávat při teplotě do 25 °C po 4 hodin z těchto 24 hodin.

S výjimkou výše uvedeného lze vzorky séra odděleného od buněk uchovávat až 14 dnů při teplotě ≤ -18 °C se třemi cykly zmrazení a rozmrazení.

- Pokud mají být vzorky žijících dárců a/nebo kadaverózní vzorky přepravovány, musí být zabaleny a označeny dle platných státních anebo mezinárodních předpisů o přepravě vzorků a etiologických agens.

Návod k použití

Automatické pipetování a poolování vzorků (volitelné)

Přístroj **cobas p 680** nebo software **cobas® Synergy** s pipetorem Hamilton MICROLAB® STAR/STARlet lze použít jako volitelné zařízení se systémy **cobas® 6800/8800** k automatickému pipetování a poolování alikvotů většího počtu primárních vzorků do jednoho poolovaného vzorku.

Další informace najdete v Asistentu uživatele přístroje **cobas p 680** nebo Asistentu uživatele softwaru **cobas® Synergy**.

Procesní poznámky

- Nepoužívejte reagentie testu **cobas® WNV**, kontrolní soupravy **cobas® WNV Control Kit**, soupravy negativní kontroly **cobas® NHP Negative Control Kit** ani reagentie **cobas omni** po uplynutí jejich doby použitelnosti.
- Nepoužívejte spotřební materiál opakovaně. Slouží pouze k jednorázovému použití.
- Pokyny k řádné údržbě přístrojů najdete v Asistentu uživatele k systémům **cobas® 6800/8800**.

Provedení testu cobas® WNV

Postup testu je podrobně popsán v Asistentu uživatele systémů **cobas® 6800/8800**; informace o volitelných postupech tvorby poolů naleznete v Asistentu uživatele pro přístroj **cobas p 680** nebo Asistentu uživatele softwaru **cobas® Synergy**.

Obr. 4 níže uvádí souhrn postupu.

Obr. 4 Postup testu **cobas® WNV**

1	Pipetování a poolování vzorků
2	Vytvořte objednávku
3	Doplňte reagentie a spotřební materiál podle pokynů systému: • Doplněte mycí reagentii, lyzační reagentii a diluent • Doplněte destičky ke zpracování a destičky k amplifikaci • Doplněte magnetické skleněné částice • Doplněte reagentie specifické pro test • Doplněte kazety s kontrolami • Doplněte stojánky na špičky • Vyměňte stojánek na ucpané špičky za nový
4	Spusťte běh: • Vložte stojánky se vzorky • Stiskněte tlačítko Start na uživatelském rozhraní
5	Zkontrolujte a exportujte výsledky
6	Vyjměte spotřební materiál: • Vyjměte amplifikační destičky z analytického modulu • Vyjměte prázdné kontrolní kazety • Vyprázdněte pevný odpad • Vyprázdněte tekutý odpad

Výsledky

Systémy cobas® 6800/8800 automaticky detekují RNA WNV současně ve vzorcích a kontrolách.

Kontrola kvality a platnost výsledků

- S každou dávkou je zpracována jedna negativní [(-) C] a jedna pozitivní kontrola [WNV (+) C].
- Ověřte platnost dávky v softwaru systému cobas® 6800/8800 a/nebo ve zprávě tak, že zkontrolujete značky (Flags) a související výsledky.
- Dávka je platná, pokud se u obou kontrol neobjeví žádné značky.

Software cobas® 6800/8800 vyhlašuje neplatnost výsledků automaticky na základě selhání negativních a pozitivních kontrol.

Kontrolní značky

Tab. 9 Kontrolní značky u negativních a pozitivních kontrol

Negativní kontrola	Značka	Výsledek	Interpretace
(-) C	Q02	Invalid	Celá dávka je označena jako neplatná, pokud je výsledek pro (-) C neplatný.
Pozitivní kontrola	Značka	Výsledek	Interpretace
WNV (+) C	Q02	Invalid	Celá dávka je označena jako neplatná (invalid), pokud je výsledek pro WNV (+) C neplatný.

Pokud je dávka neplatná, opakujte testování celé dávky včetně vzorků a kontrol.

Vyhodnocení výsledků

U každé platné dávky zkontrolujte u všech individuálních vzorků přítomnost značek v software cobas® 6800/8800 nebo ve zprávě. Interpretace výsledků je následující:

- Platná dávka může zahrnovat platné i neplatné výsledky vzorků dárců podle toho, zda se u jednotlivých vzorků objeví značky resp. komentáře nebo ne.
- Výsledky vzorku jsou platné jen pokud jsou platné příslušné pozitivní kontroly i negativní kontrola pro dotýčnou dávku.

U každého vzorku jsou současně měřeny dva parametry: WNV a interní kontrola. Software systému připraví zprávu o konečných výsledcích testu cobas® WNV. Kromě celkových výsledků zobrazí software cobas® 6800/8800 také individuální cílové výsledky, které je třeba interpretovat následovně:

Tab. 10 Cílové výsledky pro jednotlivé interpretace cílových výsledků

Cílové výsledky	Interpretace
WNV Non-Reactive	Nebyl detekován cílový signál pro WNV; signál IC byl detekován.
WNV Reactive	Byl detekován cílový signál pro WNV; signál IC může, ale nemusí být detekován.
Invalid	Cílový signál ani signál vnitřní kontroly nebyly detekovány.

Pokud používáte software cobas® Synergy, zkontrolujte výpočet konečného výsledku pomocí softwaru cobas® Synergy.

Opakované testování individuálních vzorků

Vzorkové zkumavky s konečným výsledkem „Invalid“ pro daný cíl vyžadují opakované testování.

Další centrifugace při rychlosti $600 \times g$ po dobu 5 minut může pomoci redukovat opakované neplatné výsledky pro krev odebranou do zkumavek na přípravu plazmy s EDTA antikoagulantem, zkumavek EDTA Plasma Preparation Tubes společnosti Becton-Dickinson (BD PPT™) nebo plazmových zkumavek s gelem K2EDTA společnosti Greiner Vacuette®.

Procesní omezení

- Test **cobas® WNV** byl vyhodnocen pouze při použití v kombinaci s kontrolní soupravou **cobas® WNV Control Kit**, soupravou negativní kontroly **cobas® NHP Negative Control Kit**, reagensií **cobas omni MGP Reagent**, lyzační reagensií **cobas omni Lysis Reagent**, diluentem **cobas omni Specimen Diluent** a mycí reagensií **cobas omni Wash Reagent** spolu se systémy **cobas® 6800/8800**.
- Spolehlivost výsledků závisí na dodržování řádných postupů při odběru a uchovávání vzorků i při manipulaci s nimi.
- S tímto testem nepoužívejte heparinizovanou plazmu, protože je známo, že heparin působí inhibičně na PCR.
- Detekce RNA WNV závisí na tom, kolik virových částic je ve vzorku přítomno, na což má vliv odběr vzorků, skladování a manipulace s nimi, faktory pacienta (např. věk, přítomnost příznaků) a/nebo stádium infekce a velikost směsi.
- I když se vyskytují vzácně, mutace ve vysoce konzervovaných oblastech virového genomu pokryté testem **cobas® WNV** mohou ovlivnit vázání primerů anebo sond, a tak vést k selhání detekce viru.
- Vzhledem k rozdílům mezi technologiemi se doporučuje, aby uživatelé před přechodem od jedné technologie k druhé provedli ve své laboratoři studie pro stanovení rozdílů mezi těmito technologiemi. Uživatelé by měli dodržovat své vlastní zásady/postupy.

Hodnocení neklinické výkonnosti

Klíčové funkční charakteristiky testu – vzorky žijících dárců

Mez detekce (*Limit of Detection*, LoD)

Sekundární standard /izolát viru společnosti Roche

Meze detekce (LoD) testu cobas® WNV pro RNA WNV linie 1 a 2 byly stanoveny pomocí následujícího standardu:

- Sekundární standard společnosti Roche pro WNV linie 1, kalibrováný oproti kanadskému referenčnímu zdravotnickému standardu WNV (Infectious Diseases, Canadian Blood Services, 1800 Alta Vista, Ottawa, Ontario, K1G 4J5)
- Izolát WNV linie 2 ISS0513 poskytl středisko National Centre for Immunobiologicals Research and Evaluation, Istituto Superiore di Sanità (ISS), Řím, Itálie⁴¹

Pro Sekundární standard společnosti Roche byly připraveny tři nezávislé série ředění linie 1 WNV pomocí normální lidské EDTA plazmy negativní na virus (WNV). Každá řada ředění byla testována pomocí tří různých šarží souprav testu cobas® WNV s 21 replikáty na šarži, celkem 189 replikátů na jednu koncentraci.

Pro izolát linie 2 WNV byly připraveny panely ředěním zásobního materiálu do normální lidské EDTA plazmy negativní na virus (WNV). Každá série ředění byla testována pomocí tří různých šarží souprav testu cobas® WNV s 8 replikáty na šarži, celkem 72 replikátů na jednu koncentraci.

U virů WNV linie 1 a 2 byla použita 95% PROBIT analýza (Tab. 11) a 50% PROBIT analýza (Tab. 12) dat kombinovaných ze všech sérií ředění a šarží činidel pro odhad LoD i spodní a horní meze 95% intervalu spolehlivosti. Souhrn míry reaktivity pozorované ve studiích LoD pro linii 1 a 2 uvádí Tab. 13 a Tab. 14.

Tab. 11 Výsledky 95% PROBIT analýzy LoD dat ve vzorcích EDTA plazmy s virovým standardem

Analyt	Jednotky měření	LoD	Dolní 95% mez spolehlivosti	Horní 95% mez spolehlivosti
WNV linie 1	kopii/ml	12,9	10,8	16,3
WNV linie 2	kopii/ml	6,2	4,8	8,9

Tab. 12 Výsledky 50% PROBIT analýzy LoD dat ve vzorcích EDTA plazmy s virovým standardem

Analyt	Jednotky měření	LoD	Dolní 95% mez spolehlivosti	Horní 95% mez spolehlivosti
WNV linie 1	kopii/ml	2,1	1,9	2,4
WNV linie 2	kopii/ml	1,1	0,8	1,3

Konverzní faktor odvozený od 1. mezinárodního standardu WHO pro RNA západonilského viru (WNV), kód NIBSC 18/206, je 0,47 IU/kopii. Konverzní faktor byl stanoven pomocí sekundárního standardu společnosti Roche a lze jej použít pro linii 1 a linii 2.

Tab. 13 Souhrn míry reaktivity pro WNV linie 1 v EDTA plazmě

Koncentrace RNA WNV (kopíí/ml)	Počet reaktivních	Počet platných replikátů	% reaktivních	Dolní mez spolehlivosti 95 % (jednostranná)
18,0	187	188	99,5 %	97,5 %
9,0	173	188	92,0 %	88,0 %
4,5	139	188	73,9 %	68,1 %
2,7	93	189	49,2 %	43,0 %
0,9	53	189	28,0 %	22,7 %

Tab. 14 Souhrn míry reaktivity pro WNV linie 2 v EDTA plazmě

Koncentrace RNA WNV (kopíí/ml)	Počet reaktivních	Počet platných replikátů	% reaktivních	Dolní mez spolehlivosti 95 % (jednostranná)
22,8	72	72	100,0 %	95,9 %
15,2	72	72	100,0 %	95,9 %
7,6	69	72	95,8 %	89,6 %
3,8	64	72	88,9 %	80,8 %
2,3	53	72	73,6 %	63,7 %
0,8	30	72	41,7 %	31,8 %

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost testu **cobas®** WNV na systémech **cobas®** 6800/8800 byla pro WNV linie 1 zjištěna pomocí následujících standardů Roche. Tato studie zahrnovala testování tří panelů WNV při koncentracích přibližně 18, 9 a 4,5 kopií/ml. Testovány byly následující složky variability:

- variabilita mezi jednotlivými dny po dobu tří dnů
- variabilita mezi jednotlivými šaržemi s použitím tří různých šarží činidel testu **cobas®** WNV
- variabilita mezi jednotlivými přístroji s použitím tří různých systémů **cobas®** 8800

U každého ze tří panelů bylo testováno dvacet jedna replikátů s celkovým počtem 189 replikátů na každou šarží činidel. Veškeré informace o reprodukovatelnosti byly vyhodnoceny výpočtem procentního podílu reaktivních výsledků testů pro každou hladinu koncentrace a pro všechny složky variability.

Meze dvoustranných 95% intervalů spolehlivosti pro každou míru reaktivity byly vypočteny pro každou ze tří hladin WNV testovaných po tři dny u tří šarží činidel a tří systémů **cobas®** 8800. Test **cobas®** WNV je reprodukovatelný při použití po dobu většího počtu dnů s větším počtem šarží činidel a větším počtem přístrojů. Souhrn výsledků variability mezi šaržemi reagensů uvádí Tab. 15.

Tab. 15 Souhrn reprodukovatelnosti testu **cobas®** WNV mezi šaržemi reagensů

Analyt	Koncentrace (kopií/ml)	Šarže reagensie	% reaktivních (počet reaktivních/počet platných replikátů)	Dolní mez 95% intervalu spolehlivosti	Horní mez 95% intervalu spolehlivosti
WNV	18,0	1	98,4 % (62/63)	91,5 %	100,0 %
		2	100 % (63/63)	94,3 %	100,0 %
		3	100 % (63/63)	94,2 %	100,0 %
	9,0	1	92,1 % (58/63)	82,4 %	97,4 %
		2	98,4 % (62/63)	91,5 %	100,0 %
		3	85,5 % (53/62)	74,2 %	93,1 %
	4,5	1	64,5 % (40/62)	51,3 %	76,3 %
		2	77,8 % (49/63)	65,5 %	87,3 %
		3	79,3 % (50/63)	67,3 %	88,5 %

Inkluzivita

Výkonnost testu **cobas® WNV** při detekci variant flaviviru WNV byl stanoven testováním jedinečných kultivovaných izolátů pro každou variantu. Celkem 10 jednotlivých pozitivních kultivovaných izolátů WNV linie 1 bylo testováno po zředění normální lidské EDTA plazmy negativní na virus (WNV) při koncentraci přibližně 36 kopií/ml. Všechny 10 kultivovaných vzorků bylo detekováno (Tab. 16).

Pro příbuzné viry rodu Flavivirus byly testovány celkem 2 pozitivní kultivované izoláty viru japonské encefalitidy (JEV) ve 4 replikátech po zředění normální lidskou EDTA plazmou negativní na virus (WNV). Celkem jeden pozitivní kultivovaný izolát viru Saint Louisské encefalitidy (SLEV), encefalitidy Murray Valley (MVEV) a viru Kunjin (KUNV) byl testován s použitím čtyř replikátů každého izolátu po přípravě logaritmických ředění normální lidské plazmy s citrátem negativní na virus (WNV). Všechny kultivované izoláty byly detekovány (Tab. 17).

Tab. 16 Kultivované izoláty WNV linie 1

Varianty flaviviru	Koncentrace (kopií/ml)	% reaktivních (počet reaktivních / počet testovaných vzorků)
WNV 1	36	100,0 % (10/10)

Tab. 17 Kultivované izoláty příbuzných virů rodu Flavivirus

Ředění vzorku	% reaktivních (počet reaktivních/počet platných testovaných replikátů)			
	JEV	SLEV	MVEV	KUNV
1:1,00E+02	100 % (8/8)	100 % (4/4)	100 % (4/4)	100 % (4/4)
1:1,00E+03	100 % (8/8)	100 % (4/4)	100 % (4/4)	100 % (4/4)
1:1,00E+04	100 % (8/8)	100 % (4/4)	100 % (4/4)	100 % (4/4)
1:1,00E+05	100 % (8/8)	100 % (4/4)	100 % (4/4)	100 % (4/4)
1:1,00E+06	100 % (8/8)	100 % (4/4)	100 % (4/4)	100 % (4/4)
1:1,00E+07	100 % (8/8)	100 % (4/4)	100 % (4/4)	100 % (4/4)

Kultivovaný izolát viru Usutu byl rovněž testován ve 3 replikátech po zředění normální lidskou EDTA plazmou negativní na virus (WNV) na koncentraci 1,0E+06 kopií/ml. Všechny tři replikáty byly detekovány.

Analytická specifita

Analytická specifita testu **cobas® WNV** byla vyhodnocena na zkříženou reaktivitu u 27 mikroorganismů při koncentraci 10^6 částic, kopií nebo PFU/ml, včetně 19 virových izolátů, šesti bakteriálních kmenů a jednoho kvasinkového izolátu (Tab. 18). Mikroorganismy byly přidány do normální lidské EDTA plazmy negativní na virus (WNV) a testovány bez WNV a s WNV přidáním v koncentraci přibližně $3 \times \text{LoD}$ testu **cobas® WNV**. U testovaných mikroorganismů nedocházelo ke zkřížené reakci s testem **cobas® WNV** ani k jeho narušování.

Tab. 18 Mikroorganismy testované na analytickou specifitu

Viry	Flavivirus	Baktérie	Kvasinky
Adenovirus 5	Virus horečky Dengue typ 1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Cytomegalovirus		<i>Propionibacterium acnes</i>	
Virus Epstein-Barrové		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Virus herpes simplex typu 1		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Virus herpes simplex typu 2		<i>Streptococcus viridans</i>	
Virus hepatitidy A		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	
Virus hepatitidy B			
Virus hepatitidy C			
Virus hepatitidy E			
Virus hepatitidy G			
Virus selhání lidské imunity (HIV-1 skupiny M)			
Virus selhání lidské imunity (HIV-2)			
Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ I			
Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ II			
Lidský papilloma virus 6B			
Virus chřipky A			
Virus Chikungunya			
Varicella zoster virus			

Vzorky plazmy z každého stavu onemocnění (Tab. 19) byly testovány bez WNV a s WNV přidáním v koncentraci přibližně $3 \times \text{LoD}$ testu **cobas® WNV**. U těchto stavů onemocnění nedocházelo ke zkřížené reakci s testem **cobas® WNV** ani k jeho narušování.

Tab. 19 Vzorky onemocnění testované na analytickou specifitu

Onemocnění		
Adenovirus typ 5	Virus hepatitidy A	Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ II
Cytomegalovirus	Virus hepatitidy B	Virus herpes simplex typu 1
Virus horečky Dengue	Virus hepatitidy C	Virus herpes simplex typu 2
Virus Epstein-Barrové	Lidský T-buněčný lymfotropní virus typ I	Virus selhání lidské imunity (HIV-1)

Analytická specifická – interferenční látky

Endogenní interferující látky

Vzorky plazmy s abnormálně vysokými úrovněmi triglyceridů (až do 35,3 g/l), hemoglobinu (až do 4,7 g/l), nekonjugovaného bilirubinu (až do 0,21 g/l), albuminu (až do 61,3 g/l) nebo lidské DNA (až do 0,004 g/l) byly testovány bez WNV a s přidáním WNV při koncentraci přibližně $3 \times \text{LoD}$ testu **cobas® WNV**. Vzorky obsahující tyto endogenní látky nenarušovaly senzitivitu ani specifitu testu **cobas® WNV**.

Exogenní interferující látky

Vzorky negativní lidské EDTA plazmy negativní na virus (WNV) obsahující abnormálně vysoké koncentrace léků (Tab. 20) byly testovány bez WNV a s WNV přidáním v koncentraci přibližně $3 \times \text{LoD}$ testu **cobas® WNV**. Tyto exogenní látky nenarušovaly senzitivitu ani specifitu testu **cobas® WNV**.

Tab. 20 Klinické vzorky testované s léky

Název testovaného léku	Koncentrace
Paracetamol	1324 µmol/l
Kyselina acetylsalicylová	3620 µmol/l
Kyselina askorbová	342 µmol/l
Atorvastatin	600 µg Eq/l
Fluoxetin	11,2 µmol/l
Ibuprofen	2425 µmol/l
Loratadin	0,78 µmol/l
Nadolol	3,88 µmol/l
Naproxen	2170 µmol/l
Paroxetin	3,04 µmol/l
Fenylefrin hydrochlorid	491 µmol/l
Sertralin	1,96 µmol/l

Korelace

Vyhodnocení výkonnosti testu cobas® WNV ve srovnání s testem cobas® TaqScreen WNV

Výkonnost testu cobas® WNV a testu cobas® TaqScreen WNV byla porovnána s použitím 100 jednotlivých vzorků EDTA plazmy pozitivní na NAT, které byly testovány neředěné a zředěné v poměru 1:6. Navíc bylo oběma metodami testováno 100 neředěných vzorků EDTA plazmy negativních na WNV.

Negativní vzorky na WNV vykazaly 100% specifitu a poskytly 100 nereaktivních výsledků ze 100 vzorků u obou metod.

Výsledky obou metod u pozitivních vzorků souhlasily na základě McNemarova testu, což prokázalo, že výkonnost testu cobas® WNV a testu cobas® TaqScreen WNV je ekvivalentní (Tab. 21).

Tab. 21 Korelace mezi pozitivními vzorky

Metody		Výsledky WNV	
Test cobas® TaqScreen WNV	cobas® WNV	Neředěný	Zředěný 1:6
Nereaktivní	Nereaktivní	0	0
Reaktivní	Nereaktivní	0	1*
Nereaktivní	Reaktivní	0	1*
Reaktivní	Reaktivní	100	98
Celkem		100	100
p hodnota McNemarova testu, (dvoustranný interval, $\alpha = 0,05$)		1,0	1,0

* Stejný vzorek byl testován neředěný (< 100 kopií/ml Národním genetickým institutem s použitím testu WNV RNA SuperQuant) a u obou testů byl reaktivní.

Selhání celého systému

Míra selhání celého systému testu cobas® WNV byla zjištěna testováním 100 replikátů EDTA plazmy s přidaným virem WNV. Tyto vzorky byly testovány při cílové koncentraci přibližně $3 \times \text{LoD}$ a byly analyzovány v poolu 1 (bez ředění). Studie byla provedena pomocí systému cobas® 8800 s přístrojem cobas p 680 (pipetování a poolování).

Z výsledků této studie vyplynulo, že všechny replikáty byly reaktivní pro každý cílový virus WNV, což znamená výslednou míru selhání celého systému ve výši 0 %. Dvoustranný 95% přesný interval spolehlivosti byl 0 % pro dolní mez a 3,62 % pro horní mez [0 %: 3,62 %].

Klíčové charakteristiky výkonu testu – kadaverózní vzorky

Senzitivita

Klinická senzitivita testu **cobas® WNV** pro RNA WNV byla vyhodnocena testováním celkem 60 jednotlivých virově negativních kadaverózních vzorků, z nichž 35 bylo klasifikováno jako středně hemolyzované (slámově žlutá až růžová barva) a 25 jako silně hemolyzované (červená až hnědá barva). Navíc bylo testováno celkem 60 jednotlivých virově negativních vzorků žijících dárců. Všechny kadaverózní vzorky a vzorky žijících dárců byly rovnoměrně rozděleny mezi tři šarže činidel a pět skupin pro přidání klinických vzorků (WNV) se 12 vzorky na každou skupinu. Ke každému kadaveróznímu vzorku a vzorku žijícího dárce byly přidány jedinečné klinické vzorky (WNV) při koncentraci přibližně $5 \times \text{LoD}$ příslušného vzorku. Každý kadaverózní vzorek byl v přístroji zředěn 1:5,6 roztokem pro ředění vzorků **cobas omni** Specimen Diluent a zpracován postupem pro testování kadaverózních vzorků.

Všechny kadaverózní vzorky i vzorky žijících dárců vykázaly 100% míru reaktivity (95% interval spolehlivosti: 94,0–100 %). Klinická senzitivita pozorovaná u kadaverózních vzorků odpovídala senzitivě zjištěné Fisherovým exaktním testem u vzorků žijících dárců; souhrn uvádí Tab. 22.

Tab. 22 Souhrn míry reaktivity kadaverózních vzorků EDTA plazmy a vzorků EDTA plazmy žijících dárců

Analyt	Kadaverózní vzorek	Vzorek žijícího dárce
	% reaktivních (počet reaktivních / počet testovaných vzorků)	% reaktivních (počet reaktivních / počet testovaných vzorků)
WNV	100 % (60/60)	100 % (60/60)
Fisherův exaktní test, hodnota p ($\alpha = 0,05$)	Míra reaktivity nevykazuje významné rozdíly ($p = 1,000$)	

Specifická

Specifická testu **cobas® WNV** u kadaverózních vzorků EDTA plazmy a séra byla vyhodnocena a srovnána se specifickou vzorků žijících dárců testováním 64 jednotlivých kadaverózních vzorků EDTA plazmy, z nichž 40 vzorků jednotlivých dárců bylo klasifikováno jako středně hemolyzované (slámově žlutá až růžová barva) a 24 jako silně hemolyzované (červená až hnědá barva), 62 jednotlivých kadaverózních vzorků séra, z nichž 42 vzorků jednotlivých dárců bylo klasifikováno jako středně hemolyzované a 20 jako silně hemolyzované, 60 individuálních sérově negativních vzorků plazmy žijících dárců a 60 individuálních vzorků plazmy od živých dárců. Studie byla provedena se třemi nezávislými šaržemi činidel pro test **cobas® WNV**. Každý kadaverózní vzorek byl v přístroji zředěn 1:5,6 roztokem pro ředění vzorků **cobas omni** Specimen Diluent a zpracován postupem pro testování kadaverózních vzorků. Všechny kadaverózní vzorky a vzorky žijících dárců, jak EDTA plazmy, tak i séra, byly nereaktivní se 100% specifickou. Specifická pozorovaná u kadaverózních vzorků odpovídala specifické zjištěné Fisherovým exaktním testem ($\alpha = 0,05$) u vzorků žijících dárců; souhrn uvádí Tab. 23.

Tab. 23 Souhrn specifity kadaverózních vzorků EDTA plazmy a séra a vzorků EDTA plazmy a séra žijících dárců

Matrice	Typ vzorku	Počet nereaktivních vzorků	Počet platných vzorků	% nereaktivních	Dvoustranný 95% interval spolehlivosti
EDTA plazma	Kadaverózní dárce	64	64	100 %	94,4–100 %
	Žijící dárce	60	60	100 %	94,0–100 %
Sérum	Kadaverózní dárce	62	62	100 %	94,2–100 %
	Žijící dárce	60	60	100 %	94,0–100 %
Celkové výsledky s použitím Fisherova exaktního testu ($\alpha = 0,05$)		Specifita kadaverózních vzorků a vzorků žijících dárců je ekvivalentní: Fisherův exaktní test, $p = 1,000$			

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost testu **cobas® WNV** na systémech **cobas® 6800/8800** byla zjištěna s použitím 20 kadaverózních vzorků EDTA plazmy (středně a silně hemolyzovaných) s přidavkem sekundárního standardu Roche pro RNA WNV při koncentraci přibližně $5 \times \text{LoD}$ testu **cobas® WNV**. Výsledky byly srovnány s reprodukovatelností zjištěnou pomocí 20 vzorků EDTA plazmy žijících dárců s přidavkem sekundárního standardu Roche při koncentraci přibližně $5 \times \text{LoD}$ testu **cobas® WNV**.

Testovány byly následující složky variability:

- variabilita mezi jednotlivými dny po dobu 6 dnů
- variabilita mezi jednotlivými šaržemi s použitím tří různých šarží činidel testu **cobas® WNV**

Jeden replikát byl testován s každou ze 3 šarží činidel po dobu 6 dnů, celkem 18 replikátů na každý kadaverózní vzorek a vzorek žijícího dárce. Každý kadaverózní vzorek byl v přístroji zředěn 1:5,6 roztokem pro ředění vzorků **cobas omni Specimen Diluent** a zpracován postupem pro testování kadaverózních vzorků. Všechna platná data studie reprodukovatelnosti byla vyhodnocena porovnáním míry reaktivity vzorků žijících dárců a kadaverózních vzorků (dvoustranné 95% intervaly spolehlivosti) pro všechny složky variability. Hodnota p Fisherova exaktního testu byla vypočítána pro testování statistické významnosti rozdílu mezi podíly reaktivních výsledků pozorovaných u kadaverózních vzorků a vzorků od živých dárců. Nebyly pozorovány žádné významné rozdíly.

Test **cobas® WNV** je reprodukovatelný při použití po dobu několika dnů s použitím několika šarží činidel u kadaverózních vzorků a vzorků od živých dárců. Souhrn výsledků variability mezi šaržemi reagentů uvádí Tab. 24.

Tab. 24 Souhrn reprodukovatelnosti testu **cobas® WNV** mezi jednotlivými šaržemi činidel u kadaverózních vzorků a vzorků od žijících dárců

Analyt	Šarže reagentie	Typ vzorku	% reaktivních (počet reaktivních/počet platných replikátů)	Dolní mez 95% intervalu spolehlivosti	Horní mez 95% intervalu spolehlivosti	Významný rozdíl podle Fisherova exaktního testu ($\alpha = 0,05$)
WNV	1	Kadaverózní	100,0 % (120/120)	97,0 %	100,0 %	hodnota $p = 1,0000$
		Žijící dárce	100,0 % (120/120)	97,0 %	100,0 %	
	2	Kadaverózní	100,0 % (120/120)	97,0 %	100,0 %	hodnota $p = 1,0000$
		Žijící dárce	100,0 % (120/120)	97,0 %	100,0 %	
	3	Kadaverózní	100,0 % (120/120)	97,0 %	100,0 %	hodnota $p = 1,0000$
		Žijící dárce	100,0 % (120/120)	97,0 %	100,0 %	

Hodnocení klinické výkonnosti

Klinická senzitivita – testování známých vzorků pozitivních na západonilský virus

Klinická senzitivita testu **cobas® WNV** byla vyhodnocena pomocí 530 jednotlivých klinických vzorků, jejichž pozitivita byla ověřena testováním nukleových kyselin. Studie byla provedena ve čtyřech testovacích laboratořích, přičemž každé pracoviště testovalo přibližně 135 vzorků, jak neředěných, tak zředěných v poměru 1:6, s použitím tří různých šarží souprav testu **cobas® WNV**. Sedmnáct z těchto 530 jednotlivých klinických vzorků bylo vyloučeno ze statistické analýzy, protože nesplnily kritéria zařazení ohledně virové nálože viru WNV. Proto bylo do analýzy zařazeno 513 vzorků; u dvou neředěných vzorků však nebyly získány platné výsledky, takže do analýzy bylo zařazeno jen 511 výsledků neředěných vzorků. Všechny 513 zředěných vzorků poskytlo platné výsledky.

Senzitivita testu **cobas® WNV** u neředěných vzorků v této studii byla 100 % (95% interval spolehlivosti: 99,3–100 %) a u vzorků zředěných 1:6 byla 98,8 % (95% interval spolehlivosti: 97,5–99,5 %) (Tab. 25). Šest nereaktivních zředěných vzorků pocházelo z neředěných vzorků s nízkým titrem viru.

Tab. 25 Klinická senzitivita známých vzorků pozitivních na západonilský virus

	Počet testovaných vzorků	Počet reaktivních vzorků	Počet nereaktivních vzorků	Senzitivita (%)	Senzitivita (95% interval spolehlivosti)	
					Dolní mez	Horní mez
Neředěný	511*	511	0	100	99,3	100
1:6	513	507	6	98,8 %	97,5	99,5

* Dva z neředěných vzorků neposkytly platný výsledek.

Klinická specifita

Klinická specifita testu **cobas® WNV** byla hodnocena testováním náhodně zvolených odběrů darované krve ve čtyřech externích laboratořích. Byly testovány jednotlivé vzorky a směsi po šesti vzorcích. Ve studii byly použity tři různé šarže činidel **cobas® WNV**. Klinická specifita testu **cobas® WNV** byla vypočtena jako procentní podíl (95% dvoustranný interval spolehlivosti) dárců s negativním stavem pro WNV, kteří měli nereaktivní výsledky testu **cobas® WNV**. Počet vyhodnotitelných odběrů darované krve byl 63 243 při testování směsí a 10 823 při testování jednotlivých vzorků.

Výsledky testování směsí

Tab. 26 ukazuje výpočet klinické specifity testu **cobas® WNV** pro 63 243 vyhodnotitelných dárců z testování směsí. Klinická specifita testu **cobas® WNV** pro testování směsí v této studii byla 100,000 % (63 243/63 243; 95% interval spolehlivosti: 99,994–100,000 %).

Tab. 26 Klinická specifická testu **cobas® WNV** – testování směsí

Výsledek testu cobas® WNV	Stav dárce pro WNV*		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
WNV reaktivní	0	0	0
WNV nereaktivní	0	63243	63243
Celkem	0	63243	63243
Klinická specifická (95% interval spolehlivosti)	-	100,000 % (99,994 %, 100,000 %)	-

* Stav WNV dárce byl přiřazen programem na základě modelů reaktivity na test při prvním dárcovském odběru a při následujících odběrech, byly-li provedeny.

Specifická testu **cobas® WNV** při testování směsí u prvních dárcovských odběrů byla 100,000 % (10 573/10 573; 95% interval spolehlivosti: 99,964–100,000 %). Žádná z 10 573 směsí po šesti vzorcích nebyla reaktivní při testu **cobas® WNV**. U směsí vzorků byla zaznamenána 1,6% míra výskytu neplatných výsledků z důvodu vnitřních kontrol nebo selhání přístroje.

Výsledky testování jednotlivých vzorků

Tab. 27 ukazuje výpočet klinické specifické testu **cobas® WNV** pro 10 823 vyhodnotitelných dárců z testování jednotlivých vzorků. Klinická specifická testu **cobas® WNV** z testování jednotlivých vzorků v této studii byla 100,000 % (10 823/10 823; 95% interval spolehlivosti: 99,965–100,000 %). U jednotlivých vzorků byla zaznamenána 0,3% míra výskytu neplatných výsledků z důvodu vnitřních kontrol, selhání přístroje, odchylek od protokolu nebo jiných příhod.

Tab. 27 Klinická specifická testu **cobas® WNV** – testování jednotlivých vzorků

Výsledek testu cobas® WNV	Stav dárce pro WNV*		Celkem
	Pozitivní	Negativní	
WNV reaktivní	0	0	0
WNV nereaktivní	0	10 823	10 823
Celkem	0	10 823	10 823
Klinická specifická (95% interval spolehlivosti)		100,000 % (99,965 %, 100,000 %)	

* Stav WNV dárce byl přiřazen programem na základě modelů reaktivity na test při prvním dárcovském odběru a při následujících odběrech, byly-li provedeny.

Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost testu **cobas® WNV** při použití se systémy **cobas® 6800/8800** byla zjištěna testováním osmipoložkového panelu sestávajícího ze dvou negativních vzorků plazmy a dvou vzorků plazmy pozitivních na WNV ve třech různých koncentracích (přibližně 0,5 ×, 1,0 ×, a 3,0 × hodnota LoD testu **cobas® WNV**).

Obsluha na každém ze tří pracovišť se systémem **cobas® 8800** prováděla testování pět dní s každou ze tří šarží činidel **cobas® WNV**; byly provedeny dva platné cykly s panely (tj. dvě dávky, dávka = jeden panel + dvě kontroly) denně a bylo získáno až 180 testů pro každý typ viru jako položku panelu při každé ze tří koncentrací.

Veškeré platné dávky a výsledky testů byly analyzovány výpočtem procentního podílu výsledků reaktivních testů u každé položky panelu (Tab. 28). Tato studie prokázala, že test **cobas® WNV** pro použití se systémy **cobas® 6800/8800** vykazuje reprodukovatelnost v rámci hodnocených proměnných (šarže, pracoviště/zařízení, den, dávka a v rámci dávky) při detekci WNV.

Tab. 28 Výsledky testů shrnuté podle pracoviště/zařízení, šarže, dne a dávky (pozitivní položky panelu)

Virové cíle	Koncentrace virové nálože	Pracoviště		Šarže		Den		Dávka	
		ID	% pozitivních výsledků	ID	% pozitivních výsledků	ID	% pozitivních výsledků	ID	% pozitivních výsledků
WNV	0,5 × LoD	1	86,7 % (52/60)	1	85,0 % (51/60)	1	94,4 % (34/36)	1	81,1 % (73/90)
		2	90,0 % (54/60)	2	91,7 % (55/60)	2	72,2 % (26/36)	2	91,1 % (82/90)
		3	81,7 % (49/60)	3	81,7 % (49/60)	3	88,9 % (32/36)	-	-
		-	-	-	-	4	86,1 % (31/36)	-	-
		-	-	-	-	5	88,9 % (32/36)	-	-
	1,0 × LoD	1	95,0 % (57/60)	1	96,7 % (58/60)	1	86,1 % (31/36)	1	93,3 % (83/89)
		2	100,0 % (59/59)	2	88,3 % (53/60)	2	94,4 % (34/36)	2	92,2 % (83/90)
		3	83,3 % (50/60)	3	93,2 % (55/59)	3	94,3 % (33/35)	-	-
		-	-	-	-	4	94,4 % (34/36)	-	-
		-	-	-	-	5	94,4 % (34/36)	-	-
	3,0 × LoD	1	98,3 % (59/60)	1	98,3 % (59/60)	1	100,0 % (36/36)	1	98,9 % (89/90)
		2	100,0 % (60/60)	2	100,0 % (60/60)	2	100,0 % (36/36)	2	100,0 % (90/90)
		3	100,0 % (60/60)	3	100,0 % (60/60)	3	97,2 % (35/36)	-	-
		-	-	-	-	4	100,0 % (36/36)	-	-
		-	-	-	-	5	100,0 % (36/36)	-	-

Doplňující informace

Hlavní parametry testu

Typ vzorku	Plazma a sérum
Minimální požadovaný objem vzorku žijícího dárce	1000 µl*
Zpracovaný objem vzorku žijícího dárce	850 µl
Minimální požadovaný objem kadaverózního vzorku	300 µl*
Zpracovaný objem kadaverózního vzorku	150 µl

* Zkumavky používané k testování mohou mít jiné mrtvé objemy a vyžadovat větší nebo menší minimální objem. Další informace získáte od místního zástupce servisních služeb společnosti Roche.

Symbols

V označování diagnostických produktů společnosti Roche PCR se používají následující symboly.

Tab. 29 Symboly použité při označování diagnostických produktů PCR společnosti Roche

Age/DOB Věk nebo datum narození	 Prostředek není pro testování u lůžka pacienta	QS IU/PCR Kopie IU na reakci PCR, použijte mezinárodní jednotky (UI) QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.
 Pomocný software	 Prostředek není určen pro samotestování	SN Sériové číslo
Assigned Range [copies/mL] Přiřazené rozmezí (kopie/mL)	 Distributor (Pozn.: pod symbolem může být uvedena příslušná země/oblast.)	Site Pracoviště
Assigned Range [IU/mL] Přiřazené rozmezí (IU/mL)	 Nepoužívat opakovaně	Procedure Standard Standardní postup
EC REP Zplnomocněný zástupce pro evropské společenství	 Žena	STERILE EO Sterilizováno ethylenoxidem
BARCODE Datový list s čárovými kódy	 Pouze pro vyhodnocení výkonnosti IVD	 Uchovávejte v temnu
LOT Číslo šarže	GTIN Globální číslo obchodní položky	 Omezení teploty
 Biologická rizika	 Dovozce	 Definiční soubor testu
REF Katalogové číslo	IVD Zdravotnický prostředek pro <i>in vitro</i> diagnostiku	 Neklopit
 Značka shody CE. Tento prostředek odpovídá příslušným požadavkům pro značku shody CE pro diagnostický zdravotnický prostředek <i>in vitro</i>	LLR Dolní mez přiřazeného rozmezí	Procedure UltraSensitive Ultracitlivý postup
Collect Date Datum odběru	 Muž	UDI Jedinečná identifikace prostředku
 Čtěte návod k použití	 Výrobce	ULR Horní mez přiřazeného rozmezí
 Obsah vystačí pro <n> testů	CONTROL - Negativní kontrola	Urine Fill Line Hladina pro naplnění moči
CONTENT Obsah soupravy	 Nesterilní	Rx Only Pouze pro USA: podle federálního zákona smí být tento přístroj prodáván pouze lékařem nebo na jeho objednávku.
CONTROL Kontrola	 Jméno pacienta	 Datum expirace
 Datum výroby	 Číslo pacienta	
 Prostředek pro testování u lůžka pacienta	 Zde odloupnout	
 Prostředek pro samotestování	CONTROL + Pozitivní kontrola	
	QS copies / PCR Kopie QS na reakci PCR, použijte kopie QS na reakci PCR při výpočtu výsledků.	

Technická podpora

Pro technickou podporu (asistenci) kontaktujte místní zastoupení:

https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Výrobce a dovozce

Tab. 30 Výrobce a dovozce



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

Vyrobeno v USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Ochranné známky a patenty

Viz <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Autorská práva

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Literatura

1. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile virus: review of the literature. *JAMA*. 2013;310:308-315.
2. Gray TJ, Webb CE. A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Intl J Gen Med*. 2014;7:193-203.
3. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol*. 1998;72:73-83.
4. Burke DS, Monath TP. Flavirviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al. editors, *Fields' Virology*, vol. 1. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001:pp. 1043-1126.
5. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile, and dengue viruses. *Nat Med*. 2004;10 Suppl 12:S98-S109.
6. Beasley DW, Davis CT, Whiteman M, Granwehr B, Kinney RM, Barrett AD. Molecular determinants of virulence of West Nile virus in North America. *Arch Virol Suppl*. 2004;18:35-41.
7. Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1176-1180.
8. Sambri V, Capobianchi M, Charrel R, et al. West Nile virus in Europe: emergence, epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:699-704.
9. Petersen LR, Busch MP. Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sang*. 2010;98:495-503.
10. Artsob H, Gubler DJ, Enria DA, et al. West Nile Virus in the New World: trends in the spread and proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses Public Health*. 2009;56:357-369.
11. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett AD. Phylogeography of West Nile virus: from cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol*. 2011;85:2964-2974.
12. Petersen LR, Hayes EB. West Nile virus in the Americas. *Med Clin North Am*. 2008;92:1307-1322.
13. Nash D, Mostashari F, Fine A, et al.; 1999 West Nile Outbreak Response Working Group. The outbreak of West Nile virus infection in the New York area 1999. *N Engl J Med*. 2001;344:1807-1814.
14. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, et al and the West Nile Virus Transmission Investigation Team. Transmission of West Nile Virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med*. 2003;349:1236-1245.
15. Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, et al. West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion*. 2003;43:1018-1022.
16. Nett RJ, Kuehnert MJ, Ison MG, Orlowski JP, Fischer JM, Staples JE. Current practices and evaluation of screening solid organ donors for West Nile virus. *Transpl Infect Dis*. 2012;14:268-277.
17. Biggerstaff BJ, Petersen LR. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. *Transfusion*. 2002;42:1019-1026.
18. Custer B, Kamel H, Kiely NE, et al. Associations between West Nile virus infection and symptoms reported by blood donors identified through nucleic acid test screening. *Transfusion*. 2009;49:278-288.
19. Busch MP, Wright DJ, Custer B, et al. West Nile virus infections projected from blood donor screening data, United States, 2003. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:395-402.
20. Sejvar JJ, Haddad MB, Tierney BC, et al. Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA*. 2003;290:511-515.
21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal West Nile Virus infection after probable transfusion-associated transmission-Colorado, 2012. *MMWR*. 2013;62(31):622-624.

22. Kamar N, Bendell R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E. *Lancet*. 2012;379:2477-2488.
23. AABB website; West Nile Virus Vigilance Network (for West Nile virus 2006-2010). Data compiled by Susan L. Stramer, American Red Cross, available at <http://www.aabb.org/research/hemovigilance/Pages/wnv.aspx>.
24. Zou S, Foster GA, Dodd RY, Petersen LR, Stramer SL. West Nile fever characteristics among viremic persons identified through blood donor screening. *J Infect Dis*. 2010;202:1354-1361.
25. Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet*. 2001;358:261-264.
26. Sejvar JJ, Curns AT, Welburg L, et al. Neurocognitive and functional outcomes in person recovering from West Nile virus illness. *J Neuropsychol*. 2008;2(pt.2):477-499.
27. Burton JM, Kern RZ, Halliday W, et al. Neurological manifestations of West Nile virus infection. *Can J Neurol Sci*. 2004;31:185-193.
28. Robinson RL, Shahida S, Madan N, Rao S, Khardori N. Transient parkinsonism in West Nile virus encephalitis. *Am J Med*. 2003;115:252-253.
29. Sejvar JJ, Bode AV, Marfin AA, et al. West Nile virus-associated flaccid paralysis. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1021-1027.
30. Leis AA, Stokic DS. Neuromuscular manifestations of west nile virus infection. *Front Neurol*. 2012;3:37.
31. Emig M, Apple DJ. Severe West Nile virus disease in healthy adults. *Clin Infect Dis*. 2004;38:289-292.
32. Sadek JR, Pergam SA, Harrington JA, et al. Persistent neuropsychological impairment associated with West Nile virus infection. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2010;32:81-87.
33. Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M; Center for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for human West Nile virus disease. *MMWR Surveill Summ*. 2010;59:1-17.
34. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-128.
35. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-493.
36. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-878.
37. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992;10:413-417.
38. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-994.
39. 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.
40. 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.
41. Pisani G, Pupella S, Cristiano K, et al. Detection of West Nile virus RNA (lineages 1 and 2) in an external quality assessment programme for laboratories screening blood and blood components for West Nile virus by nucleic acid amplification testing. *Blood Transfus*. 2012;10: 515-520.

Revize dokumentu

Informace k revizi dokumentu	
Doc Rev. 1.0 05/2023	První publikace. Opravená typografická chyba v tabulce 2.

Shrnutí zprávy o bezpečnosti a výkonnosti najdete na této webové adrese: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>