Rx Only

cobas® EBV

Quantitativer Nukleinsäuretest zur Verwendung auf den cobas® 6800/8800 Systems

In-vitro-Diagnostikum

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

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck **4**

Zusammenfassung und Erklärung des Tests **4**

Reagenzien und Materialien **7**

cobas® EBV-Reagenzien und Kontrollen 7

cobas omni-Reagenzien für die Probenvorbereitung 10

Lagerung und Handhabung der Reagenzien 11

Zusätzlich benötigtes Material 12

Benötigte Geräte und Software 12

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung **13**

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen 13

Umgang mit Reagenzien 14

Gute Laborpraxis 14

Entnahme, Transport und Lagerung von Proben **14**

Proben 15

Gebrauchsanleitung **16**

Hinweise zum Verfahren 16

Durchführen des **cobas**® EBV-Tests 16

Ergebnisse **17**

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse 17

Interpretation der Ergebnisse 18

Verfahrenseinschränkungen 18

Nichtklinische Leistungsmerkmale 19

Wichtigste Leistungsmerkmale 19

Nachweisgrenze (LoD) 19

Linearer Bereich 20

Laborinterne Präzision 21

Genotypverifizierung 21

Spezifität 22

Analytische Spezifität 22

Analytische Spezifität – Störsubstanzen 23

Korrelation der Methode 23

Gesamtsystemausfall 24

Kreuzkontamination 24

Weitere Informationen 25

Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests 25

Symbole 26

Herstellung und Vertrieb 27

Marken und Patente 27

Copyright 27

Literatur 28

Dokumentversion 30

Verwendungszweck

Der **cobas**® EBV-Test ist ein *in-vitro*-Nukleinsäure-Amplifikationstest zur quantitativen Bestimmung von Epstein-Barr-Virus (EBV)-DNA in EDTA-Humanplasma.

Der **cobas**® EBV-Test ist zur Unterstützung der Diagnose und Behandlung von EBV bei Transplantationspatienten vorgesehen. Bei Patienten, die auf EBV überwacht werden, können DNA-Reihenmessungen auf möglicherweise erforderliche Anpassungen der Therapie hinweisen und zur Beurteilung der Virusreaktion auf die Behandlung verwendet werden.

Die Ergebnisse des **cobas**® EBV-Tests müssen im Kontext aller relevanten klinischen Befunde und Laborwerte interpretiert werden.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Hintergrund

Bei Transplantatempfängern besteht ein erhöhtes Risiko für viele virale oder bakterielle Infektionen, die, anders als bei Menschen mit einem guten Gesundheitszustand, eher zu schwerwiegenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen können. Dieses erhöhte Risiko ist z. T. auf eine eingeschränkte Funktion des Immunsystems aufgrund von immunsuppressiven Medikamenten zurückzuführen. Transplantationspatienten sind jedoch auf die Einnahme solcher Medikamente angewiesen, um das Risiko einer Transplantatabstoßung zu minimieren.[1, 2]

Das EBV gehört zur Familie der Herpesviren. Es handelt sich hierbei um behüllte, doppelsträngige DNA-Viren (Genom ca. 172 kb). Die beiden wichtigsten EBV-Genotypen (Genotyp 1und 2) werden anhand der Unterschiede im nukleären Antigen des Epstein-Barr-Virus (EBNA-2) definiert. EBV-Infektionen bei Menschen sind weit verbreitet: Über 90 % aller Erwachsenen haben bereits eine Infektion mit EBV durchlebt, wonach dauerhaft eine latente Infektion bestehen bleibt. Das EBV ist bei einigen neu infizierten Jugendlichen und Erwachsenen Auslöser der Infektiösen Mononukleose (Pfeiffersches Drüsenfieber). Es korreliert außerdem mit unterschiedlichen Krebserkrankungen, u. a. Nasopharynxkarzinomen, dem Burkitt-Lymphom oder Morbus Hodgkin. Bei Personen mit angeborener oder erworbener Immunschwäche, z. B. Transplantatempfängern oder Patienten mit dem humanen Immundefekt-Virus bzw. dem erworbenen Immundefekt-Syndrom (HIV/AIDS) kann EBV zu einem Lymphoproliferativen Syndrom führen.[3]

EBV kann bei Transplantatempfängern durch die Reaktivierung des latenten Virus aus B-Gedächtniszellen oder durch eine neue Primärinfektion andere Erkrankungen hervorrufen. Dies gilt insbesondere für EBV-negative Transplantatempfänger, die Transplantate von EBV-positiven Spendern erhalten.[3] Die schwerste Komplikation infolge einer EBV-Infektion ist das Posttransplantationslymphom (PTLD), welches üblicherweise durch eine B-Zell-Neoplasie hervorgerufen wird.[4] Im Allgemeinen sind über 70 % aller PTLD-Erkrankungen bei Transplantatempfängern mit einer EBV-Infektion assoziiert. Das Risiko für das Auftreten eines PTLD ist in den ersten 12 Monaten nach der Transplantation am höchsten: Über 90 % aller PTLD-Erkrankungen in diesem Zeitraum können auf eine EBV-Infektion zurückgeführt werden. In bis zu 20 % aller Fälle, in denen das PTLD später als 12 Monate nach der Transplantation auftritt, steht dieses nicht in Zusammenhang mit dem EBV.[4, 5]

Ein EBV-negativer Serostatus des Transplantatempfängers, ein junges Lebensalter und die Gabe lymphozytenabbauender Antikörper sind Faktoren, die ein frühes Auftreten eines PTLD begünstigen. Das Risiko hängt ebenfalls von der Art des transplantierten Organs ab.[5, 6]

Durch die frühzeitige Diagnose einer Erstinfektion mit dem EBV sowie die Überwachung auf DNA-Ebene können therapeutische Maßnahmen schneller ergriffen werden, die der Progression der EBV-assoziierten Erkrankung entgegenwirken. Gemäß den aktuellen Leitlinien sollte insbesondere bei Transplantatempfängern, die aufgrund ihres EBV-negativen Serostatus als Hochrisikopatienten gelten, eine regelmäßige EBV-Überwachung mit quantitativen Nukleinsäuretests (NAT) erfolgen.[4, 5] Der genaue medizinisch relevante virale Schwellenwert ist aufgrund der Inter-Assay-Variabilität zwar noch umstritten, das Konzept des kritischen Schwellenwerts hat jedoch seine Gültigkeit, denn eine Reihe von Studien zum natürlichen Krankheitsverlauf zeigt, dass höhere EBV-DNA-Konzentrationen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer EBV-Erkrankung und eines PTLD einhergehen.[4, 5, 7] Zwar werden EBV-Tests sowohl an Plasma- als auch an Vollblutproben durchgeführt, jedoch bestehen Hinweise darauf, dass Plasma spezifischere Ergebnisse für den Nachweis eines PTLD liefert.[4, 5, 7, 8]

Die Herabsetzung von Immunsuppressivadosen und die Behandlung mit lymphozytenabbauenden Antikörpern sind gängige therapeutische Maßnahmen zur Senkung der EBV-DNA-Konzentration und zur Verhinderung eines PTLD.[7] Die meisten Patienten sprechen gut auf eine präventive Therapie zur Senkung der EBV-DNA-Konzentration an. Dennoch tritt bei bis zu 20 % der Patienten später ein PTLD auf, insbesondere wenn seit der Transplantation mehr als 12 Monate vergangen sind.[7]

Die Tatsache, dass die meisten Labortests für die EBV-Quantifizierung nicht standardisiert sind, hat zu Inter-Labor- und Inter-Assay-Variabilitäten der DNA-Konzentrationen geführt. Daher können die DNA-Konzentrationen aus unterschiedlichen Labors und Tests nicht einfach miteinander verglichen werden.[7] Aus diesem Grund hat die WHO einen internationalen Standard für die EBV-Quantifizierung entwickelt, mit dem nun Tests unter Verwendung der Einheit IE/ml standardisiert werden.[9] Um in allen Labors einheitliche Ergebnisse zu erzielen und die klinische Behandlung von Patienten mit erhöhtem EBV-/PTLD-Risiko zu verbessern, ist die formale Bewertung der Reproduzierbarkeit und Gültigkeit der EBV-DNA-Konzentration entscheidend.

Nutzen von NAT-Tests

Vor einer Transplantation wird die EBV-Serologie von Spender und Empfänger bestimmt, um Aufschluss über das Risiko für EBV-assoziierte Komplikationen im Zusammenhang mit der Transplantation zu erlangen. Allerdings sind die serologischen Befunde nicht empfindlich bzw. präzise genug, um die Patienten nach der Transplantation zu überwachen. EBV-Zellkulturmethoden sind langsam und haben in diesem Zusammenhang einen geringen prädiktiven Wert. Der direkte Nachweis von EBV-DNA mittels Echtzeit-PCR-Methoden zeichnet sich potenziell durch einen breiten dynamischen Bereich sowie durch hohe Präzision, Sensitivität und Spezifität aus.

Erklärung des Tests

Der **cobas**® EBV-Test ist ein quantitativer Test zur Verwendung auf dem **cobas**® 6800 System und dem **cobas**® 8800 System.Der **cobas**® EBV-Test ermöglicht den Nachweis und die quantitative Bestimmung von EBV-DNA in EDTA-Plasma von Infizierten. Zur quantitativen Bestimmung der Viruslast dient ein nicht aus EBV stammender DNA-Quantifizierungsstandard (DNA-QS), der bei der Verarbeitung jeder Probe zugegeben wird. Der DNA-QS dient zudem zur Überwachung des gesamten Prozesses der Probenvorbereitung und PCR-Amplifikation. Zusätzlich kommen bei dem Test drei externe Kontrollen zum Einsatz: eine Positivkontrolle mit hohem Titer, eine Positivkontrolle mit niedrigem Titer und eine Negativkontrolle.

Testprinzipien

Der **cobas**® EBV-Test beruht auf einer vollautomatisierten Probenvorbereitung (Extraktion und Aufreinigung der Nukleinsäuren) gefolgt von PCR-Amplifikation und Detektion. Die **cobas**® 6800/8800 Systems bestehen aus einem Probenzufuhrmodul, einem Transfermodul, einem Aufarbeitungsmodul und einem Analysenmodul. Die automatisierte Datenverwaltung erfolgt über die **cobas**® 6800/8800 Software, die die Ergebnisse aller Tests als 'Zielsequenz nicht nachgewiesen', 'EBV-DNA nachgewiesen unter der unteren Quantifizierungsgrenze', 'EBV-DNA nachgewiesen über der oberen Quantifizierungsgrenze' einstuft oder einen Wert im linearen Bereich von 'untere Quantifizierungsgrenze < x < obere Quantifizierungsgrenze' angibt. Die Ergebnisse können direkt am Bildschirm des Systems eingesehen, exportiert oder als Bericht ausgedruckt werden.

Die in der Patientenprobe enthaltene Nukleinsäure und die zugegebenen DNA-QS-Moleküle werden gleichzeitig extrahiert. Die virale Nukleinsäure wird schließlich durch Zugabe von Proteinase und Lysereagenz zur Probe freigesetzt. Die freigesetzte Nukleinsäure bindet an die Silica-Oberfläche der hinzugefügten magnetischen Glaspartikel. Nicht gebundene Substanzen und Verunreinigungen, beispielsweise denaturiertes Protein, Zelltrümmer und potenzielle PCR-Inhibitoren werden durch anschließende Waschreagenzschritte entfernt. Die aufgereinigte Nukleinsäure wird danach mit einem Elutionspuffer bei erhöhter Temperatur von den Glaspartikeln gelöst.

Die selektive Amplifikation von Zielnukleinsäure aus der Probe erfolgt anhand eines dualen virusspezifischen Ansatzes aus hochkonservierten EBV-Regionen im EBV-EBNA-1- sowie im EBV-BMRF-Gen. Zur selektiven Amplifikation des DNA-QS werden speziell ausgewählte, sequenzspezifische Forward- und Reverse-Primer eingesetzt, die keine Homologie mit dem EBV-Genom aufweisen. Für die Amplifikation wird ein thermostabiles DNA-Polymeraseenzym eingesetzt. Die Ziel- und DNA-QS-Sequenzen werden unter Verwendung eines universellen PCR-Amplifikationsprofils mit vordefinierten Temperaturschritten und vordefinierter Zyklusanzahl gleichzeitig amplifiziert. Der Master-Mix enthält anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) Desoxyuridintriphosphat (dUTP), das in die neu synthetisierte DNA (Amplifikat) eingebaut ist.[10–12] Etwaige Verunreinigungen durch Amplifikate aus vorherigen PCR-Läufen werden im ersten thermozyklischen Schritt durch das im PCR-Mix enthaltene Enzym AmpErase eliminiert. Neu gebildete Amplifikate dagegen werden nicht eliminiert, da das AmpErase-Enzym durch Temperaturen über 55 °C inaktiviert wird.

Der **cobas**® EBV-Master-Mix enthält zwei Detektionssonden, die für die EBV-Zielsequenzen spezifisch sind, sowie eine weitere für den DNA-QS. Die Sonden sind mit zielspezifischen fluoreszierenden Reporterfarbstoffen markiert, die den gleichzeitigen Nachweis der EBV-Zielsequenz und des DNA-QS in zwei verschiedenen Zielkanälen ermöglichen.[13, 14] Das Fluoreszenzsignal der intakten Sonden wird durch einen Quencher-Farbstoff unterdrückt. Während des PCR-Amplifikationsschritts wird die Sonde an die betreffenden einsträngigen DNA-Templates hybridisiert, was zur Abspaltung durch die 5'–3'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase führt. Dadurch kommt es zur Abtrennung des Reporter- und Quencher-Farbstoffs, und es entsteht ein Fluoreszenzsignal. Mit jedem PCR-Zyklus werden zunehmende Mengen gespaltener Sonden erzeugt, und das kumulative Signal des Reporterfarbstoffs steigt entsprechend an. Die Echtzeit-Detektion und Unterscheidung der PCR-Produkte wird durch Messen der Fluoreszenz der freigesetzten Reporterfarbstoffe erreicht, die die Viruszielsequenzen und den DNA-QS repräsentieren.

Reagenzien und Materialien

cobas® EBV-Reagenzien und Kontrollen

Sämtliche ungeöffneten Reagenzien und Kontrollen sollten wie in Tabelle 1 bis Tabelle 4 empfohlen gelagert werden.

Tabelle 1 cobas® EBV

cobas® EBV
Bei 2–8 °C lagern.
Kassette mit 192 Tests (P/N 08688206190)

Kitkomponenten	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit 192 Tests
Proteinase-Lösung (PASE)	Tris-Puffer, < 0,05 % EDTA, Calciumchlorid, Calciumacetat, 8 % Proteinase EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. EUH208: Enthält Subtilisin. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.	22,3 ml
DNA-Quantifizierungs-standard (DNA QS)	Tris-Puffer, < 0,05 % EDTA, < 0,001 % Nicht-EBV-DNA-Konstrukt mit einer Nicht-EBV-Primer- und einer eindeutigen Sonden-Bindungsregion (nicht-infektiöse DNA), < 0,002 % Poly-rA-RNA (synthetisch), < 0,1 % Natriumazid	21,2 ml
Elutionspuffer (EB)	Tris-Puffer, 0,2 % Methyl-4-Hydroxybenzoat	21,2 ml
Master-Mix-Reagenz 1 (MMX-R1)	Manganacetat, Kaliumhydroxid, < 0,1 % Natriumazid	7,5 ml
EBV-Master-Mix-Reagenz 2 (EBV MMX-R2)	Tricin-Puffer, Kaliumacetat, < 18 % Dimethylsulfoxid, Glycerin, < 0,1 %Tween 20, EDTA, < 0,12 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01 % Upstream- und Downstream-EBV-Primer, < 0,01 % Quantifizierungsstandard-Forward- und -Reverse-Primer, < 0,01 % fluoreszenzmarkierte, für EBV bzw. den EBV-Quantifizierungsstandard spezifische Oligonukleotidsonden, < 0,01 % Oligonukleotid-Aptamer, < 0,1 % Z05D-DNA-Polymerase, < 0,10 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase, mikrobiell), < 0,1 % Natriumazid	9,7 ml

Tabelle 2 **cobas**® EBV/BKV Control Kit

cobas® EBV/BKV Control Kit
Bei 2–8 °C lagern.
(P/N 08688214190)

Kitkomponenten	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit	Sicherheitssymbole und -hinweise*
Niedrig positive EBV/BKV-Kontrolle (EBV L(+)C)	< 0,001 % in Lambda-Bakteriophagen-hüllprotein verkapselte synthetische (Plasmid) EBV-DNA, Normal-Humanplasma, EBV-DNA nicht mittels PCR-Methoden nachweisbar. 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel**	4 ml (8 × 0,5 ml)	 **WARNUNG** H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen. P280: Schutzhandschuhe tragen. P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. P501: Inhalt/Behälter einer zugelassenen Abfallbeseitigungsanlage zuführen. 55965-84-9 Reaktionsmasse von: 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1)
Hoch positive EBV/BKV-Kontrolle (EBV/BKV H(+)C)	< 0,001 % in Lambda-Bakteriophagen-hüllprotein verkapselte synthetische (Plasmid) EBV-DNA, Normal-Humanplasma, EBV-DNA nicht mittels PCR-Methoden nachweisbar. 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel**	4 ml (8 × 0,5 ml)	 **WARNUNG** H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen. P280: Schutzhandschuhe tragen. P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. P501: Inhalt/Behälter einer zugelassenen Abfallbeseitigungsanlage zuführen. 55965-84-9 Reaktionsmasse von: 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on [EG-Nr. 247-500-7] und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on [EG-Nr. 220-239-6] (3:1)

* Die Sicherheitskennzeichnung der Produkte erfolgt in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU.

** Gefährliche Substanz

Tabelle 3 **cobas**® Buffer Negative Control Kit

cobas® Buffer Negative Control Kit
Bei 2–8 °C lagern.
(P/N 07002238190)

Kitkomponenten	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit
cobas® Puffer-Negativkontrolle (BUF (–) C)	Tris-Puffer, < 0,1 % Natriumazid, EDTA, < 0,002 % Poly-rA-RNA (synthetisch)	16 ml (16 × 1 ml)

cobas omni-Reagenzien für die Probenvorbereitung

Tabelle 4 **cobas omni** Reagenzien für die Probenvorbereitung*

Reagenzien	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit	Sicherheitssymbole und -hinweise**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Bei 2–8 °C lagern. (P/N: 06997546190)	Magnetische Glaspartikel, Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4 Hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid	480 Tests	Keine Angabe
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Bei 2–8 °C lagern. (P/N: 06997511190)	Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4 Hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid	4 × 875 ml	Keine Angabe
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Bei 2–8 °C lagern. (P/N: 06997538190)	43 % (Gew.-%) Guanidinthiocyanat***, 5 % (Massenvol.-%) Polidocanol***, 2 % (Massenvol.-%) Dithiothreitol***, Dihydro-Natriumcitrat	4 × 875 ml	**GEFAHR** H302 + H332: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen. H314: Verursacht schwere Verätzungen und schwere Augenschäden. H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/ Aerosol vermeiden. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. P303 + P361 + P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P304 + P340 + P310 BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. P305 + P351 + P338 + P310 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFT-INFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. 593-84-0 Guanidinthiocyanat 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol
cobas omni Wash Reagent (WASH) Bei 15–30 °C lagern. (P/N: 06997503190)	Natriumcitratdihydrat, 0,1 % Methyl-4-Hydroxybenzoat	4,2 l	Keine Angabe

* Diese Reagenzien sind nicht Bestandteil des **cobas**® EBV-Testkits. Siehe Liste der zusätzlich benötigten Materialien (Tabelle 7).

** Die Sicherheitskennzeichnung der Produkte erfolgt in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU.

*** Gefährliche Substanz

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Reagenzien müssen wie in Tabelle 5 und Tabelle 6 angegeben gelagert und gehandhabt werden.

Reagenzien, die sich nicht in den **cobas**® 6800/8800 Systems befinden, bei der in Tabelle 5 angegebenen Temperatur lagern.

Tabelle 5 Reagenzlagerung (wenn sich das Reagenz nicht im System befindet)

Reagenz	Lagertemperatur
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

Reagenzien in den **cobas**® 6800/8800 Systems werden bei angemessenen Temperaturen aufbewahrt und ihr Verfallsdatum wird vom System überwacht. Die **cobas**® 6800/8800 Systems lassen die Verwendung der Reagenzien nur zu, wenn alle in Tabelle 6 angegebenen Bedingungen erfüllt sind. Das System verhindert automatisch die Verwendung von abgelaufenen Reagenzien. In Tabelle 6 sind die Bedingungen für die Reagenzhandhabung aufgeführt, die von den **cobas**® 6800/8800 Systems geprüft werden.

Tabelle 6 Haltbarkeit für Reagenzien, die von den **cobas**® 6800/8800 Systems geprüft werden

Reagenz	Verfallsdatum des Kits	Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits	Anzahl der Läufe, für die dieses Kit verwendet werden kann	Haltbarkeit im Gerät (kumulative Zeit im Gerät außerhalb der Kühlung)
cobas® EBV – 192	Datum nicht überschritten	90 Tage ab erstem Gebrauch	Max. 40 Läufe	Max. 40 Stunden
cobas® EBV/BKV Control Kit	Datum nicht überschritten	Keine Angabe[a]	Keine Angabe	Max. 8 Stunden
cobas® Buffer Negative Control Kit	Datum nicht überschritten	Keine Angabe[a]	Keine Angabe	Max. 10 Stunden
cobas omni Lysis Reagent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden*	Keine Angabe	Keine Angabe
cobas omni MGP Reagent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden*	Keine Angabe	Keine Angabe
cobas omni Specimen Diluent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden*	Keine Angabe	Keine Angabe
cobas omni Wash Reagent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden*	Keine Angabe	Keine Angabe

[a] Reagenzien für den Einmalgebrauch

* Zeit ab dem erstmaligen Laden des Reagenzes in die **cobas**® 6800/8800 Systems.

Zusätzlich benötigtes Material

Tabelle 7 Materialien und Verbrauchsmaterialien zur Verwendung auf den **cobas**® 6800/8800 Systems

Material	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
Beutel für Festabfälle	07435967001
Beutel für Festabfälle und Festabfallbehälter oder Beutel für Festabfälle mit Einsatz und Kit-Schublade	07435967001 und 07094361001 oder 08030073001 und 08387281001
Festabfallbehälter	07094361001
cobas omni Sekundärröhrchen 13 × 75 (optional)	06438776001

Benötigte Geräte und Software

Die **cobas**® 6800/8800 Software und das **cobas**® EBV-Analysenpaket müssen auf dem Gerät (bzw. den Geräten) installiert sein. Der IG-Server (Instrument Gateway) ist Bestandteil des Systems.

Tabelle 8 Geräte

Gerät	P/N
cobas® 6800 System (mit beweglicher Plattform)	06379672001
cobas® 6800 System (feststehend)	05524245001
cobas® 8800 System	05412722001
Probenzufuhrmodul	06301037001

Weitere Informationen finden Sie in der Benutzerunterstützung und/oder im Benutzerhandbuch der **cobas**® 6800/8800 Systems.

Hinweis: Eine ausführliche Bestellliste für Probenracks, Racks für verstopfte Spitzen und Racktrays, die auf den Geräten verwendet werden können, ist bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die uneingeschränkte Leistung dieses Tests. Aufgrund der hohen Sensitivität dieses Tests ist besonders darauf zu achten, dass die Reagenzien und Amplifikationsgemische nicht kontaminiert werden.

- Nur zur Verwendung als *in-vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Der **cobas**® EBV-Test wurde nicht zur Verwendung als Screening-Test für das Vorliegen von EBV in Blut oder Blutprodukten evaluiert.
- Die Patientenproben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ und dem CLSI-Dokument M29-A4 beschrieben zu behandeln.[15, 16] Dieses Verfahren darf nur von Personal angewandt werden, das mit dem **cobas**® EBV-Test und den **cobas**® 6800/8800 Systems vertraut und in der Handhabung infektiöser Materialien geschult ist.
- Alle von Menschen gewonnenen Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und müssen unter Anwendung genereller Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Wenn Material verschüttet wurde, betroffenes Areal unverzüglich mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser (Haushaltsbleiche im Verhältnis 1:10 verdünnen) desinfizieren oder die jeweiligen Laborverfahren beachten.
- Das **cobas**® EBV/BKV Control Kit enthält aus menschlichem Blut gewonnenes Plasma. Bei der Untersuchung des Ausgangsmaterials mittels PCR-Methoden konnten geringe Mengen von EBV-DNA nachgewiesen werden, die in einem vertretbaren Bereich lagen. Mit keiner der bekannten Testmethoden kann jedoch eine Übertragung von Infektionserregern durch humane Blutprodukte ausgeschlossen werden.
- **Vollblut und andere Proben in Primärröhrchen nicht einfrieren.**
- Nur die mitgelieferten oder angegebenen erforderlichen Verbrauchsmaterialien verwenden, um eine optimale Leistung des Tests zu gewährleisten.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.
- Alle Verfahren und Vorschriften sind sorgfältig einzuhalten, um eine korrekte Durchführung des Tests sicherzustellen. Jede Abweichung von den Verfahren und Vorschriften kann sich auf die optimale Leistung des Tests auswirken.
- Wird während der Handhabung und Bearbeitung der Proben nicht ordnungsgemäß auf eine Vermeidung von Verschleppung geachtet, kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen.

Umgang mit Reagenzien

- Alle Reagenzien, Kontrollen und Proben sind gemäß der guten Laborpraxis zu handhaben, um eine Verschleppung der Proben und Kontrollen zu vermeiden.
- Vor der Verwendung alle Reagenzkassetten, Verdünnungslösungen, Lysereagenzien und Waschreagenzien visuell auf auslaufende Flüssigkeit überprüfen. Liegen Anzeichen für undichte Stellen vor, das betreffende Material nicht für den Test verwenden.
- **cobas omni** Lysis Reagent enthält die potenziell gefährliche Chemikalie Guanidinthiocyanat. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit Reagenzien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen, um Verätzungen zu vermeiden.
- **cobas**® EBV-Testkits, **cobas omni** MGP Reagent und **cobas omni** Specimen Diluent enthalten Natriumazid als Konservierungsstoff. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit Reagenzien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen, um Verätzungen zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- **cobas omni** Lysis Reagent enthält Guanidinthiocyanat und darf nicht in Kontakt mit Natriumhypochloritlösung (Haushaltsbleiche) gebracht werden. Dieses Gemisch kann ein hochgiftiges Gas erzeugen.
- Sämtliche Materialien, die mit Proben und Reagenzien in Berührung gekommen sind, gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien Laborhandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen. Um Kontamination zu vermeiden, müssen die Handschuhe zwischen der Handhabung von Proben und **cobas**® EBV-Kits sowie **cobas omni** Reagenzien jeweils gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit den Proben und Kontrollen nicht kontaminiert werden.
- Nach Gebrauch der Proben und Kitreagenzien sowie nach dem Ausziehen der Handschuhe gründlich die Hände waschen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren (Haushaltsbleiche im Verhältnis 1:10 verdünnen). Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abwischen.
- Wenn Flüssigkeiten auf den **cobas**® 6800/8800 Systems verschüttet wurden, die Oberflächen gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung und/oder im Benutzerhandbuch der **cobas**® 6800/8800 Systems reinigen und dekontaminieren.

Entnahme, Transport und Lagerung von Proben

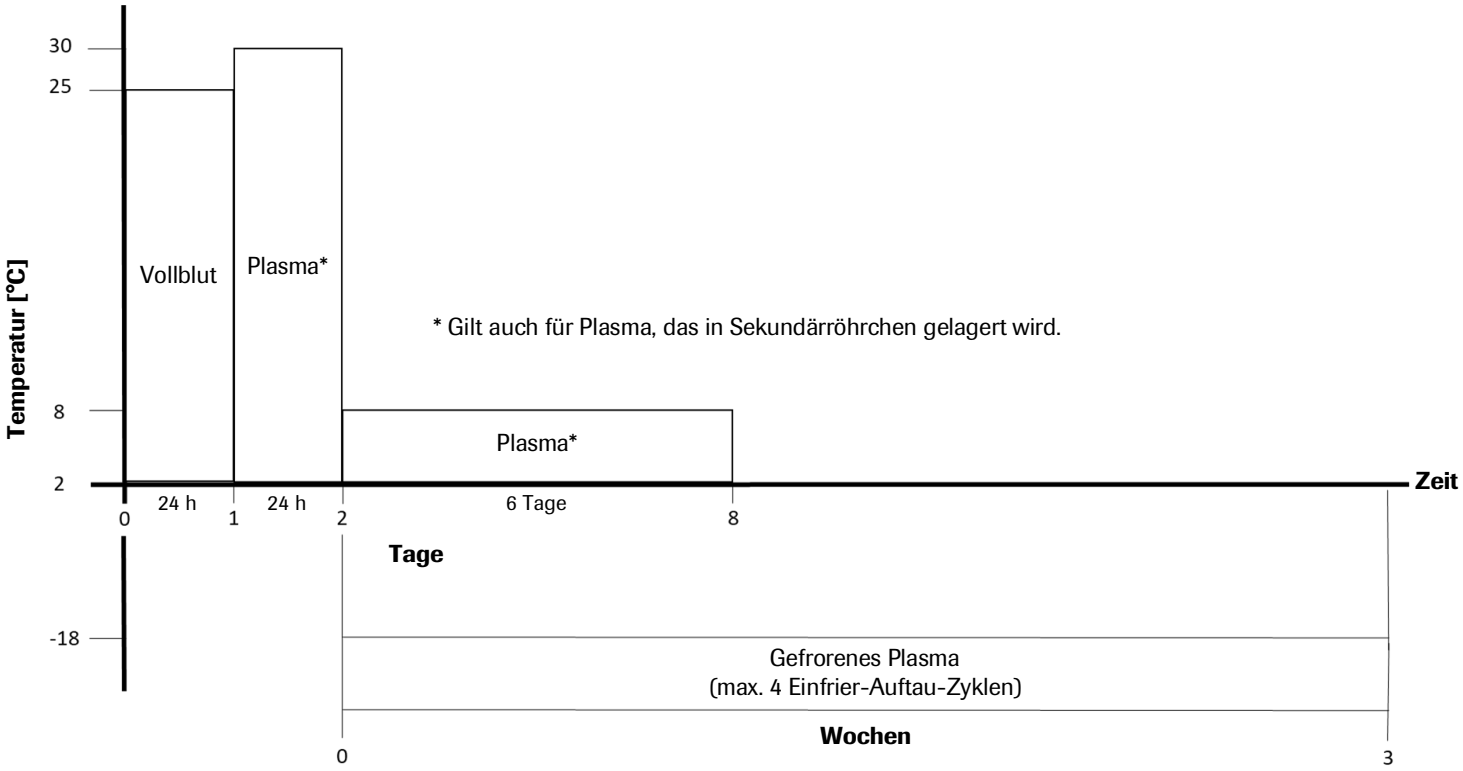
Hinweis: Alle Proben und Kontrollen wie potenzielle Überträger von Infektionserregern behandeln.

Alle Proben bei den angegebenen Temperaturen lagern.
Erhöhte Umgebungstemperaturen wirken sich auf die Probenstabilität aus.
Bei Verwendung gefrorener Proben in Sekundärröhrchen die Proben bei Zimmertemperatur (15–30 °C) vollständig auftauen lassen, kurz mischen (z. B. 3 bis 5 Sekunden im Vortexer) und anschließend zentrifugieren, um das gesamte Probenvolumen am Röhrchenboden zu sammeln.

Proben

- Das Vollblut ist in BD Vacutainer® PPT™ Plasmavorbereitungsröhrchen für molekulare diagnostische Tests oder in sterilen Röhrchen mit EDTA als Antikoagulans zu sammeln. Die Anweisungen des Probenröhrchen-Herstellers beachten. Siehe Abbildung 1.
- Vollblut, das für molekulardiagnostische Tests in BD Vacutainer® PPT™ Plasmavorbereitungsröhrchen oder in sterilen Röhrchen mit EDTA als Antikoagulans gesammelt wurde, kann vor der Vorbereitung des Plasmas bei 2 bis 25 °C maximal 24 Stunden lang gelagert und/oder transportiert werden. Beim Zentrifugieren die Anweisungen des Geräteherstellers beachten.
- Plasmaproben können nach der Abtrennung 24 Stunden lang bei 2 °C bis 30 °C in Primär- oder Sekundärröhren gelagert werden; außerdem gilt:
    - Lagerung in Primär- oder Sekundärröhrchen für maximal 6 Tage bei 2 °C bis 8 °C.
    - Lagerung in Sekundärröhrchen für maximal 3 Wochen bei ≤ –18 °C.
- Plasmaproben dürfen viermal bei ≤ –18 °C eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Abbildung 1 Lagerbedingungen für Proben



- Wenn Proben versandt werden sollen, sind sie gemäß den geltenden nationalen und internationalen Vorschriften für den Transport von Proben und Krankheitserregern zu verpacken und zu beschriften.

Gebrauchsanleitung

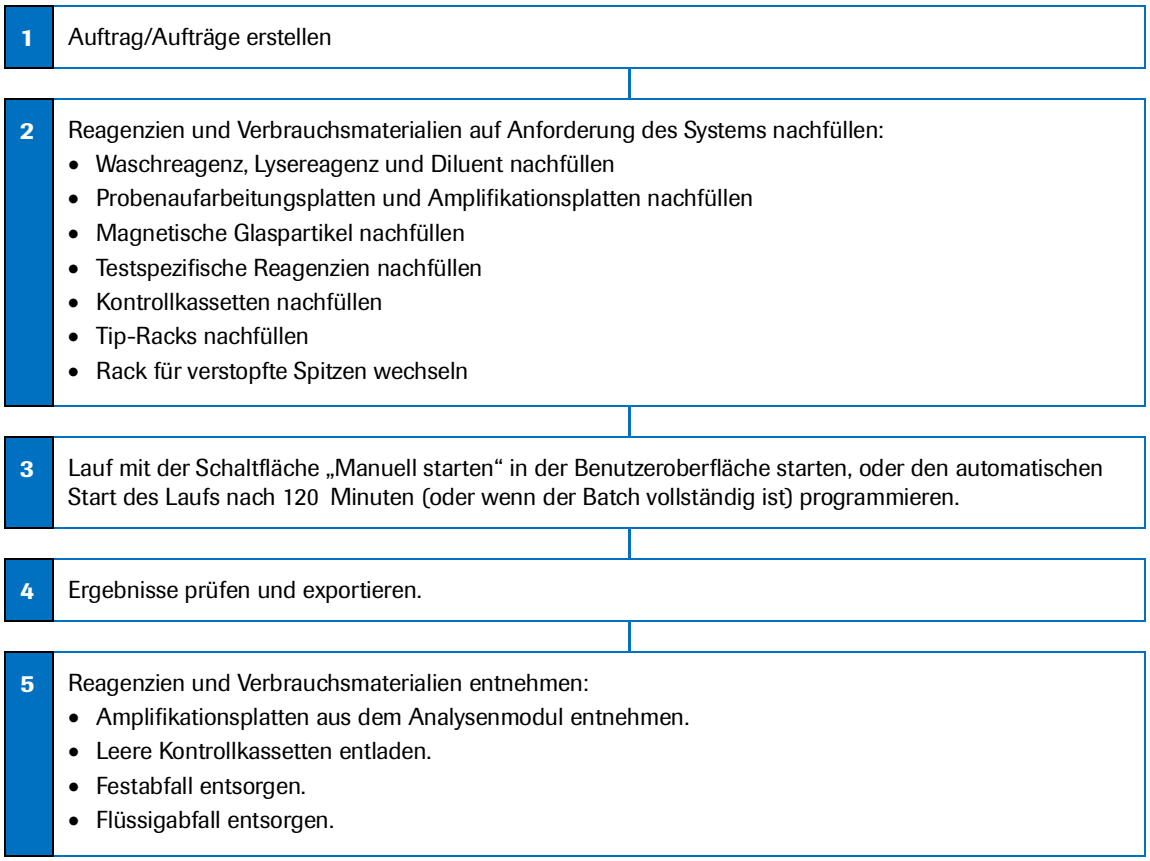
Hinweise zum Verfahren

- Die **cobas**® EBV-Reagenzien, das **cobas**® EBV/BKV Control Kit, das **cobas**® Buffer Negative Control Kit und die **cobas omni** Reagenzien nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Verbrauchsmaterialien nicht wiederverwenden. Sie sind ausschließlich zum Einmalgebrauch vorgesehen.
- Informationen zur ordnungsgemäßen Wartung der Geräte finden Sie in der Benutzerunterstützung und/oder dem Benutzerhandbuch der **cobas**® 6800/8800 Systems.

Durchführen des cobas® EBV-Tests

Zur Durchführung des **cobas**® EBV-Tests ist ein Probenvolumen von 200 µl erforderlich. Der Testablauf ist in der Benutzerunterstützung und/oder im Benutzerhandbuch der **cobas**® 6800/8800 Systems ausführlich beschrieben. In Abbildung 2 ist der Ablauf zusammenfassend dargestellt.

Abbildung 2 **cobas**® EBV-Testablauf



Ergebnisse

Die **cobas**® 6800/8800 Systems dienen zur automatischen Bestimmung der EBV-DNA-Konzentration in Proben und Kontrollen. Die EBV-DNA-Konzentration wird in internationalen Einheiten pro Milliliter (IE/ml) angegeben.

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse

- Mit jedem Batch werden eine Negativkontrolle [(–) C], eine niedrig positive Kontrolle [EBV/BKV L(+)C] und eine hoch positive Kontrolle [EBV/BKV H(+)C] mitgeführt.
- Die **cobas**® 6800/8800 Software und/oder den Bericht auf Flags und generierte Ergebnisse kontrollieren, um die Gültigkeit des Batch zu überprüfen.
- Der Batch ist gültig, wenn für keine der drei Kontrollen Flags ausgegeben wurden, d. h. weder für die Negativkontrolle noch für die beiden Positivkontrollen EBV L(+)C und EBV H(+)C. In der Ergebnisübersicht werden die Negativkontrolle als (–) C und die schwach und hoch positiven Kontrollen als EBV/BKV L(+)C bzw. EBV/BKV H(+)C dargestellt.

Die **cobas**® 6800/8800 Software markiert Ergebnisse bei ausgefallenen Negativ- und Positivkontrollen automatisch als ungültig.

Kontroll-Flags

Tabelle 9 Kontroll-Flags für Negativ- und Positivkontrollen

Negativkontrolle	**Flag**	**Ergebnis**	**Interpretation**
(–) C	Q02 (Kontrollbatch fehlerhaft)	Invalid	Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titer für die Negativkontrolle ist nicht negativ.
Positivkontrolle	**Flag**	**Ergebnis**	**Interpretation**
EBV/BKV L(+)C	Q02 (Kontrollbatch fehlerhaft)	Invalid	Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titerwert für die niedrig positive Kontrolle liegt nicht im Sollbereich.
EBV/BKV H(+)C	Q02 (Kontrollbatch fehlerhaft)	Invalid	Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titerwert für die hoch positive Kontrolle liegt nicht im Sollbereich.

Wenn der Kontroll-Batch ungültig ist, muss der Test mit allen Proben aus dem betroffenen Batch wiederholt werden.

Interpretation der Ergebnisse

Bei gültigen Batches die einzelnen Proben in der **cobas**® 6800/8800 Software und/oder im Bericht auf Flags kontrollieren. Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

- Ein gültiger Batch kann sowohl gültige als auch ungültige Probenergebnisse enthalten.

Tabelle 10 Interpretation der Ergebnisse für die einzelnen Zielsequenzen

Ergebnisse	Interpretation
Target Not Detected	EBV-DNA nicht nachgewiesen. Ergebnisse als „EBV nicht nachgewiesen“ angeben.
< Titer Min	Der errechnete Titer liegt unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze des Tests. Ergebnisse als „EBV nachgewiesen, unter (Titer min)“ angeben. Titer min = 35,0 IE/ml
Titer	Der errechnete Titer liegt innerhalb des linearen Bereichs des Tests, d. h. er ist größer oder gleich Titer min und kleiner oder gleich Titer max. Ergebnisse als „(Titer) von EBV nachgewiesen“ angeben.
> Titer Max[a]	Der errechnete Titer liegt über der oberen Quantifizierungsgrenze des Tests. Ergebnisse als „EBV nachgewiesen, über (Titer max)“ angeben. Titer max = 1,0E+08 IE/ml

[a] Das Probenergebnis „> Titer max“ bezieht sich auf EBV-positive Proben, bei denen EBV mit einem Titer über der oberen Quantifizierungsgrenze nachgewiesen wurde. Wenn ein quantitatives Ergebnis gewünscht wird, die ursprüngliche Probe mit EBV-negativem EDTA-Humanplasma verdünnen und den Test wiederholen. Das dabei ermittelte Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Verfahrenseinschränkungen

- Der **cobas**® EBV-Test ist ausschließlich für den Gebrauch mit dem **cobas**® EBV/BKV Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit, **cobas omni** MGP Reagent, **cobas omni** Lysis Reagent, **cobas omni** Specimen Diluent und **cobas omni** Wash Reagent auf **cobas**® 6800/8800 Systems validiert.
- Zuverlässige Ergebnisse hängen von der sachgemäßen Gewinnung, Lagerung und Bearbeitung der Proben ab.
- Dieser Test wurde ausschließlich für die Verwendung mit EDTA-Plasma validiert. Wenn mit dem **cobas**® EBV-Test andere Arten von Proben getestet werden, können falsche Ergebnisse erzielt werden. Die Messung der Viruslast in Plasma ist nicht direkt mit der Messung anderer Probenarten vergleichbar.
- Die Quantifizierung von EBV-DNA kann durch das Probenentnahmeverfahren, patientenbezogene Faktoren (d. h. Alter, Vorhandensein von Symptomen) und/oder das Infektionsstadium beeinflusst werden.
- Wie bei allen molekularen Tests können Mutationen in den Zielregionen, die durch den **cobas**® EBV-Test abgedeckt werden, die Primer- und/oder Sondenbindung beeinträchtigen und dadurch zur Unterquantifizierung oder Nichterkennung des Virus führen.
- Bevor Benutzer zwischen verschiedenen Verfahren wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Studien zur Korrelation der Methoden durchführen, um die Unterschiede der Verfahren zu ermitteln. Außerdem sollten Benutzer stets die eigenen spezifischen Strategien und Verfahren beachten.
- Der **cobas**® EBV-Test ist nicht zur Verwendung als Screening-Test für das Vorliegen von EBV in Blut oder Blutprodukten vorgesehen.

Nichtklinische Leistungsmerkmale

Wichtigste Leistungsmerkmale

Nachweisgrenze (LoD)

Internationaler WHO-Standard

Die Nachweisgrenze des **cobas**® EBV-Tests wurde anhand einer Verdünnungsreihe des 1. internationalen WHO-Standards für das Epstein-Barr-Virus für Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren (1. internationaler WHO-Standard für EBV, vom NIBSC bereitgestellt: NIBSC 09/260) in EBV-negativem EDTA-Humanplasma bestimmt. Panels mit sechs Konzentrationen und einer Leerprobe wurden mit drei Chargen von **cobas**® EBV-Reagenzien an mehreren Tagen mit mehreren Läufen, Anwendern und Geräten getestet.

Die Ergebnisse für EDTA-Plasma sind in Tabelle 11 bis Tabelle 13 dargestellt. Die Untersuchungen ergeben, dass bei der am wenigsten empfindlichen Charge die Konzentration 18,8 IE/ml beträgt (gemäß PROBIT wird für die Konzentration bei einem 95 %-Konfidenzintervall zwischen 14,5 und 27,5 IE/ml in EDTA-Plasma eine Trefferquote von 95 % erwartet). Die geringste Konzentration mit einer Trefferquote von ≥ 95 % in EDTA-Plasma beträgt 20,0 IE/ml.

Tabelle 11 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, Charge 1

Ausgangstiterkonzentration (EBV-DNA, IE/ml)	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
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
Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	18,8 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 14,5–27,5 IE/ml		

Tabelle 12 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, Charge 2

Ausgangstiterkonzentration (EBV-DNA, IE/ml)	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
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
Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	12,4 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 10,0–17,0 IE/ml		

Tabelle 13 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, Charge 3

Ausgangstiterkonzentration (EBV-DNA, IE/ml)	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
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
Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	18,6 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 14,4–27,1 IE/ml		

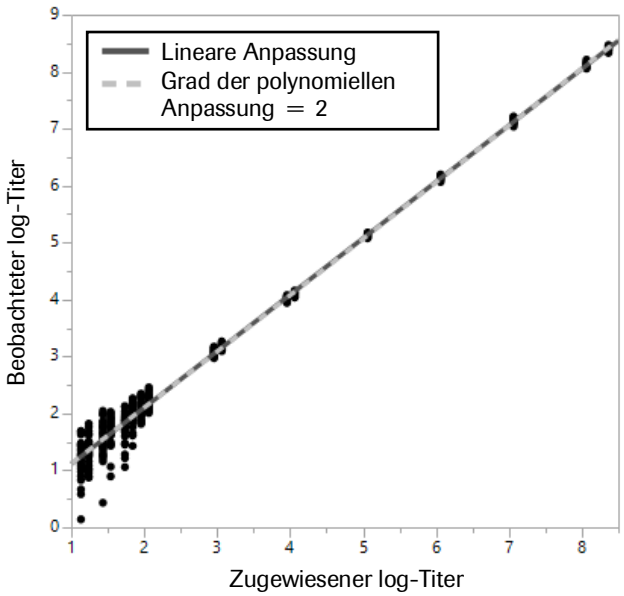
Linearer Bereich

Die Linearität des **cobas**® EBV-Tests wurde anhand einer Verdünnungsreihe aus 17 Panelproben evaluiert, die EBV-DNA des Genotyps 1 über den gesamten linearen Bereich des Tests enthielten. 11 Panelproben, die den gesamten linearen Bereich des Tests abdecken, wurden aus einer Lambda-DNA-Stammlösung mit hohem Titer hergestellt. 6 Panelproben, die den unteren und mittleren linearen Bereich des Tests abdecken, wurden aus einer klinischen Probe hergestellt.

Jede Panelprobe wurde mit 36 Replikaten über drei Chargen von **cobas**® EBV-Testreagenzien getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 3 dargestellt.

Es wurde gezeigt, dass der lineare Bereich des **cobas**® EBV-Tests von 1,40E+01 IE/ml bis 2,30E+08 IE/ml reicht und die absolute Abweichung von der nichtlinearen Regression in EDTA-Humanplasma maximal ±0,1 $\log_{10}$ beträgt (siehe Abbildung 3). Im gesamten linearen Bereich liegt die Genauigkeit des Tests innerhalb von ±0,2 $\log_{10}$.

Abbildung 3 Bestimmung des linearen Bereichs für EDTA-Plasma



Laborinterne Präzision

Die Präzision des **cobas**® EBV-Tests wurde anhand einer Verdünnungsreihe bestimmt, bei der EBV-DNA des Genotyps 1 mit hohem Titer in EBV-negativem EDTA-Plasma analysiert werden. Dabei wurden an 12 Tagen unter Verwendung von drei Geräten und drei Anwendern sechs Verdünnungsstufen mit 72 Replikaten für jede Verdünnung über drei Chargen von **cobas**® EBV-Reagenzien getestet. Alle Proben durchliefen das gesamte **cobas**® EBV-Testverfahren auf vollautomatisierten **cobas**® 6800/8800 Systems. Die hier angegebene Präzision spiegelt daher alle Aspekte des Testverfahrens wider. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Der **cobas**® EBV-Test zeigte für drei Chargen von Reagenzien, die über einen Konzentrationsbereich von 1,08E+02 IE/ml bis 5,40+07 IE/ml getestet wurden, eine hohe Präzision.

Tabelle 14 Laborinterne Präzision des**cobas**® EBV-Tests

Nennkonzentration [IE/ml]	Zugewiesene Konzentration [IE/ml]	EDTA-Plasma			
		Charge 1	Charge 2	Charge 3	Alle Chargen
		SD	SD	SD	SD gepoolt
5,00E+07	5,40E+07	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+06	1,08E+06	0,02	0,03	0,02	0,02
1,00E+05	1,08E+05	0,02	0,02	0,03	0,02
1,80E+04	1,08E+04	0,04	0,02	0,03	0,03
1,80E+03	1,08E+03	0,05	0,05	0,05	0,05
1,00E+02	1,08E+02	0,17	0,18	0,15	0,17

Genotypverifizierung

Die Leistung des **cobas**® EBV-Tests für EBV des Genotyps 2 wurde wie folgt evaluiert:

- Verifizierung der Nachweisgrenze
- Verifizierung des linearen Bereichs

Verifizierung der Nachweisgrenze für Genotyp 2

EBV-DNA für Genotyp 2 wurde in EBV-negativem EDTA-Plasma auf drei verschiedene Konzentrationen verdünnt. Die Trefferquote wurde mit 63 Replikaten je Konzentration bestimmt. Die Tests wurden mit drei Chargen der **cobas**® EBV-Reagenzien an mehreren Tagen mit mehreren Läufen, Anwendern und Geräten durchgeführt. Die Ergebnisse belegen, dass mit dem **cobas**® EBV-Test EBV-DNA des Genotyps 2 in einer Konzentration von 18,8 IE/ml mit einer Trefferquote von ≥ 95 % nachgewiesen werden kann.

Verifizierung des linearen Bereichs für Genotyp 2

Die zur Verifizierung der Genotypenlinearität des **cobas**® EBV-Tests verwendete Verdünnungsreihe umfasste acht Panelproben, die den gesamten linearen Bereich des Tests abdecken. Die Tests wurden mit drei Chargen der **cobas**® EBV-Reagenzien durchgeführt. Es wurden 12 Replikate je Konzentration in EDTA-Plasma getestet.

Der lineare Bereich des **cobas**® EBV-Tests wurde für Genotyp 2 verifiziert.

Spezifität

Die Spezifität des **cobas**® EBV-Tests wurde durch die Analyse von EBV-negativen EDTA-Plasmaproben von Einzelspendern bestimmt. Dazu wurden 101 EDTA-Plasmaproben mit drei Chargen von **cobas**® EBV-Reagenzien getestet. Alle Proben wurden negativ auf EBV-DNA getestet. Die Spezifität des **cobas**® EBV-Tests betrug im Test-Panel 100 % (unteres einseitiges 95-%-Konfidenzintervall: 97,08 %).

Analytische Spezifität

Zur Evaluierung der analytischen Spezifität des **cobas**® EBV-Tests wurde ein Panel aus Mikroorganismen mit EBV-DNA-positivem und EBV-DNA-negativem EDTA-Plasma für Bakterien und Hefe auf eine Konzentration von 1,00E+06 Einheiten/ml (Zellen/ml, CFU/ml, IFU/ml, CCU/ml) und für Viren auf eine Konzentration von ≥ 1,00E+05 Einheiten/ml (IE/ml, Kopien/ml, Zellen/ml, $TCID_{50}$/ml) verdünnt. Die verwendeten Organismen sind in Tabelle 15 aufgeführt. Jede Panelprobe wurde mit dem **cobas**® EBV-Test evaluiert. Keines der Nicht-EBV-Pathogene beeinträchtigte die Testleistung.

Tabelle 15 Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität getestete Mikroorganismen

Viren	Bakterien	Hefen
Adenovirus Typ 5	*Propionibacterium acnes*	*Aspergillus niger*
Humanes Polyomavirus (BK-Virus)	*Staphylococcus aureus*	*Candida albicans*
Cytomegalievirus	*Chlamydia trachomatis*	*Cryptococcus neoformans*
Hepatitis-B-Virus	*Clostridium perfringens*	
Hepatitis-C-Virus	*Enterococcus faecalis*	
Herpes simplex-Virus Typ 1	*Escherichia coli*	
Herpes simplex-Virus Typ 2	*Klebsiella pneumoniae*	
Humanes Herpesvirus Typ 6	*Listeria monocytogenes*	
Humanes Herpesvirus Typ 7	*Mycobacterium avium*	
Humanes Herpesvirus Typ 8	*Neisseria gonorrhoeae*	
Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1	*Staphylococcus epidermidis*	
Humanes Immundefizienz-Virus Typ 2	*Streptococcus pyogenes*	
Humanes Papillomavirus	*Mycoplasma pneumoniae*	
JC-Virus	*Salmonella enterica*	
Parvovirus B19	*Streptococcus pneumoniae*	
Simian-Virus 40		
Varicella-Zoster-Virus		

Analytische Spezifität – Störsubstanzen

Es wurden Proben mit erhöhten Werten von Triglyzeriden (33,0 g/l), konjugiertem Bilirubin (0,2 g/l), unkonjugiertem Bilirubin (0,2 g/l), Albumin (60,0 g/l), Hämoglobin (2,0 g/l) und erhöhten Human-DNA-Werten (2 mg/l) mit und ohne EBV-DNA getestet. Die getesteten endogenen potenziellen Störsubstanzen haben nachweislich keinen störenden Einfluss auf die Leistung des **cobas**® EBV-Tests.

Zusätzlich wurden die in Tabelle 16 aufgeführten Wirkstoffe in dreifacher Cmax-Konzentration mit und ohne EBV-DNA getestet.

Keine der potenziellen Störsubstanzen führte zu einer Störung der Testleistung.

Tabelle 16 Wirkstoffe, die auf einen möglichen störenden Einfluss auf die quantitative Bestimmung von EBV-DNA mit dem **cobas**® EBV-Test getestet wurden

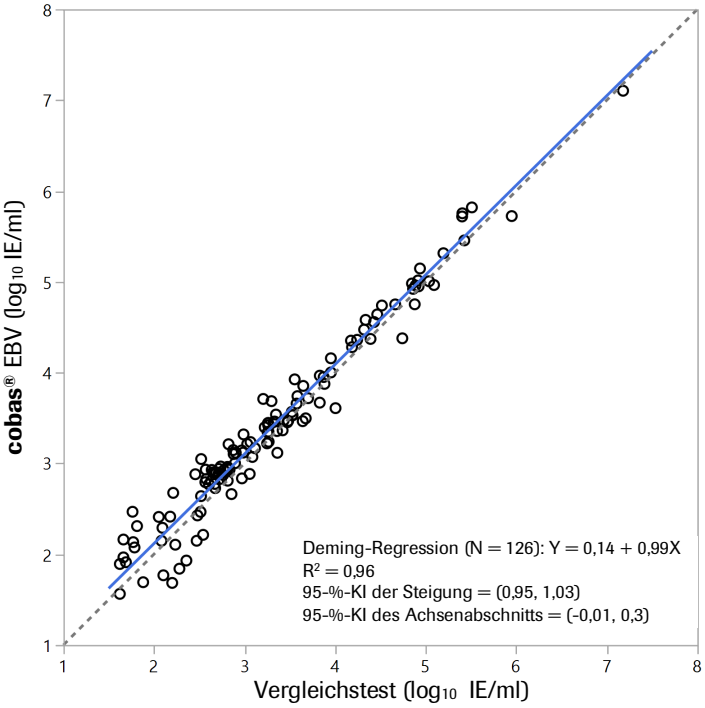
Wirkstoffklasse	**Freiname**	
Antimikrobiotikum	Cefotetan	Sulfamethoxazol
	Clavulanat-Kalium	Ticarcillin-Dinatrium
	Fluconazol	Trimethoprim
	Piperacillin	Vancomycin
	Tazobactam-Natrium	Micafungin
Substanzen zur Behandlung von Herpes-Viren	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Acyclovir	Letermovir
Immunsuppressiva	Azathioprin	Prednison
	Ciclosporin	Sirolimus
	Everolimus	Tacrolimus
	Mycophenolat-Mofetil	Mycophenolsäure

Korrelation der Methode

Die Leistung des **cobas**® EBV-Tests wurde anhand eines Vergleichstests ermittelt, in dem EDTA-Plasmaproben EBV-infizierter Patienten analysiert wurden. Die EDTA-Plasmaproben lagen bei beiden Tests innerhalb des Quantifizierungsbereichs und wurden in einzelnen Replikaten getestet. Es wurde eine Deming-Regressionsanalyse durchgeführt.

Die Ergebnisse der Deming-Regression sind in Abbildung 4 dargestellt.

Abbildung 4 Regressionsanalyse des **cobas**® EBV-Tests im Vergleich zum Vergleichstest



Gesamtsystemausfall

Zur Ermittlung der Gesamtsystemausfall-Rate für den **cobas**® EBV-Test wurden 100 Replikate von EDTA-Plasma getestet, das mit EBV-positiven klinischen Proben versetzt wurde. Diese Proben wurden mit einer Konzentration von der 3fachen Nachweisgrenze getestet.

Die Studie ergab, dass alle Replikate gültig und für die EBV-Zielsequenz positiv waren, was einer Gesamtsystemausfall-Rate von 0 % entspricht (oberes einseitiges 95-%-Konfidenzintervall: 2,95 %).

Kreuzkontamination

Zur Ermittlung der Kreuzkontaminationsrate des **cobas**® EBV-Tests wurden 240 Replikate einer EBV-negativen Matrixprobe sowie 225 Replikate einer Probe mit hohem EBV-Titer von ungefähr 2,00E+07 IE/ml getestet. Es wurden insgesamt fünf Läufe mit Positiv- und Negativproben in Schachbrettkonfiguration durchgeführt.

Alle 240 Replikate der Negativprobe waren negativ, was einer Kreuzkontaminationsrate von 0 % entspricht (oberes einseitiges 95-%-Konfidenzintervall: 1,24 %).

Weitere Informationen

Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests

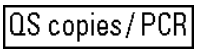
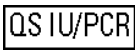
Probenmaterial	EDTA-Plasma
Erforderliche Probenmindestmenge	350 µl*
Probenverarbeitungsvolumen	200 µl
Analytische Sensitivität	18,8 IE/ml
Linearer Bereich	35,0 IE/ml bis 1E+08 IE/ml
Spezifität	100 %
Nachweisbare Genotypen	EBV des Genotyps 1 und 2

* Für die **cobas omni** Sekundärröhrchen wurde ein Totvolumen von 150 µl ermittelt. Andere Teströhrchen können ein anderes Totvolumen aufweisen und mehr oder weniger Volumen erfordern.

Symbole

Die folgenden Symbole werden bei der Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten verwendet.

Tabelle 17 Symbole zur Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten

Zusatz-Software	Unterer Grenzwert des Sollbereichs	Negativkontrolle
Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft	Oberer Grenzwert des Sollbereichs	Positivkontrolle
Barcode-Datenblatt	Im Dunkeln aufbewahren	Kontrolle
Chargenbezeichnung	Ausreichend für <*n*> Tests	Zugewiesener Bereich (Kopien/ml)
Biogefährdung	Temperaturbegrenzung	Zugewiesener Bereich (IE/ml)
Bestellnummer	Testdefinitionsdatei	Standardverfahren
Gebrauchsanweisung beachten	Hersteller	Ultrasensitive-Verfahren
Inhalt der Packung	Verwendbar bis	 Quantifizierungsstandard-Kopien pro PCR-Reaktion zur Berechnung der Ergebnisse
Vertrieb	Globale Artikelnummer GTIN	 Quantifizierungsstandard-IE pro PCR-Reaktion zur Berechnung der Ergebnisse
Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung	Seriennummer	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika.
Rx Only Nur für die USA: In den USA darf dieser Test nach den gesetzlichen Vorschriften nur durch einen Arzt oder auf ärztliche Verschreibung abgegeben werden.	Herstellungsdatum	
In-vitro-Diagnostikum	Nicht wiederverwenden	

Technischer Kundendienst in den USA: 1-800-526-1247

Herstellung und Vertrieb

Tabelle 18 Herstellung und Vertrieb

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)

Marken und Patente

Siehe http://www.roche-diagnostics.us/patents

Copyright

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany

Literatur

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 JI. 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.

Dokumentversion

Dokumentversionsübersicht	
Doc Rev. 1.0 07/2019	Erstveröffentlichung.