

cobas[®] BKV

Ilościowy test kwasu nukleinowego do użytku z systemami cobas[®] 5800/6800/8800

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

cobas[®] BKV

P/N: 09040960190

Do użytku z systemem cobas[®] 5800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Do użytku z systemami cobas[®] 6800/8800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 08688214190 lub

P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 lub

P/N: 09051953190

Spis treści

Przeznaczenie.....	5
Podsumowanie oraz opis testu.....	5
Odczynniki i materiały.....	8
Odczynniki i kontrole do testu cobas® BKV.....	8
Odczynniki cobas® omni do przygotowywania próbek.....	11
Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników.....	12
Wymagania dotyczące użytkowania systemu cobas® 5800.....	12
Wymagania dotyczące użytkowania systemów cobas® 6800/8800.....	13
Materiały dodatkowe wymagane dla systemu cobas® 5800.....	14
Materiały dodatkowe wymagane dla systemów cobas® 6800/8800.....	15
Wymagane urządzenia i oprogramowanie.....	16
Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania.....	17
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	17
Użytkowanie odczynników.....	18
Dobra praktyka laboratoryjna.....	18
Pobieranie, transport i przechowywanie próbek.....	19
Próbki osocza krwi pobranej na EDTA.....	19
Próbki moczu.....	20
Instrukcja użytkowania.....	22
Uwagi proceduralne.....	22
Wykonanie testu cobas® BKV w systemie cobas® 5800.....	22
Wykonanie testu cobas® BKV w systemach cobas® 6800/8800.....	24
Wyniki.....	25
Kontrola jakości i ważność wyników w systemie cobas® 5800.....	25
Wyniki kontroli w systemie cobas® 5800.....	25

Kontrola jakości i ważność wyników w systemach cobas ® 6800/8800	26
Oflagowanie kontroli w systemach cobas ® 6800/8800	26
Interpretacja wyników	27
Interpretacja wyników w systemie cobas ® 5800	27
Interpretacja wyników w systemach cobas ® 6800/8800	28
Ograniczenia metody	28
Niekliniczna ocena wiarygodności	29
Kluczowe parametry wiarygodności testu – próbki osocza krwi pobranej na EDTA oznaczane w systemach cobas ® 6800/8800	29
Granica wykrywalności (LoD) międzynarodowego standardu WHO	29
Zakres liniowości	30
Precyzja wewnątrz laboratorium	31
Weryfikacja podtypu	32
Swoistość	32
Swoistość analityczna	32
Swoistość analityczna – substancje interferujące	34
Korelacja metody	34
Błąd całego systemu	35
Kontaminacja między próbkami	35
Kluczowe parametry wiarygodności testu – próbki moczu oznaczane w systemach cobas ® 6800/8800	36
Granica wykrywalności (LoD) międzynarodowego standardu WHO	36
Zakres liniowości	37
Precyzja wewnątrz laboratorium	38
Weryfikacja podtypu	39
Swoistość	39
Swoistość analityczna	39
Swoistość analityczna – substancje interferujące	40
Korelacja metody	42
Kontaminacja między próbkami	42

Ocena skuteczności w badaniach klinicznych przeprowadzona w systemach cobas® 6800/8800 43

Powtarzalność testu cobas® BKV – próbki osocza krwi pobranej na EDTA.....	43
Wiarygodność kliniczna testu cobas® BKV – próbki osocza krwi pobranej na EDTA	44
Powtarzalność testu cobas® BKV – próbki stabilizowanego moczu.....	46
Wiarygodność testu cobas® BKV – próbki stabilizowanego moczu	47
Równoważność/porównanie systemu	50

Dodatkowe informacje 51

Najważniejsze cechy testu	51
Oznaczenia	52
Pomoc techniczna	53
Wytwórca i importer.....	53
Znaki towarowe i patenty.....	53
Prawo autorskie	53
Piśmiennictwo	54
Wersja dokumentu.....	55

Przeznaczenie

cobas® BKV to test do amplifikacji kwasu nukleinowego w warunkach *in vitro* do ilościowego oznaczania DNA wirusa BK (BKV) w ludzkim osoczu z krwi pobranej na EDTA oraz moczu stabilizowanym na podłożu **cobas® PCR Media**.

W osoczu z krwi pobranej na EDTA test **cobas® BKV** jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w diagnostyce i leczeniu zakażeń BKV u pacjentów po przeszczepach. U pacjentów monitorowanych pod kątem BKV w osoczu krwi pobranej na EDTA można użyć seryjnych pomiarów poziomu DNA do wskazania potrzeby potencjalnych zmian leczenia i do oceny odpowiedzi wirusa na leczenie.

W moczu stabilizowanym na podłożu **cobas® PCR Media** test **cobas® BKV** jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w diagnostyce i leczeniu zakażeń BKV u pacjentów po przeszczepach.

Wyniki testu **cobas® BKV** muszą być interpretowane w oparciu o wszystkie istotne dane kliniczne i laboratoryjne.

Test **cobas® BKV** nie jest przeznaczony do stosowania jako badanie przesiewowe we krwi lub produktach krwiopochodnych.

Podsumowanie oraz opis testu

Informacje podstawowe

Pacjenci po przeszczepach narażeni są na podwyższone ryzyko wielu zakażeń bakteryjnych i wirusowych, które wykazują większe prawdopodobieństwo wywołania ciężkiego niepożądanego wpływu na zdrowie w populacji po przeszczepach w porównaniu z ogólną, zdrową populacją. To zwiększone ryzyko w części wynika z osłabionego działania układu odpornościowego spowodowanego przez leki immunosupresyjne przyjmowane przez pacjentów po przeszczepach w celu zmniejszenia ryzyka odrzucenia przeszczepu.^{1,2}

Wirus BK (BKV) to mały (~5 kb) bezotczkowy wirus na bazie kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA) należący do rodziny poliomawirusów. Istnieją cztery główne podtypy BKV, z których najczęściej wykrywa się podtyp I (80%), a następnie podtyp IV (15%).³ Seroprewalencja BKV w ogólnej populacji zdrowych dorosłych wynosi > 80%.⁴ U osób z prawidłową odpornością obecność BKV nie wiąże się z istotnymi nieprawidłowościami. Jednakże zakażenie BKV może powodować ciężką chorobę kliniczną u osób z obniżoną odpornością, włącznie z pacjentami po przeszczepach.⁵

Zakażenia BKV najczęściej dotyczą nerek i dróg moczowych. Po zakażeniu pierwotnym wirus pozostaje utajony w nabłonku kanalików nerkowych oraz moczowodów i może ulec reaktywacji u osób z osłabionym układem odpornościowym. Pacjenci po przeszczepie nerki narażeni są na wyższe ryzyko powikłań związanych z BKV w porównaniu z biorcami innych przeszczepów, obejmujące także śródmiąższowe zapalenie nerki wywołane poliomawirusem (PVN) i zwężenie moczowodu. PVN występuje u nawet 10% pacjentów po przeszczepie nerki i u około 50% pacjentów z PVN dochodzi do odrzucenia przeszczepu. Ponadto u około 3% pacjentów po przeszczepie nerki dochodzi do związanego z BKV zwężenia moczowodu.⁵ W przypadku przeszczepów hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCT) również częściej dochodzi do powikłań związanych z BKV, najpowszechniej w postaci krwotocznego zapalenia pęcherza moczowego (HC). HC występuje u od 5 do 15% pacjentów po HSCT.¹

Wytyczne zalecają regularne monitorowanie pod kątem BKV u pacjentów po przeszczepie nerki przez okres do 5 lat po przeszczepie.⁶ Takie podejście do monitorowania umożliwia identyfikację 80–90% pacjentów zagrożonych PVN. Badania osocza pod kątem wirerii BKV są zalecane w ramach strategii identyfikacji pacjentów o podwyższonym ryzyku

wystąpienia PVN, jako testy potwierdzające u pacjentów z wykrytą wirurią BKV albo jako główny sposób testów do rutynowych badań przesiewowych.⁶ Obecnie brak zaleceń dotyczących rutynowego monitorowania BKV u pacjentów po HSCT, a testowanie zalecane jest głównie w celu oceny pacjentów z krwimoczem i objawami klinicznymi zapalenia pęcherza. Jednakże poziom DNA BKV powyżej 10 000 kopii/ml wiąże się z podwyższonym ryzykiem HC u pacjentów po przeszczepach.⁷

W przypadku pacjentów po przeszczepie nerki, u których utrzymuje się podwyższony poziom DNA wirusa BKV w osoczu, powszechnie definiowany jako wartości pomiaru powyżej 10 000 kopii/ml, zaleca się oznaczanie BKV w osoczu co 1–2 tygodnie do czasu obniżenia poziomu DNA do poziomu niewykrywalnego w dwóch kolejnych pomiarach.

Wiele testów laboratoryjnych do ilościowego oznaczania BKV nie zostało wystandaryzowanych, co prowadzi do dużej zmienności międzylaboratoryjnej i pomiędzy oznaczeniami^{6,7}. Ponadto składniki moczu mogą prowadzić do agregacji BKV, co może wpływać na zmienność ilościową^{8,9}. Formalna ocena powtarzalności i ważności wyników oznaczania poziomu DNA wirusa BKV jest kluczowa dla zapewnienia spójnych wyników (niezależnie od tego, w jakim laboratorium wykonano test) w celu kontroli klinicznej nad pacjentami z chorobami związanymi z wirusem BKV.

Chociaż ściśle, istotne medycznie wartości progowe wiremii nadal są przedmiotem debaty ze względu na zmienność pomiędzy testami, koncepcja kluczowej wartości progowej wydaje się być ważna i była zgłaszana w badaniach biologicznych wskazujących, że wyższe poziomy DNA wirusa BKV związane są ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby PVN i HC.^{6,7}

Uzasadnienie badań NAT

Badań serologicznych wirusa poliomowy nie stosuje się rutynowo w środowisku klinicznym, mają one znaczenie jedynie w określaniu, czy pacjent został wcześniej zakażony BKV i czy grozi mu reaktywacja. Metody hodowli wirusów wiążą się z długim czasem oznaczenia, a ponieważ są tylko półilościowe, oferują jedynie ograniczoną przydatność u pacjentów z osłabionym układem odpornościowym, u których często występują niskie poziomy wirusa. Bezpośrednia detekcja DNA wirusa BKV za pomocą metod PCR w czasie rzeczywistym potencjalnie oferuje szeroki zakres dynamiczny, precyzję oraz optymalną czułość i swoistość do stosowania u pacjentów po przeszczepach.

Objaśnienie testu

Test ilościowy cobas® BKV jest stosowany w systemach cobas® 5800/6800/8800. Test cobas® BKV umożliwia wykrywanie oraz oznaczanie ilościowe DNA wirusa BKV w pobranych od zakażonych pacjentów próbkach osocza krwi pobranej na EDTA oraz w moczu zakażonych pacjentów stabilizowanym na podłożu cobas® PCR Media. Poziom DNA wirusa BKV jest określany ilościowo w porównaniu ze standardem kwantyfikacji DNA nie-BKV (DNA-QS), który jest wprowadzany do każdej próbki podczas jej przetwarzania. DNA-QS pełni również funkcje monitorowania całego procesu przygotowania próbki oraz amplifikacji PCR. Dodatkowo test wykorzystuje trzy kontrole zewnętrzne: o wysokim mianie dodatnim, o niskim mianie dodatnim i kontrolę ujemną. Zewnętrzne kontrole wysokododatnie i niskododatnie wytwarza się przez rozcieńczanie z materiału wyjściowego o mianie spójnym z międzynarodowym standardem WHO BKV. Każda seria zestawu do amplifikacji/detekcji została skalibrowana w odniesieniu do międzynarodowego standardu WHO BKV.

Zasady procedury

Test **cobas**® BKV opiera się na całkowicie zautomatyzowanym przygotowaniu próbek (ekstrakcji i oczyszczaniu kwasów nukleinowych), po którym przeprowadzana jest amplifikacja i detekcja podczas reakcji PCR. System **cobas**® 5800 zaprojektowano jako urządzenie zintegrowane. **cobas**® 6800/8800 składa się z modułu podawania próbek, modułu transferu, modułu przetwarzania oraz modułu analitycznego. Automatyczne przetwarzanie danych jest wykonywane przez oprogramowanie systemów **cobas**® 5800 lub **cobas**® 6800/8800, które przypisuje wynik testu dotyczący wszystkich badań jako nie wykryto targetu, wykryto DNA wirusa BKV < dolnej granicy oznaczalności, wykryto DNA wirusa BKV > górnej granicy oznaczalności lub wartość w liniowym zakresie oznaczalności (dolna granica oznaczalności < x < górna granica oznaczalności). Wyniki można analizować bezpośrednio na ekranie systemu, można je eksportować lub wydrukować w postaci raportu.

Następuje jednoczesne wyodrębnienie kwasów nukleinowych z próbek pacjentów i dodanych cząsteczek DNA-QS lambda. Podsumowując, kwas nukleinowy wirusa jest uwalniany przez dodanie do próbki proteinazy i odczynnika do lizy. Uwolniony kwas nukleinowy wiąże się z silikonową powierzchnią dodanych szklanych cząstek magnetycznych. Niezwiązane substancje i zanieczyszczenia, takie jak zdenaturowane białko, debris komórkowy i potencjalne inhibitory reakcji PCR są usuwane na kolejnych etapach z użyciem odczynnika myjącego, a oczyszczony kwas nukleinowy jest następnie wmywany w podwyższonej temperaturze ze szklanych cząstek z użyciem buforu do elucji.

Wybiórczą amplifikację docelowego kwasu nukleinowego z próbki osiąga się przez zastosowanie dwóch starterów, dla których obszarami docelowymi są swoiste dla wirusa docelowego, wysoce konserwatywne rejony BKV znajdujące się w rejonie genu małego antygeny t BKV oraz rejonie VP2 BKV. Selektywna amplifikacja DNA-QS uzyskiwana jest przy użyciu starterów wiodącego i odwrotnego o swoistej sekwencji, które wybierane są tak, aby nie były homologiczne z genomem BKV. Do amplifikacji wykorzystywana jest termostabilna polimeraza DNA. Sekwencje docelowa oraz DNA-QS są amplifikowane jednocześnie przy użyciu uniwersalnego profilu amplifikacji PCR ze wstępnie zdefiniowanymi etapami temperatury i liczby cykli. Odczynnik Master Mix zamiast trifosforanu deoksytymidyny (dTTP) zawiera trifosforan deoksyurydyny (dUTP), który wbudowywany jest do nowo syntetyzowanego DNA (amplikonu).¹⁰⁻¹² Jakikolwiek zanieczyszczający amplikon z poprzednich reakcji PCR ulegają eliminacji podczas podgrzewania w pierwszym etapie cyklu termicznego dzięki aktywności enzymu AmpErase, który znajduje się w mieszaninie do reakcji PCR. Jednak nowo powstały amplikon nie jest eliminowany, gdyż enzym AmpErase w temperaturze przekraczającej 55°C ulega inaktywacji.

Odczynnik Master Mix **cobas**® BKV zawiera dwie sondy wykrywające swoiste dla badanych sekwencji BKV i jedną dla DNA-QS. Sondy znakowane są za pomocą swoistych dla sekwencji docelowych fluorescencyjnych barwników reporterowych, pozwalających na równoczesne wykrywanie docelowej sekwencji BKV i DNA-QS w dwóch różnych kanałach detekcji^{13, 14}. Sygnał fluorescencyjny nienaruszonych sond jest tłumiony przez barwnik wygaszający. Podczas amplifikacji PCR hybrydyzacja sondy do swoistej sekwencji jednoniciowej matrycy DNA powoduje rozszczepienie nici przez polimerazę DNA dzięki jej aktywności nukleolitycznej w kierunku 5' do 3', co powoduje rozdzielanie barwników reporterowych i wygaszających oraz wygenerowanie sygnału fluorescencyjnego. Z każdym cyklem PCR generowana jest zwiększająca się liczba rozszczepionych sond i jednocześnie wzrasta sumaryczny sygnał barwnika reporterowego. Wykrycie w czasie rzeczywistym i rozróżnienie produktów PCR ma miejsce poprzez pomiar fluorescencji uwolnionych barwników reporterowych reprezentujących docelowe wirusy i DNA-QS.

Odczynniki i materiały

Odczynniki i kontrole do testu cobas® BKV

Materiały dostarczone dla testu cobas® BKV zawiera Tabela 1. Materiały wymagane, ale niedostarczone: patrz Tabela 2 do Tabela 4 oraz Tabela 8 do Tabela 10.

Informacje dotyczące zagrożeń związanych z produktem zawierają rozdziały **Odczynniki i materiały** oraz **Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania**.

Tabela 1 cobas® BKV

cobas® BKV

Przechowywać w temperaturze 2–8°C

Kaseta na 192 testów (P/N 09040960190)

Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw 192 testów
Roztwór proteinazy (PASE)	Bufor Tris, < 0,05% EDTA, chlorek wapnia, octan wapnia, 8% proteinazy, glicerol EUH210: Karta charakterystyki dostępna na żądanie. EUH208: Zawiera subtylizynę z <i>Bacillus subtilis</i> . Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej.	22,3 ml
DNA Quantitation Standard (DNA QS)	Bufor Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% konstruktu innego niż DNA BKV zawierającego starter wiążący region inny niż BKV oraz region unikatowej sondy (niezakaźny DNA), < 0,002% Poli-rA RNA (syntetyczny), < 0,1% azydku sodu	21,2 ml
Bufor do elucji (EB)	Bufor Tris, 0,2% metylo-4-hydroksybenzoesan	21,2 ml
Odczynnik Master Mix 1 (MMX-R1)	Octan magnezu, wodorotlenek potasu, < 0,1% azydku sodu	7,5 ml
Odczynnik BKV Master Mix 2 (BKV MMX-R2)	Bufor trycynowy, octan potasu, < 18% dimetylosulfotlenku, glicerol, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% starterów wiodącego i odwrotnego dla BKV, < 0,01% starterów wiodącego i odwrotnego standardu ilościowego, < 0,01% znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond oligonukleotydowych, swoistych dla BKV i standardu ilościowego BKV, < 0,01% aptameru oligonukleotydowego, < 0,01% polimerazy DNA Z05D, < 0,10% enzymu AmpErase (uracylo-N-glikozylazy) (bakteryjnej), < 0,1% azydku sodu	9,7 ml

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

Przechowywać w 2–8°C

Do użytku z systemem cobas® 5800 (P/N 09040951190)

Do użytku z systemami cobas® 6800/8800 (P/N 08688214190 lub P/N 09040951190)

Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
EBV/BKV Low Positive Control (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001% syntetycznego (plazmidowego) DNA BKV opłaszczanego białkiem kapsydowym bakteriofaga lambda, prawidłowe osocze ludzkie, bez DNA BKV wykrywalnego metodami PCR 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  OSTRZEŻENIE H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H412: Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P362 + P364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. P501: Zawartość/pojemnik usuwać do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów. 55965-84-9 Masa reakcyjna: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu (3:1).
EBV/BKV High Positive Control (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001% syntetycznego (plazmidowego) DNA BKV opłaszczanego białkiem kapsydowym bakteriofaga lambda, prawidłowe osocze ludzkie, bez DNA BKV wykrywalnego metodami PCR 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  OSTRZEŻENIE H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H412: Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P362 + P364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. P501: Zawartość/pojemnik usuwać do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów. 55965-84-9 Masa reakcyjna: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu (3:1).

* Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zgodne przede wszystkim z wytycznymi GHS UE.

** Substancja lub mieszanina niebezpieczna.

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

Przechowywać w temperaturze 2–8°C

Do użytku z systemem cobas® 5800 (P/N 09051953190)

Do użytku z systemami cobas® 6800/8800 (P/N 07002238190 lub P/N 09051953190)

Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw
cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)	Bufor Tris, < 0,1% azydku sodu, EDTA, 0,002% poly rA RNA (syntetycznego)	16 ml (16 × 1 ml)

Odczynniki cobas® omni do przygotowywania próbek

Tabela 4 Odczynniki **cobas® omni** do przygotowywania próbek

Odczynniki	Skład odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Przechowywać w 2–8°C (P/N 06997546190)	Szklane cząstki magnetyczne, bufor Tris, 0,1% metylo-4-hydroksybenzoesanu, < 0,1% azydku sodu	480 testów	Nie dotyczy
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Przechowywać w 2–8°C (P/N 06997511190)	Bufor Tris, 0,1% metylo-4-hydroksybenzoesanu, < 0,1% azydku sodu	4 × 875 ml	Nie dotyczy
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Przechowywać w 2–8°C (P/N 06997538190)	43% (udział wagowy) tiocyjanian guanidyny**, 5% (udział wagowo-obj.) polidokanol**, 2% (udział wagowo-obj.) ditiotreitol**, dwuwodny cytrynian sodu EUH032: W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy.	4 × 875 ml	 NIEBEZPIECZEŃSTWO H302 + H332: Działa szkodliwie po połknięciu i w następstwie wdychania. H314: Powoduje poważne oparzenia oraz uszkodzenia oczu. H411: Działa toksycznie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. P303 + P361 + P353: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody. P304 + P340 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P305 + P351 + P338 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P391: Zebrać wyciek. 593-84-0 Tiocyjanian guanidyny 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol
cobas® omni Wash Reagent (WASH) Przechowywać w 15–30°C (P/N 06997503190)	Dwuwodny cytrynian sodu, 0,1% metylo-4-hydroksybenzoesan	4,2 l	Nie dotyczy

* Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zgodne przede wszystkim z wytycznymi GHS UE.

** Substancja lub mieszanina niebezpieczna.

Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników

Odczynniki należy przechowywać i użytkować zgodnie z informacjami, które zawiera Tabela 5, Tabela 6 i Tabela 7.

Jeśli odczynniki nie zostały umieszczone w systemie **cobas® 5800** ani w systemach **cobas® 6800/8800**, należy przechowywać je w odpowiedniej temperaturze, zgodnie z informacjami, które zawiera Tabela 5.

Tabela 5 Przechowywanie odczynników (umieszczonych poza systemem)

Odczynnik	Temperatura przechowywania
cobas® BKV	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

Wymagania dotyczące użytkowania systemu **cobas® 5800**

Odczynniki umieszczone w systemie **cobas® 5800** przechowywane są w odpowiedniej temperaturze, a ich data przydatności do użycia monitorowana jest przez system. System umożliwia wykorzystanie odczynników tylko w przypadku spełnienia wszystkich warunków, które zawiera Tabela 6. System automatycznie uniemożliwia wykorzystanie przeterminowanych odczynników. Tabela 6 pozwala na zrozumienie warunków użytkowania odczynników wymuszanych przez system **cobas® 5800**.

Tabela 6 Warunki dotyczące daty ważności odczynników wymuszane przez system **cobas® 5800**

Odczynnik	Data ważności zestawu	Trwałość zestawu po otwarciu	Liczba przebiegów pracy, do których można wykorzystać zestaw	Stabilność na pokładzie aparatu
cobas® BKV	Nieprzekroczona	90 dni od pierwszego użycia	Maksymalnie 40 przebiegów	Maks. 36 dni**
cobas® EBV/BKV Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy*	Nie dotyczy	Maks. 36 dni**
cobas® Buffer Negative Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy*	Nie dotyczy	Maks. 36 dni**
cobas® omni Lysis Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie**	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas® omni MGP Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie**	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas® omni Specimen Diluent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie**	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas® omni Wash Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie**	Nie dotyczy	Nie dotyczy

* Odczynniki do jednorazowego użycia.

** Czas jest mierzony od umieszczenia po raz pierwszy odczynnika w systemie **cobas® 5800**.

Wymagania dotyczące użytkowania systemów cobas® 6800/8800

Odczynniki umieszczone w systemach cobas® 6800/8800 przechowywane są w odpowiedniej temperaturze, a ich data przydatności do użycia monitorowana jest przez system. Systemy cobas® 6800/8800 umożliwiają wykorzystanie odczynników tylko w przypadku spełnienia wszystkich warunków, które zawiera Tabela 7. System automatycznie uniemożliwia wykorzystanie przeterminowanych odczynników. Tabela 7 pozwala na zrozumienie wymuszonych przez systemy cobas® 6800/8800 warunków użytkowania odczynników.

Tabela 7 Warunki dotyczące daty ważności odczynników wymuszane przez systemy cobas® 6800/8800

Odczynnik	Data ważności zestawu	Trwałość zestawu po otwarciu	Liczba przebiegów pracy, do których można wykorzystać zestaw	Stabilność na pokładzie urządzenia (łącznie czas w urządzeniu poza chłodziarką)
cobas® BKV	Nieprzekroczona	90 dni od pierwszego użycia	Maksymalnie 40 przebiegów	Maksymalnie 40 godzin
cobas® EBV/BKV Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy*	Nie dotyczy	Maksymalnie 8 godzin
cobas® Buffer Negative Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy*	Nie dotyczy	Maksymalnie 10 godzin
cobas® omni Lysis Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie**	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas® omni MGP Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie**	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas® omni Specimen Diluent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie**	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas® omni Wash Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie**	Nie dotyczy	Nie dotyczy

* Odczynniki do jednorazowego użycia.

** Czas jest mierzony od umieszczenia po raz pierwszy odczynnika w systemach cobas® 6800/8800.

Materiały dodatkowe wymagane dla systemu cobas® 5800

Tabela 8 Materiały i materiały zużywalne do użytku z systemem **cobas® 5800**

Materiał	P/N
cobas® omni Processing Plate 24	08413975001
cobas® omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas® omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Końcówki CORE TIPS z filtrem, 1 ml	04639642001
Końcówki CORE TIPS z filtrem, 300 µl	07345607001
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
Worek na odpady stałe lub Worek na odpady stałe z wkładką	07435967001 lub 08030073001
Probówki wtórne cobas® omni 13×75 (opcjonalnie)	06438776001
Zestaw probówek wtórnych cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
Zestaw zapasowych korków probówek cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
Zestaw jednorazowego stojaka probówki z podłożem cobas® PCR Media Disposable Tube Stand Kit (opcjonalny)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050*, **	03143449001
RD5 RACK – statyw standardowy RD 0001-0050 LR*, **	11902997001
16-pozycyjny nośnik probówek*	09224319001
Nośnik statywów 5-pozycyjnych*	09224475001

* Aby uzyskać szczegółową listę zamawiania statywów na próbki, należy skontaktować się z przedstawicielem firmy Roche.

** Statywy MPA 16 mm lub 16-pozycyjne nośniki probówek to preferowane statywy do stosowania z próbkami pobranymi do probówek z podłożem **cobas®** PCR Media.

Materiały dodatkowe wymagane dla systemów cobas® 6800/8800

Tabela 9 Materiały i materiały zużywalne do użytku z systemami cobas® 6800/8800

Materiał	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
Worek na odpady stałe i pojemnik na odpady stałe lub Worek na odpady stałe z wkładką i pojemnik na odpady stałe do szuflady zestawu	07435967001 i 07094361001 lub 08030073001 i 08387281001
Probówki wtórne cobas® omni 13×75 (opcjonalnie)	06438776001
Zestaw probówek wtórnych cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
Zestaw zapasowych korków probówek cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
Zestaw jednorazowego stojaka probówki z podłożem cobas® PCR Media Disposable Tube Stand Kit (opcjonalny)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050*, **	03143449001

* Szczegółową listę zamówień na statywy próbkowe, statywy na niedrożne końcówki i tace na statywy akceptowane przez urządzenia można uzyskać po skontaktowaniu się z przedstawicielem serwisu Roche.

** MPA 16 mm to preferowany statyw do stosowania z próbkami pobranymi do probówek cobas® PCR Media.

Tabela 10 Zestawy do pobierania materiałów moczu używane z testem cobas® BKV

Zestaw do pobierania	P/N
cobas® PCR Urine Sample Kit	05170486190
cobas® PCR Media Kit	06466281190

Uwaga: Zestaw do pobierania próbek moczu cobas® PCR Urine Sample Kit służy do pobierania i transportowania próbek moczu. Każdy zestaw do pobierania próbek moczu cobas® PCR Urine Sample Kit zawiera 100 pakietów do pobierania próbek moczu cobas® PCR. Każdy pakiet zawiera 1 pipetę jednorazową oraz 1 probówkę cobas® PCR Media, zawierającą 4,3 ml podłoża cobas® PCR Media. Podłoże cobas® PCR Media jest podłożem stabilizującym kwasy nukleinowe, służącym do transportu i przechowywania próbek moczu.

W przypadku próbek moczu wysłanych do laboratorium bezpośrednio, bez użycia zestawu do pobierania próbek moczu cobas® PCR Urine Sample Kit, jako alternatywy można użyć zestawu cobas® PCR Media zawierającego 100 probówek cobas® PCR Media (bez pipet jednorazowych), biorąc pod uwagę fakt, że mocz musi zostać przeniesiony w ciągu 24 godzin od pobrania.

Wymagane urządzenia i oprogramowanie

W urządzeniu **cobas® 5800** musi być zainstalowane oprogramowanie systemu **cobas® 5800** oraz pakiet oprogramowania do analizy **cobas® BKV** dla urządzenia **cobas® 5800**. Z systemem zostanie dostarczone oprogramowanie Data Manager oraz komputer PC dla systemu **cobas® 5800**.

W aparatach należy zainstalować oprogramowanie **cobas® 6800/8800** oraz pakiet oprogramowania do analizy **cobas® BKV**. Z systemem dostarczany jest serwer Instrument Gateway (IG).

Tabela 11 Urządzenia

Wyposażenie	P/N
cobas® 5800 System	08707464001
cobas® 6800 System (opcja, na ruchomej platformie)	05524245001 i 06379672001
cobas® 6800 System (nieruchomy)	05524245001 i 06379664001
cobas® 8800 System	05412722001
Moduł dostarczania próbek	06301037001

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z podręcznikiem użytkownika i/lub instrukcją obsługi systemu **cobas® 5800** lub systemów **cobas® 6800/8800**.

Uwaga: Szczegółową listę zamówień na pierwotne i wtórne próbki na próbki, statywy na próbki, statywy na niedrożne końcówki i tace na statywy do użytku z aparatami można uzyskać po skontaktowaniu się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.

Test **cobas® BKV** obsługuje próbki pierwotne do materiałów moczu **cobas® PCR Media**.

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Podobnie jak w przypadku każdej procedury testowej, dla prawidłowego przeprowadzenia badania kluczowe znaczenie ma zachowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Z uwagi na wysoką czułość niniejszego testu podczas użytkowania odczynników oraz mieszanin do amplifikacji należy zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec zanieczyszczeniu.

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Test **cobas®** BKV nie został zaprojektowany jako badanie przesiewowe na obecność wirusa BKV we krwi lub produktach krwiopochodnych.
- Ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się tak jak z materiałem zakaźnym, stosując procedury dobrej praktyki laboratoryjnej, takie jak określone w dokumentach Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories oraz CLSI Document M29-A4.^{15, 16} Procedurę tę powinien wykonywać wyłącznie personel przeszkolony w pracy z materiałami zakaźnymi oraz w stosowaniu testu **cobas®** BKV i systemu **cobas®** 5800/6800/8800.
- Wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy uważać za potencjalnie zakaźne i postępować z nimi z zastosowaniem ogólnych środków ostrożności. W przypadku rozlania materiału należy natychmiast odkazić świeżo przygotowanym 0,6% roztworem podchlorynu sodu lub potasu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej lub postępować zgodnie z procedurami przyjętymi w danym ośrodku.
- Zestaw **cobas®** EBV/BKV Control Kit zawiera osocze pochodzące z krwi ludzkiej. Materiał źródłowy przetestowano metodami PCR i wykazano w nim akceptowalne ślady niskiego poziomu DNA BKV. Żadna ze znanych metod badania nie może zaoferować całkowitej pewności, że produkty otrzymane z ludzkiej krwi nie będą przenosić czynników zakaźnych.
- **Nie zamrażać pełnej krwi ani próbek moczu przechowywanych w probówkach pierwotnych.**
- W celu zagwarantowania optymalnego działania testu należy stosować wyłącznie dostarczone lub wymienione potrzebne materiały zużywalne.
- Karty charakterystyki są dostępne na żądanie w lokalnym przedstawicielstwie firmy Roche.
- Ściśle przestrzegać podanych procedur i wytycznych w celu zapewnienia prawidłowego wykonania testu. Wszelkie odchylenia od procedur i wytycznych mogą mieć wpływ na optymalną skuteczność testu.
- Jeżeli w trakcie pracy z próbkami i ich przygotowywania nie stosuje się odpowiedniej kontroli kontaminacji pomiędzy próbkami, może dojść do uzyskania fałszywie dodatnich wyników.
- Podłoże **cobas®** PCR Media (z probówki zawierającej materiał podstawowy) zawiera chlorowodorek guanidyny. **Nie należy dopuścić do bezpośredniego kontaktu między chlorowodorkiem guanidyny i podchlorynem sodu (wybielaczem) ani innymi wysoce reaktywnymi odczynnikami, takimi jak kwasy lub zasady. Takie mieszaniny mogą wydzielać trujące gazy.** Jeśli płyn zawierający chlorowodorek guanidyny ulegnie rozlaniu, do czyszczenia należy używać odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. Jeśli rozlany płyn zawiera potencjalne czynniki zakaźne, do czyszczenia należy **NAJPIERW** użyć detergentu laboratoryjnego i wody, a następnie 0,6% roztworu podchlorynu sodu lub potasu.
- Należy poinformować lokalny właściwy organ oraz producenta o wszelkich poważnych zdarzeniach, które mogą wystąpić podczas stosowania tego testu.

Użytkowanie odczynników

- Aby uniknąć zanieczyszczenia pomiędzy próbkami lub kontrolami, ze wszystkimi odczynnikami, kontrolami i próbkami należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Przed użyciem należy ocenić wzrokowo każdą kasetę odczynnikową, rozcieńczalnik, odczynnik do lizy i odczynnik płuczający, aby upewnić się, że nie ma jakiegokolwiek wycieku. W razie wystąpienia wycieku nie wolno używać tego materiału do badania.
- **cobas® omni** Lysis Reagent zawiera izotiocyanian guanidyny, potencjalnie niebezpieczną substancję chemiczną. Nie dopuszczać do kontaktu odczynników ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody; w przeciwnym razie mogą powstać oparzenia.
- Zestawy testu **cobas® BKV**, **cobas® omni** MGP Reagent oraz **cobas® omni** Specimen Diluent zawierają azydek sodu jako substancję konserwującą. Nie dopuszczać do kontaktu odczynników ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody; w przeciwnym razie mogą powstać oparzenia. Jeżeli dojdzie do rozlania wymienionych odczynników, przed wytarciem należy rozcieńczyć je wodą.
- Nie wolno dopuszczać do kontaktu **cobas® omni** Lysis Reagent, zawierającego tiocyjanian guanidyny, z roztworem podchlorynu sodu (wybielaczem). Połączenie to może skutkować wytworzeniem silnie trującego gazu.
- Wszystkie materiały, które przypadkowo weszły w kontakt z próbkami i odczynnikami, należy utylizować zgodnie z przepisami krajowymi i lokalnymi.

Dobra praktyka laboratoryjna

- Nie należy pipetować za pomocą ust.
- Nie jeść, nie pić ani nie palić tytoniu w obszarach roboczych.
- Podczas pracy z próbkami i odczynnikami należy nosić rękawiczki laboratoryjne, fartuch oraz osłonę oczu. W celu uniknięcia zanieczyszczenia należy zmieniać rękawiczki pomiędzy czynnościami związanymi z pracą z próbkami i użytkowaniem zestawów **cobas® BKV**, kontroli nisko dodatniej EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C), kontroli wysoko dodatniej EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C), zestawów buforu z kontrolą ujemną **cobas® Buffer Negative Control Kit** i odczynników **cobas® omni**. Podczas pracy z próbkami i kontrolami należy unikać zanieczyszczenia rękawiczek.
- Po zakończeniu pracy z próbkami i zestawami odczynnikowymi oraz po zdjęciu rękawiczek należy dokładnie umyć ręce.
- Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie laboratoryjne powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,6% podchlorynu sodu lub potasu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej. Następnie przetrzeć powierzchnię 70% etanolem.
- Jeśli na powierzchni aparatów **cobas® 5800** lub **cobas® 6800/8800** dojdzie do rozlania płynu, należy postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w Asystencie użytkownika lub podręczniku użytkownika do systemów **cobas® 5800** lub **cobas® 6800/8800** w celu prawidłowego wyczyszczenia i odkażenia powierzchni urządzenia.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Uwaga: ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się jak z materiałem potencjalnie zakaźnym.

Próbki osocza krwi pobranej na EDTA

- Wszystkie próbki należy przechowywać w określonych temperaturach. Podwyższona temperatura wpływa na stabilność próbek.
- W przypadku używania próbek zamrożonych w probówkach wtórnych, należy umieścić próbki w temperaturze pokojowej (15–30°C) aż do całkowitego ich rozmrożenia, a następnie krótko wymieszać (np. na mieszadło wibracyjnym przez 3–5 sekund) i odwirować w celu zebrania się całej objętości próbki na dnie probówki.
- Krew pełną należy pobierać do probówek do otrzymywania nierozcieńczonego osocza BD Vacutainer® PPT™, przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant. Należy przestrzegać instrukcji producenta probówek do pobierania próbek. Należy zapoznać się z Ryc. 1.
- Krew pełna pobrana do probówek przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej BD Vacutainer® PPT™ lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant może być przechowywana i/lub transportowana do 24 godzin w temperaturze od 2°C do 25°C przed przygotowaniem osocza. Wirowanie powinno być przeprowadzane zgodnie z instrukcjami producenta.
- Po rozdzieleniu próbki, osocza można przechowywać przez 24 godziny w temperaturze 2–30°C w probówkach podstawowych lub wtórnych, a następnie:
 - Przechowywać w probówkach podstawowych lub wtórnych do 6 dni w temperaturze 2–8°C.
 - Przechowywać w probówkach wtórnych do 6 miesięcy w temperaturze ≤ –20°C.
- Probki osocza zachowują stabilność przez maksymalnie cztery cykle zamrażania/rozmarzania w przypadku zamrożenia w temperaturze ≤ –20°C.
- Jeśli próbki mają być przesyłane, należy je opakować i oznaczyć zgodnie z odpowiednimi krajowymi i/lub międzynarodowymi przepisami dotyczącymi transportu próbek i czynników zakaźnych.

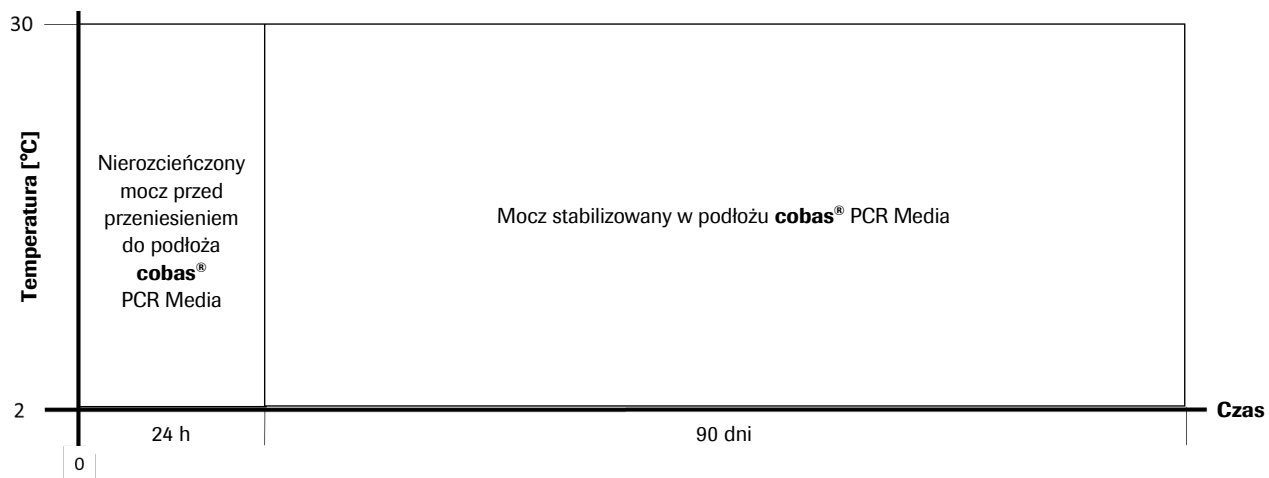
Ryc. 1 Warunki przechowywania próbek osocza z EDTA

Próbki moczu

- Do pobierania i stabilizacji próbek moczu do testu **cobas®** BKV należy używać tylko zestawu do pobierania próbek moczu **cobas®** PCR Urine Sample Kit. Test **cobas®** BKV nie został zatwierdzony do stosowania z innymi wyrobami do pobierania moczu ani typami podłoży. Używanie testu **cobas®** BKV z innymi urządzeniami do pobierania moczu lub podłożami może prowadzić do otrzymania fałszywie ujemnych, fałszywie dodatnich i (lub) nieważnych wyników.
- Próbki moczu należy natychmiast przenieść do probówek z podłożem **cobas®** PCR Media (stabilizowane). Jeżeli nie jest możliwe natychmiastowe przeniesienie próbek, można je przechowywać w temperaturze od 2°C do 30°C przez maksymalnie 24 godziny.
Po ustabilizowaniu próbek moczu w podłożu **cobas®** PCR Media, próbki można przechowywać przez okres do 90 dni w temperaturze 2–30°C. Patrz Ryc. 2.
- Menisk poziomu płynu w nieprzetestowanych próbkach moczu musi znajdować się między dwiema czarnymi liniami okienka oznakowania probówki z pożywką **cobas®** PCR Media. Jeśli poziom płynu sięga powyżej lub poniżej tych linii, oznacza to, że próbka nie została pobrana we właściwy sposób i nie może zostać użyta do oznaczenia.
- Jeśli brak dostatecznej ilości moczu (4,3 ml) do rozcieńczenia w probówce na próbkę **cobas®** PCR Urine Sample, mocz można rozcieńczyć ręcznie za pomocą podłoża **cobas®** PCR Media. Przed wykonaniem oznaczenia za pomocą testu **cobas®** BKV należy rozcieńczyć przynajmniej 0,5 ml czystego moczu podłożem **cobas®** PCR Media (w stosunku 1:1).
- Aby zapobiec krzyżowemu zanieczyszczeniu przetworzonych próbek, do ponownego zamykania próbek po ich zbadaniu należy używać dodatkowych korków dla podłoża **cobas®** PCR Media w innym kolorze (neutralnym; patrz rozdział **Wymagane materiały dodatkowe**).

- Jeśli wymagane są dodatkowe testy, należy się upewnić, że w probówce **cobas**® PCR Media pozostało przynajmniej 1,2 ml próbki.
- Jeśli próbki mają być przesyłane, należy je opakować i oznaczyć zgodnie z odpowiednimi krajowymi i/lub międzynarodowymi przepisami dotyczącymi transportu próbek i czynników zakaźnych.

Ryc. 2 Warunki przechowywania próbek moczu



Instrukcja użytkowania

Uwagi proceduralne

- Nie należy używać odczynników testu **cobas® BKV**, **cobas® EBV/BKV Control Kit**, **cobas® Buffer Negative Control Kit** i odczynników **cobas® omni** po upływie ich daty ważności.
- Nie wykorzystywać ponownie materiałów zużywalnych. Są one przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.
- Upewnić się, że etykiety z kodami kreskowymi na probówkach są widoczne przez otwory z boku statywu próbkowego RD5 lub MPA. Specyfikacje kodów kreskowych oraz dodatkowe informacje dotyczące ładowania probówek próbkowych zawiera podręcznik użytkownika systemu **cobas® 5800** lub systemów **cobas® 6800/8800**.
- Instrukcje dotyczące prawidłowej konserwacji urządzeń zawiera podręcznik użytkownika i/lub instrukcja obsługi systemu **cobas® 5800** lub systemów **cobas® 6800/8800**.

Wykonanie testu **cobas® BKV** w systemie **cobas® 5800**

Test **cobas® BKV** można wykonać przy użyciu minimalnej wymaganej objętości próbki 350 µl osocza krwi pobranej na EDTA (procedura dla próbki 200 µl) i 550 µl stabilizowanego moczu (procedura dla próbki 400 µl). Procedurę wykonywania testu opisano szczegółowo w Asystencie użytkownika lub podręczniku użytkownika do systemu **cobas® 5800**.

Ryc. 3 zawiera podsumowanie tej procedury.

- Próbkę muszą zostać otwarte i załadowane bezpośrednio na statyw w celu przetwarzania w systemie **cobas® 5800**.
- Jeden przebieg może obejmować różne materiały (osocze, stabilizowany mocz).

Próbki osocza z dodatkiem EDTA i stabilizowanego moczu należy przetwarzać z użyciem wyboru typu próbki w interfejsie użytkownika testu **cobas® BKV**, zgodnie z informacjami, które zawiera Ryc. 3, krok 2.

Ryc. 3 Procedura testu cobas® BKV w systemie cobas® 5800

1	Zaloguj się do systemu Naciśnij przycisk Start, aby przygotować system
2	Załaduj próbki do systemu: • Załaduj statywy z próbkami do systemu • System przeprowadzi automatyczne przygotowanie • Zleć testy - o Dla próbek osocza pobranego na EDTA wybierz „Plasma” - o Wybierz „Urine” w przypadku zlecenia próbek moczu pobranych na podłoże cobas® PCR Media ▪ Otwórz probówkę ▪ Przenieś probówkę bezpośrednio na statyw
3	Po poproszeniu przez system uzupełnij odczynniki i materiały zużywalne przez system: • Załaduj swoistą dla testu kasetę (kasety) na odczynniki • Załaduj mini statywy z kontrolami • Załaduj końcówki do przetwarzania • Załaduj końcówki do elucji • Załaduj płytki do przetwarzania • Załaduj płytki na odpady płynne • Załaduj płytki amplifikacyjne • Załaduj kasetę MGP • Uzupełnij rozcieńczalnik próbek • Uzupełnij odczynnik lizujący • Uzupełnij odczynnik płuczący
4	Rozpocznij przebieg przez wybranie przycisku „Start processing” (Start przetwarzania) w interfejsie użytkownika; wszystkie kolejne przebiegi rozpoczną się automatycznie, o ile nie zostaną ręcznie odłożone
5	Sprawdź i wyeksportuj wyniki
6	W razie potrzeby wyjmij i zamknij probówkę z próbkami spełniające wymogi dotyczące minimalnej objętości do użycia w przyszłości Oczyść aparat: • Wyjmij puste mini statywy z kontrolami • Wyładuj pustą swoistą dla testu kasetę (kasety) na odczynniki • Opróżnij szufladę na płytki amplifikacyjne • Usuń odpady płynne • Usuń odpady stałe

Wykonanie testu cobas® BKV w systemach cobas® 6800/8800

Test cobas® BKV można wykonać przy użyciu minimalnej wymaganej objętości próbki 350 µl osocza krwi pobranej na EDTA (procedura dla próbki 200 µl) i 550 µl stabilizowanego moczu (procedura dla próbki 400 µl). Procedurę wykonywania testu w analizatorze opisano szczegółowo w Podręczniku użytkownika i/lub instrukcji obsługi systemów cobas® 6800/8800. Na Ryc. 4 podsumowano tę procedurę.

- Próbkę muszą zostać otwarte i załadowane bezpośrednio do statywów w celu przetwarzania w systemach cobas® 6800/8800 Systems.
- Jeden przebieg może obejmować różne materiały (osocze, stabilizowany mocz).
- Próbkę osocza z dodatkiem EDTA i stabilizowanego moczu należy przetwarzać z użyciem wyboru typu próbki w interfejsie użytkownika testu cobas® BKV, zgodnie z informacjami, które zawiera Ryc. 4, krok 1.

Ryc. 4 Procedura testu cobas® BKV w systemach cobas® 6800/8800

1	Zaloguj się do systemu Naciśnij przycisk Start, aby przygotować system Zleć testy: • Dla próbek osocza pobranego na EDTA wybierz „Plasma” • Wybierz „Urine” w przypadku zlecenia próbek moczu pobranych na podłoże cobas® PCR Media
2	Po poproszeniu przez system uzupełnij odczynniki i materiały zużywalne przez system: • Załaduj swoistą dla testu kasetę na odczynniki • Załaduj kasety z kontrolami • Załaduj końcówki pipetujące • Załaduj płytki do przetwarzania • Załaduj odczynnik MGP Reagent • Załaduj płytki amplifikacyjne • Uzupełnij rozcieńczalnik próbki • Uzupełnij odczynnik lizujący • Uzupełnij odczynnik płuczący
3	Załaduj próbki do systemu: • Dla próbek moczu pobranych do podłoża cobas® PCR Media - o Otwórz probówkę - o Przenieś probówkę bezpośrednio na statyw • Załaduj statyw próbkowy i statyw na niedrożne końcówki do modułu podajnika próbek • Potwierdź, że próbki zostały przyjęte do modułu transferu
4	Rozpocznij przebieg przez wybranie przycisku Start manualnie w interfejsie użytkownika lub ustaw automatyczne rozpoczęcie przebiegu po 120 minutach bądź po zapelnieniu partii
5	Sprawdź i wyeksportuj wyniki
6	W razie potrzeby wyjmij i zamknij probówki z próbkami spełniające wymogi dotyczące minimalnej objętości do użycia w przyszłości Oczyść urządzenie: • Wyjmij puste kasety z kontrolami • Opróżnij szufladę na płytki amplifikacyjne • Usuń odpady płynne • Usuń odpady stałe

Wyniki

Systemy **cobas**® 5800/6800/8800 automatycznie określają stężenie DNA BKV w próbkach i kontrolach. Stężenie DNA BKV wyraża się w jednostkach międzynarodowych IU (International Units) na mililitr (IU/ml).

Kontrola jakości i ważność wyników w systemie **cobas**® 5800

- W każdej partii przetwarzana jest jedna ujemna kontrola [(-) Ctrl] i dwie kontrole dodatnie, kontrola nisko dodatnia [EBV/BKV L (+) C] oraz kontrola wysoko dodatnia [EBV/BKV H (+) C] są przetwarzane przynajmniej co 72 godziny i z każdą nową serią zestawu. Wykonywanie kontroli dodatnich i/lub ujemnych można zaplanować częściej, w zależności od procedury laboratorium i/lub miejscowych przepisów.
- W celu zagwarantowania ważności wyników należy sprawdzić w oprogramowaniu systemu **cobas**® 5800 i/lub w raporcie obecność flag oraz powiązane z nimi wyniki.

Wyniki są unieważniane automatycznie przez oprogramowanie **cobas**® 5800 na podstawie uzyskania niepomysłnych wyników kontroli ujemnej lub kontroli dodatniej.

UWAGA: system **cobas**® 5800 zostanie dostarczony ze standardowymi ustawieniami oznaczania zestawu kontroli (dodatnich i ujemnych) z każdym przebiegiem, ale można go skonfigurować do rzadszego wykonywania kontroli, aż do co 72 godzin, w zależności od procedur laboratorium i/lub miejscowych przepisów. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy skontaktować się z inżynierem serwisu firmy Roche i/lub pomocą techniczną firmy Roche.

Wyniki kontroli w systemie **cobas**® 5800

Wyniki kontroli przedstawia aplikacja „Controls” oprogramowania **cobas**® 5800.

- Kontrole oznaczone są „Valid” (Ważne) w kolumnie „Control result” (Wynik kontroli), jeśli wszystkie sekwencje docelowe kontroli zostały zgłoszone jako ważne. Kontrole oznaczone są „Invalid” (Nieważne) w kolumnie „Control result”, jeśli jedna lub wszystkie sekwencje docelowe kontroli zostały zgłoszone jako nieważne.
- Kontrole oznaczone jako „Invalid” w kolumnie „Flags” (Flagi) oznaczone są flagą. Więcej informacji na temat powodu zgłoszenia kontroli jako nieważnej, włącznie z informacją o fladze, dostępnych jest w widoku szczegółowym.
- Jeśli jedna z kontroli jest nieważna, należy powtórzyć oznaczenie wszystkich kontroli i powiązanych z nimi próbek.

Kontrola jakości i ważność wyników w systemach cobas® 6800/8800

- W każdej partii przetwarzana jest jedna ujemna kontrola [(-) Ctrl] i dwie kontrole dodatnie: kontrola nisko dodatnia [EBV/BKV L (+) C] oraz kontrola wysoko dodatnia [EBV/BKV H (+) C].
- W celu zagwarantowania ważności partii należy sprawdzić w oprogramowaniu cobas® 6800/8800 i/lub w raporcie obecność flag oraz powiązane z nimi wyniki.
- Partia jest ważna, jeśli nie zostaną wygenerowane flagi dla wszystkich trzech kontroli (jednej kontroli ujemnej i dwóch kontroli dodatnich): EBV/BKV L (+) C, EBV/BKV H (+) C. Wynik kontroli ujemnej jest wyświetlany jako (-) Ctrl, a kontrola nisko dodatnia i wysoko dodatnia są wyświetlane odpowiednio jako EBV/BKV L (+) C i EBV/BKV H (+) C.

Wyniki zostaną automatycznie unieważnione przez oprogramowanie cobas® 6800/8800 na podstawie uzyskania niepomysłnych wyników kontroli ujemnej i kontroli dodatnich.

Oflagowanie kontroli w systemach cobas® 6800/8800

Tabela 12 Oflagowania kontroli ujemnej i kontroli dodatnich

Kontrola ujemna	Oflagowanie	Wynik	Interpretacja
(-) Ctrl	Q02 (Nie powiodła się analiza partii kontrolnej)	Invalid	Wynik oznaczony jako nieważny lub wynik obliczonego miana kontroli ujemnej nie jest wynikiem ujemnym.
Kontrola dodatnia	Oflagowanie	Wynik	Interpretacja
EBV/BKV L (+) C	Q02 (Nie powiodła się analiza partii kontrolnej)	Invalid	Wynik oznaczony jako nieważny lub obliczone miano dla kontroli nisko dodatniej nie mieści się w określonym zakresie.
EBV/BKV H (+) C	Q02 (Nie powiodła się analiza partii kontrolnej)	Invalid	Wynik oznaczony jako nieważny lub obliczone miano dla kontroli wysoko dodatniej nie mieści się w określonym zakresie.

Jeśli partia kontroli zostanie unieważniona, należy powtórzyć badanie wszystkich próbek odnośnej partii.

Interpretacja wyników

W przypadku ważnej partii należy sprawdzić w oprogramowaniu systemu **cobas® 5800** i systemu **cobas® 6800/8800 i/lub** raportach poszczególne próbki pod kątem obecności flag. Wyniki należy interpretować w następujący sposób:

- Ważna partia może obejmować zarówno ważne, jak i nieważne wyniki próbek.

Tabela 13 Interpretacja wyników dla poszczególnych targetów

Wyniki	Interpretacja
Target Not Detected	Nie wykryto BKV DNA. Podać wynik jako „Nie wykryto BKV”.
< Titer Min ^a	Obliczone miano jest niższe od dolnej granicy oznaczalności testu (LLOQ). Podać wynik jako „Wykryto BKV, miano poniżej (miano min.)”. Osocze z EDTA, miano min. = 21,5 IU/ml Mocz, miano min. = 200 IU/ml
Miano	Obliczone miano znajduje się w zakresie liniowym testu — jest większe lub równie mianu min. oraz mniejsze lub równe mianu maks. Podać wynik jako „Wykryto (miano) BKV”.
> Titer Max ^b	Obliczone miano jest wyższe od górnej granicy oznaczalności testu (ULOQ). Podać wynik jako „Wykryto BKV, miano powyżej (miano maks.)”. Osocze z EDTA i mocz, miano maks. 1,0E+08 IU/ml

^a Wyniki próbek < Titer Min (Wykryta wartość docelowa < LLOQ) powinny być interpretowane w kontekście innych danych klinicznych i nie powinny być jedyną podstawą podejmowania decyzji o leczeniu.

^b Wynik próbki > Titer Max odnosi się do BKV dodatnich próbek z mianami powyżej górnej granicy oznaczalności testu (ULOQ). Jeśli wymagany jest wynik ilościowy dla próbek osocza krwi pobranej na EDTA, oryginalną próbkę należy rozcieńczyć BKV-ujemnym ludzkim osoczem krwi pobranej na EDTA, po czym należy powtórzyć test. Otrzymany wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

Interpretacja wyników w systemie cobas® 5800

Wyniki próbek przedstawia aplikacja „Results” oprogramowania **cobas® 5800**.

W przypadku ważnej partii kontroli należy sprawdzić w oprogramowaniu systemu **cobas® 5800 i/lub** raportach poszczególne próbki pod kątem obecności flag. Wyniki należy interpretować w następujący sposób:

- Próbki powiązane z ważną partią kontroli wyświetlane są jako „Valid” (Ważne) w kolumnie „Control result” (Wynik kontroli), jeśli wszystkie wyniki docelowe kontroli zgłaszane są jako ważne. Próbki powiązane z błędną partią kontroli wyświetlane są jako „Invalid” (Nieważne) w kolumnie „Control result”, jeśli wszystkie wyniki docelowe kontroli zgłaszane są jako nieważne.
- Jeśli powiązane kontrole wyniku próbki są nieważne, do wyniku próbki zostanie dodana określona flaga:
 - Q05D: niepowodzenie weryfikacji wyniku z powodu nieważnej kontroli dodatniej
 - Q06D: niepowodzenie weryfikacji wyniku z powodu nieważnej kontroli ujemnej
- Wartości w kolumnie „Results” (Wyniki) dla poszczególnych wyników docelowych próbek powinny być interpretowane zgodnie z tym, co przedstawia Tabela 13 powyżej.

Jeśli przynajmniej jedna wartość docelowa próbki jest oznaczona „Invalid” (Nieważny), oprogramowanie **cobas® 5800** wyświetla flagę w kolumnie „Flags” (Flagi). Więcej informacji na temat powodu zgłoszenia wartości docelowej próbki jako nieważnej, włącznie z informacją o fladze, dostępnych jest w widoku szczegółowym.

Interpretacja wyników w systemach cobas® 6800/8800

W przypadku ważnej partii należy sprawdzić w oprogramowaniu systemów **cobas®** 6800/8800 i/lub raportach poszczególne próbki pod kątem obecności flag. Wyniki należy interpretować w następujący sposób:

- Próbki są oznaczane jako „Yes” (Tak) w kolumnie „Valid” (Ważna), jeżeli wszystkie pozyskane wyniki docelowe okazały się wynikami ważnymi. Próbki oznaczone „No” (Nie) w kolumnie „Valid” (Ważna) mogą wymagać dodatkowej interpretacji i działania.
- Wartości dla poszczególnych wyników docelowych próbek powinny być interpretowane zgodnie z tym, co przedstawia Tabela 13 powyżej.

Ograniczenia metody

- Test **cobas®** BKV został oceniony jedynie pod kątem stosowania z **cobas®** EBV/BKV Control Kit, **cobas®** Buffer Negative Control Kit, **cobas®** **omni** MGP Reagent, **cobas®** **omni** Lysis Reagent, **cobas®** **omni** Specimen Diluent i **cobas®** **omni** Wash Reagent do użytku w systemach **cobas®** 5800/6800/8800.
- Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od prawidłowych procedur pobierania, przechowywania i dalszego postępowania z próbkami.
- Ten test został zatwierdzony wyłącznie do badania osocza krwi pobranej na EDTA i stabilizowanego moczu. Badanie innych rodzajów próbek przy użyciu testu **cobas®** BKV może dawać nieprawidłowe wyniki. Pomiarów poziomu DNA w osoczu i stabilizowanym moczu nie można bezpośrednio porównać ze sobą ani z poziomem w innych typach próbek.
- Na oznaczenie ilościowe DNA wirusa BKV wpływ mogą mieć: metoda pobrania próbki, czynniki zależne od pacjenta (tj. wiek, obecność objawów) i (lub) stadium zakażenia.
- Degradacja DNA BKV w nierozcieńczonym moczu może wpłynąć na oznaczanie ilościowe¹⁷. Do osiągnięcia stabilności materiału wymagane jest przeniesienie moczu do podłoża **cobas®** PCR Media.
- Zmienność ilościową stężenia DNA BKV charakterystyczną dla moczu zaobserwowano w doświadczeniach oceniających stabilność próbki w różnych punktach czasowych wykonania pomiaru (nierozcieńczony mocz) lub różnych porcjach tej samej próbki (nierozcieńczony mocz i mocz stabilizowany w podłożu **cobas®** PCR Media).
- Ze względu na te ograniczenia wyniki oznaczania DNA BKV w moczu należy interpretować z zachowaniem ostrożności w kontekście wyników klinicznych i innych wyników laboratoryjnych i nie mogą one być jedyną podstawą podejmowania decyzji dotyczących leczenia.
- Mocz może zawierać duże ilości DNA BKV, co stwarza ryzyko przeniesienia zanieczyszczenia.¹⁸
- Podobnie jak w przypadku każdego testu molekularnego, mutacje w obrębie regionów docelowych testu **cobas®** BKV mogą wpływać na wiązanie startera i/lub sondy oraz spowodować zaniżenie miana lub niewykrycie wirusa.
- Z uwagi na różnice pomiędzy metodami zaleca się, aby przed zmianą użytkownik przeprowadził w laboratorium badania korelacji stosowanych metod w celu określenia występujących pomiędzy nimi różnic jakościowych. Użytkownicy powinni postępować zgodnie z własnymi określonymi zasadami/procedurami.
- Test **cobas®** BKV nie jest przeznaczony do wykorzystania jako badanie przesiewowe na obecność wirusa BKV we krwi lub produktach krwiopochodnych.

Niekliniczna ocena wiarygodności

Kluczowe parametry wiarygodności testu – próbki osocza krwi pobranej na EDTA oznaczane w systemach cobas® 6800/8800

Granica wykrywalności (LoD) międzynarodowego standardu WHO

Granice wykrywalności testu cobas® BKV dla międzynarodowego standardu WHO określono dzięki analizie seryjnych rozcieńczeń 1. międzynarodowego standardu WHO dla BKV uzyskanego z NIBSC (NIBSC 14/212), w ludzkim osoczu z krwi pobranej na EDTA ujemnym pod względem BKV. Panel składający się z sześciu poziomów stężeń i kontroli ślepej był testowany na trzech seriach odczynników cobas® BKV, wielu przebiegach, dniach, operatorach i aparatach.

Wyniki dla osocza z krwi pobranej na EDTA przedstawia Tabela 14 do Tabela 16. Badanie wykazało, że dla najmniej czulej serii stężenie, dla którego oczekuje się 95% trafności w analizie PROBIT wynosi 21,5 IU/ml przy 95% przedziale ufności 16,3–32,4 IU/ml w osoczu z krwi pobranej na EDTA. Najniższe stężenie z odsetkiem trafności $\geq 95\%$ wynosi 19,0 IU/ml w osoczu z krwi pobranej na EDTA.

Tabela 14 Granica wykrywalności w osoczu z krwi pobranej na EDTA, seria 1

Stężenie wejściowe (DNA BKV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	46	73,0
4,75	63	36	57,1
2,38	63	23	36,5
0	62	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	21,5 IU/ml 95% przedział ufności: 16,3–32,4 IU/ml		

Tabela 15 Granica wykrywalności w osoczu z krwi pobranej na EDTA, seria 2

Stężenie wejściowe (DNA BKV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
80,0	62	62	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	61	96,8
9,5	63	48	76,2
4,75	63	34	54,0
2,38	62	23	37,1
0	62	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	19,7 IU/ml 95% przedział ufności: 15,0–29,2 IU/ml		

Tabela 16 Granica wykrywalności w osoczu z krwi pobranej na EDTA, seria 3

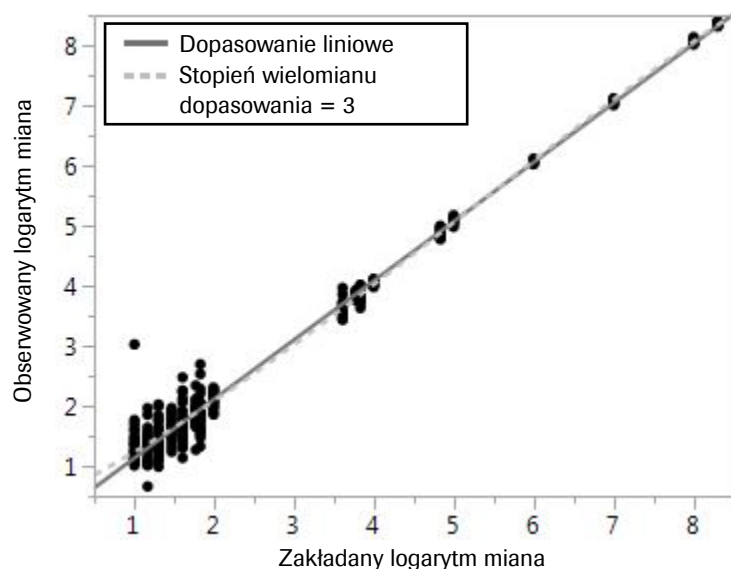
Stężenie wejściowe (DNA BKV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	50	79,4
4,75	63	35	55,6
2,38	63	22	35,0
0	63	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	19,3 IU/ml 95% przedział ufności: 14,8–28,5 IU/ml		

Zakres liniowości

Liniowość testu **cobas® BKV** oceniono, wykorzystując rozcieńczenia seryjne zawierające 18 elementów panelu z DNA podgrupy Ib BKV pokrywającymi zakres liniowy testu. Użyto wyższego miana podstawowego DNA lambda do przygotowania 11 elementów panelu obejmującego cały zakres liniowości. Użyto próbki klinicznej do przygotowania siedmiu elementów panelu obejmującego pośredni i niższy poziom zakresu liniowości.

Wszystkie elementy panelu testowano w 36 powtórzeniach w obrębie trzech serii odczynników testu **cobas® BKV**, a wyniki badania przedstawia na Ryc. 5.

Wykazano, że test **cobas® BKV** jest liniowy w zakresie od $1,01E+01$ do $1,97E+08$ IU/ml i wykazuje bezwzględne odchylenie od bardziej dopasowanej regresji nieliniowej wynoszące najwyżej $\pm 0,1 \log_{10}$ w ludzkim osoczu z krwi pobranej na EDTA (patrz Ryc. 5). W zakresie liniowym dokładność testu mieściła się w granicach $\pm 0,2 \log_{10}$.

Ryc. 5 Określanie zakresu liniowego w osoczu z EDTA

Precyzja wewnątrz laboratorium

Precyzję testu **cobas®** BKV określono dzięki analizie rozcieńczeń seryjnych wysokiego miana DNA BKV (podgrupa 1b) w osoczu z krwi pobranej na EDTA ujemnym dla BKV. Pięć poziomów rozcieńczeń zbadano w 72 powtórzeniach dla każdego poziomu w trzech seriach odczynników testu **cobas®** BKV przy użyciu czterech urządzeń oraz dwóch użytkowników przez 12 dni. Każda próbka przechodziła całą procedurę testu **cobas®** BKV na w pełni zautomatyzowanych **cobas®** 6800/8800 Systems. Dlatego podana precyzja odzwierciedla wszystkie aspekty procedury badawczej. Wyniki przedstawia Tabela 17.

Test **cobas®** BKV wykazywał wysoką precyzję dla trzech serii odczynników badanych w zakresie stężeń od 9,83E+01 IU/ml do 9,83E+05 IU/ml.

Tabela 17 Precyzja wewnątrzlaboratoryjna testu **cobas®** BKV*

Stężenie nominalne [IU/ml]	Stężenie zakładane [IU/ml]	Osocze krwi pobranej na EDTA			
		Seria nr 1	Seria nr 2	Seria nr 3	Wszystkie partie
		OS	OS	OS	OS pulowane
1,00E+06	9,83E+05	0,02	0,02	0,04	0,03
1,00E+05	9,83E+04	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+04	9,83E+03	0,04	0,05	0,03	0,04
6,00E+03	5,90E+03	0,03	0,05	0,03	0,04
1,00E+02	9,83E+01	0,09	0,11	0,11	0,11

* Uważa się, iż wartości miana mają charakter rozkładu logarytmiczno-normalnego i są analizowane po zamianie na $\log_{10}$. Kolumny odchylenia standardowego (OS) przedstawiają całkowite przekształcone logarytmicznie miano dla każdej z trzech serii odczynników.

Weryfikacja podtypu

Wiarygodność testu **cobas®** BKV dla podtypów i BKV (z podgrupami Ia i Ic), II, III i IV oceniono metodą:

- Weryfikacji granicy wykrywalności
- Weryfikacji zakresu liniowości

Weryfikacja granicy wykrywalności dla podtypów I (z podgrupami Ia i Ic), II, III i IV

DNA BKV dla pięciu podtypów/podgrup (Ia, Ic, II, III i IV) rozcieńczono do trzech poziomów stężeń w ujemnym względem BKV osoczu z krwi pobranej na EDTA. Określenie odsetka trafności przeprowadzono w 63 powtórzeniach dla każdego poziomu. Badania przeprowadzono z użyciem trzech serii odczynników **cobas®** BKV, w kilku przebiegach, przez kilka dni, w wykonaniu różnych użytkowników i z użyciem różnych analizatorów. Wyniki te dowodzą, że test **cobas®** BKV wykrył DNA BKV pięciu różnych podtypów/podgrup przy stężeniach 21,5 IU/ml z odsetkiem trafień wynoszącym $\geq 95\%$.

Weryfikacja zakresu liniowości dla podtypów I (z podgrupami Ia i Ic), II, III i IV

Szereg rozcieńczeń stosowany podczas weryfikacji badania liniowości podtypu/podgrupy testu **cobas®** BKV zawierał osiem elementów panelu rozciągającego się na zakres liniowości oznaczenia. Badanie przeprowadzono z trzema partiami odczynnika **cobas®** BKV; zbadano 12 powtórzeń na poziom w osoczu krwi pobranej na EDTA.

Zakres liniowy testu **cobas®** BKV zweryfikowano dla wszystkich pięciu podtypów/podgrup (Ia, Ic, II, III i IV).

Swoistość

Swoistość testu **cobas®** BKV określono na podstawie analizy próbek BKV-ujemnego osocza z krwi pobranej na EDTA od indywidualnych dawców. 104 pojedyncze próbki osocza z krwi pobranej na EDTA zbadano przy użyciu trzech serii odczynników testu **cobas®** BKV. Wszystkie badane próbki były ujemne pod względem DNA BKV. W panelu testu swoistość testu **cobas®** BKV wynosiła 100% (dolny jednostronny 95% przedział ufności: 97,16%).

Swoistość analityczna

Swoistość analityczną testu **cobas®** BKV oceniono testując panel drobnoustrojów w stężeniu $1,00E+06$ jednostek/ml (CFU/ml, komórek/ml, CCU/ml, IFU/ml) dla bakterii i drożdży oraz od $1,00E+05$ jednostek/ml do $1,00E+06$ jednostek/ml (kopii/ml, TCID₅₀/ml, IU/ml, komórek/ml) dla wirusów. Drobnoustroje rozcieńczono w ludzkim osoczu krwi pobranej na EDTA ujemnej dla DNA BKV oraz w ludzkim osoczu krwi pobranej na EDTA zawierającej 100 IU/ml DNA BKV. Dwa swoiste badane organizmy podano w Tabeli 18. Każdą próbkę badano w trzech powtórzeniach. Żaden z patogenów innych niż BKV nie zakłócał wiarygodności testu w badanych stężeniach. W teście **cobas®** BKV wyniki ujemne uzyskano dla wszystkich próbek z drobnoustrojami bez sekwencji docelowej BKV, a wyniki dodatnie uzyskano dla wszystkich próbek z drobnoustrojami z docelową sekwencją BKV. Ponadto średni log₁₀ miana każdej próbki dodatniej pod względem BKV zawierającej potencjalnie reagujący krzyżowo drobnoustrój mieścił się w granicach $\pm 0,5$ log₁₀ średniego log₁₀ miana odpowiedniej dodanej dodatniej kontroli.

Tabela 18 Drobnoustroje badane pod kątem reaktywności krzyżowej

Wirusy	Bakterie	Drożdżaki
Adenowirus typu 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Wirus cytomegalii	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Wirus Epsteina-Barra	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Wirus zapalenia wątroby typu B	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Wirus zapalenia wątroby typu C	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
Wirus opryszczki pospolitej typu 1	<i>Escherichia coli</i>	-
Wirus opryszczki pospolitej typu 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Ludzki wirus opryszczki typu 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Ludzki wirus opryszczki typu 7	<i>Mycobacterium avium</i>	-
Ludzki wirus opryszczki typu 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
Ludzki wirus upośledzenia odporności 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Ludzki wirus upośledzenia odporności 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Wirus brodawczaka ludzkiego	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Wirus JC	<i>Salmonella enterica</i>	-
Parwovirus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Simian Virus 40	-	-
Wirus ospy wietrznej	-	-

Swoistość analityczna – substancje interferujące

Podwyższone poziomy trójglicerydów (33 g/l), bilirubiny związanej (0,2 g/l), bilirubiny niezwiązanej (0,2 g/l), albuminy (60 g/l), hemoglobiny (2 g/l) i ludzkiego DNA (2 mg/l) w próbkach badano z (100 IU/ml) i bez DNA BKV. Wykazano, że testowane interferencje endogenne nie zakłócały działania testu **cobas® BKV**.

Dodatkowo składniki leków wymienione w Tabela 19 badano trzykrotnym $C_{\max}$ z i bez DNA BKV.

Żadna z potencjalnie interferujących substancji nie wykazywała interferencji z testem. W teście **cobas® BKV** wyniki ujemne uzyskano dla wszystkich próbek bez docelowego BKV, a wyniki dodatnie uzyskano dla wszystkich próbek z docelowym BKV. Ponadto średni $\log_{10}$ miana każdej próbki dodatniej pod względem BKV zawierającej potencjalnie interferujące substancje mieścił się w granicach $\pm 0,5 \log_{10}$ średniego $\log_{10}$ miana odpowiedniej dodanej dodatniej kontroli.

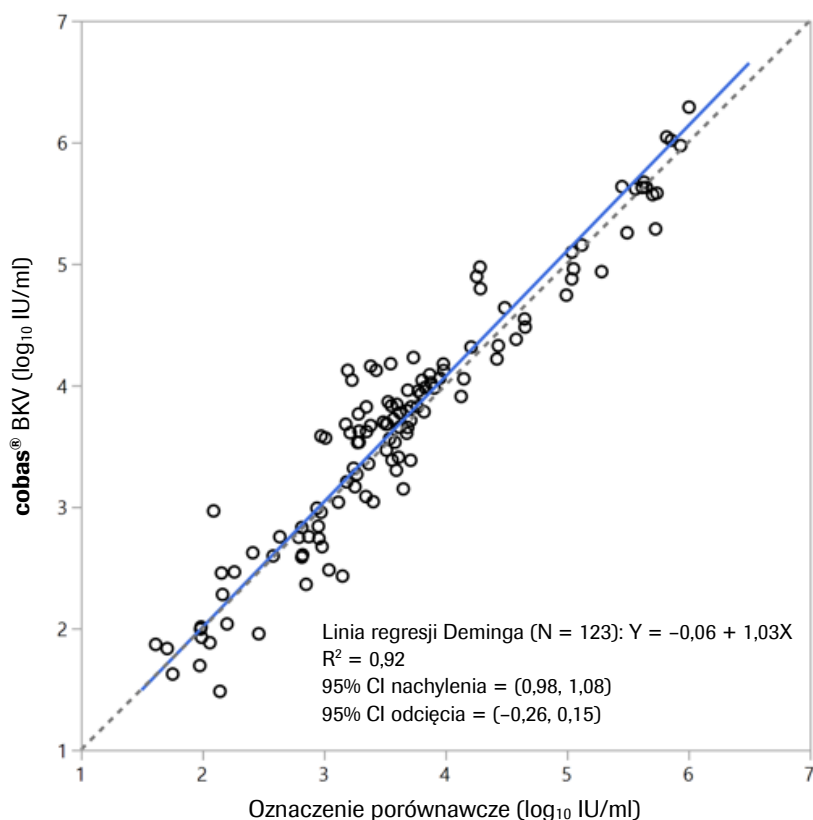
Tabela 19 Składniki leków badane pod kątem interferencji z ilościowym oznaczeniem DNA BKV w teście **cobas® BKV**

Klasa leku	Nazwa własna leku	
Przeciwdrobnoustrojowy	Cefotetan	Sulfametoksazol
	Klawulanian potasu	Tikarcylina disodowa
	Flukonazol	Trimetoprim
	Piperacylina	Wankomycyna
	Tazobaktam sodu	Mykafungina
Preparaty do leczenia zakażeń wirusami opryszczki (Herpes)	Gancyklowir	Cidofowir
	Valgancyklowir	Foskarnet
	Acyklowir	Letermowir
Lek immunosupresyjny	Azatiopryna	Prednizon
	Cyklosporyna	Sirolimus
	Ewerolimus	Takrolimus
	Mykofenolan mofetylu	Kwas mykofenolowy

Korelacja metody

Wiarygodność testu **cobas® BKV** oceniono w odniesieniu do oznaczenia porównawczego przez analizę próbek osocza z krwi pobranej na EDTA od pacjentów zakażonych wirusem BKV. Próbkę osocza z krwi pobranej na EDTA w zakresie oznaczenia obu testów zbadano w pojedynczych powtórzeniach. Przeprowadzono analizę regresji Deminga.

Rys. 6 zawiera wyniki regresji Deminga.

Rys. 6 Analiza regresji testu **cobas®** BKV w odniesieniu do oznaczenia porównawczego

Błąd całego systemu

Współczynnik błędu całego systemu dla testu **cobas®** BKV określono badając 100 powtórzeń osocza z krwi pobranej na EDTA z dodaną BKV-dodatnią próbką kliniczną. Probki te były testowane przy stężeniu wynoszącym $3 \times \text{LoD}$.

Wyniki tego badania wykazały, że we wszystkich powtórzeniach stwierdzono ważność i reaktywność względem sekwencji docelowej BKV, co dało częstość występowania błędu systemowego na poziomie 0% (górny jednostronny 95% przedział ufności wynoszący 2,95%).

Kontaminacja między próbkami

Częstość występowania kontaminacji pomiędzy próbkami w teście **cobas®** BKV określono przez oznaczenie 240 powtórzeń próbek osocza ujemnego dla BKV i 225 powtórzeń próbek wysokiego miana DNA BKV na poziomie około $2,00\text{E}+07$ IU/ml. Łącznie wykonano pięć przebiegów z użyciem próbek dodatnich i ujemnych w układzie naprzemiennym.

Wszystkie 240 powtórzenia ujemnej próbki były ważne i dały wynik ujemny, dając współczynnik zanieczyszczenia krzyżowego wynoszący 0% (górny jednostronny 95% przedział ufności wynoszący 1,24%).

Kluczowe parametry wiarygodności testu – próbki moczu oznaczane w systemach cobas® 6800/8800

Granica wykrywalności (LoD) międzynarodowego standardu WHO

Granice wykrywalności testu cobas® BKV dla międzynarodowego standardu WHO określono dzięki analizie seryjnych rozcieńczeń 1. międzynarodowego standardu WHO dla BKV uzyskanego z NIBSC (NIBSC 14/212), w puli moczu stabilizowanego w podłożu cobas® PCR Media ujemnego pod względem BKV. Panel składający się z sześciu poziomów stężeń i kontroli ślepej był testowany na trzech seriach odczytników cobas® BKV, wielu przebiegach, dniach, operatorach i aparatach.

Wyniki dla moczu stabilizowanego w podłożu cobas® PCR Media przedstawia Tabela 20 do Tabela 22. Badanie wykazało, że dla najmniej czułej serii stężenie, dla którego oczekuje się 95% trafności w analizie PROBIT wynosi 12,2 IU/ml przy 95% przedziale ufności 9,2–18,3 IU/ml w nierozcieńczonym moczu. Najniższe stężenie z odsetkiem trafności $\geq 95\%$ wynosi 10,0 IU/ml w nierozcieńczonym moczu.

Tabela 20 Granica wykrywalności w moczu, seria 1

Stężenie wejściowe (DNA BKV IU/ml)*	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	47	74,6
2,5	63	25	39,7
1,25	63	26	41,3
0	63	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	12,2 IU/ml 95% przedział ufności: 9,2–18,3 IU/ml		

* Testowane próbki moczu stabilizowanego w podłożu cobas® PCR Media. Stężenie miana początkowego użyte do obliczeń na podstawie nierozcieńczonego moczu.

Tabela 21 Granica wykrywalności w moczu, seria 2

Stężenie wejściowe (DNA BKV IU/ml)*	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	42	66,7
2,5	63	32	50,8
1,25	63	17	27,0
0	63	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	11,9 IU/ml 95% przedział ufności: 9,2–17,3 IU/ml		

* Testowane próbki moczu stabilizowanego w podłożu **cobas®** PCR Media. Stężenie miana początkowego użyte do obliczeń na podstawie nierozcieńczonego moczu.

Tabela 22 Granica wykrywalności w moczu, seria 3

Stężenie wejściowe (DNA BKV IU/ml)*	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	61	96,8
5,0	63	46	73,0
2,5	63	39	61,9
1,25	63	19	30,2
0	63	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	10,1 IU/ml 95% przedział ufności: 7,8–14,7 IU/ml		

* Testowane próbki moczu stabilizowanego w podłożu **cobas®** PCR Media. Stężenie miana początkowego użyte do obliczeń na podstawie nierozcieńczonego moczu.

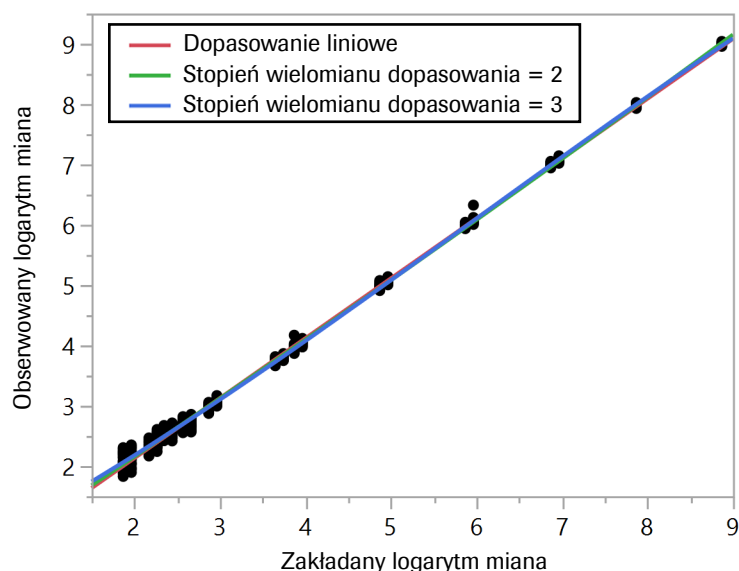
Zakres liniowości

Liniowość testu **cobas®** BKV oceniono wykorzystując rozcieńczenia seryjne zawierające 10 elementów panelu z użyciem próbki klinicznej (BKV podgrupa Ib) pokrywających zakres liniowy testu. Użyto wyższego miana podstawowego DNA lambda do przygotowania 12 elementów panelu obejmującego cały zakres liniowości.

Wszystkie elementy panelu testowano w 36 powtórzeniach w obrębie trzech serii odczynników testu **cobas®** BKV, a wyniki badania przedstawia na Ryc. 7.

Wykazano, że test **cobas®** BKV jest liniowy w zakresie od 7,41E+01 IU/ml do 7,41E+08 IU/ml i wykazuje bezwzględne odchylenie od bardziej dopasowanej regresji nieliniowej wynoszące najwyżej $\pm 0,1 \log_{10}$ w puli moczu stabilizowanego w podłożu **cobas®** PCR Media (patrz Ryc. 7). W zakresie liniowym dokładność testu mieściła się w granicach $\pm 0,2 \log_{10}$.

09478124001-03PL

Ryc. 7 Określanie zakresu liniowego w moczu

Precyzja wewnątrz laboratorium

Precyzję testu **cobas®** BKV określono dzięki analizie rozcieńczeń seryjnych wysokiego miana DNA BKV (podgrupa Ib) w moczu stabilizowanym w podłożu **cobas®** PCR Media ujemnym dla BKV. Pięć poziomów rozcieńczeń zbadano w 72 powtórzeniach dla każdego poziomu w trzech seriach odczynników testu **cobas®** BKV przy użyciu dwóch urządzeń oraz dwóch użytkowników przez 12 dni. Każda próbka przechodziła całą procedurę testu **cobas®** BKV na w pełni zautomatyzowanych **cobas®** 6800/8800 Systems. Dlatego podana precyzja odzwierciedla wszystkie aspekty procedury badawczej. Wyniki przedstawia Tabela 23.

Test **cobas®** BKV wykazywał wysoką precyzję dla trzech serii odczynników badanych w zakresie stężeń od 7,41E+02 IU/ml do 7,41E+05 IU/ml.

Tabela 23 Precyzja wewnątrzlaboratoryjna testu **cobas®** BKV*

Stężenie nominalne [IU/ml]	Stężenie zakładane [IU/ml]	Mocz stabilizowany w podłożu cobas® PCR Media			
		Seria nr 1	Seria nr 2	Seria nr 3	Wszystkie partie
		OS	OS	OS	OS pulowane
1,00E+06	7,41E+05	0,02	0,02	0,02	0,02
1,00E+05	7,41E+04	0,02	0,03	0,02	0,03
1,00E+04	7,41E+03	0,03	0,03	0,03	0,03
6,00E+03	4,44E+03	0,04	0,03	0,04	0,03
1,00E+03	7,41E+02	0,05	0,05	0,04	0,05

* Uważa się, iż wartości miana mają charakter rozkładu logarytmiczno-normalnego i są analizowane po zamianie na $\log_{10}$. Kolumny odchylenia standardowego (OS) przedstawiają całkowite przekształcone logarytmicznie miano dla każdej z trzech serii odczynników.

Weryfikacja podtypu

Wiarygodność testu **cobas**® BKV dla podtypów i BKV (z podgrupami Ia i Ic), II, III i IV oceniono metodą:

- Weryfikacji granicy wykrywalności
- Weryfikacji zakresu liniowości

Weryfikacja granicy wykrywalności dla podtypów I (z podgrupami Ia i Ic), II, III i IV

DNA BKV dla pięciu podtypów/podgrup (Ia, Ic, II, III i IV) rozcieńczono do trzech poziomów stężeń w ujemnej względem BKV puli moczu stabilizowanego w podłożu **cobas**® PCR Media. Określenie odsetka trafności przeprowadzono w 63 powtórzeniach dla każdego poziomu. Badania przeprowadzono z użyciem trzech serii odczynników **cobas**® BKV, w kilku przebiegach, przez kilka dni, w wykonaniu różnych użytkowników i z użyciem różnych analizatorów. Wyniki te dowodzą, że test **cobas**® BKV wykrył DNA BKV pięciu różnych podtypów/podgrup przy stężeniach 12,2 IU/ml z odsetkiem trafień wynoszącym $\geq 95\%$.

Weryfikacja zakresu liniowości dla podtypów I (z podgrupami Ia i Ic), II, III i IV

Szereg rozcieńczeń stosowany podczas weryfikacji badania liniowości podtypu/podgrupy testu **cobas**® BKV zawierał osiem elementów panelu rozciągającego się na zakres liniowości oznaczenia. Badanie przeprowadzono z trzema seriami odczynnika **cobas**® BKV; zbadano 12 powtórzeń na poziom w moczu stabilizowanym w podłożu **cobas**® PCR Media.

Zakres liniowy testu **cobas**® BKV zweryfikowano dla wszystkich pięciu podtypów/podgrup (Ia, Ic, II, III i IV).

Swoistość

Swoistość testu **cobas**® BKV określono na podstawie analizy próbek ujemnego dla BKV moczu stabilizowanego w podłożu **cobas**® PCR Media od indywidualnych dawców. Sto pojedynczych próbek moczu zbadano przy użyciu trzech serii odczynników testu **cobas**® BKV. Wszystkie badane próbki były ujemne pod względem DNA BKV. W panelu testu swoistość testu **cobas**® BKV wynosiła 100% (dolny jednostronny 95% przedział ufności: 97,05%).

Swoistość analityczna

Swoistość analityczną testu **cobas**® BKV oceniono testując panel drobnoustrojów w stężeniu od 1,00E+06 jednostek/ml do 2,00E+06 jednostek/ml (CFU/ml, komórek/ml, CCU/ml, IFU/ml) dla bakterii i drożdży oraz 1,00E+05 jednostek/ml (kopii/ml, TCID₅₀/ml, IU/ml, komórek/ml) dla wirusów. Drobnoustroje rozcieńczono w moczu ujemnym dla DNA BKV oraz w moczu zawierającym 600 IU/ml DNA BKV. Dwa swoiste badane organizmy podano w Tabeli 24. Każdą próbkę badano w trzech powtórzeniach. Żaden z patogenów innych niż BKV nie zakłócał wiarygodności testu w badanych stężeniach. W teście **cobas**® BKV wyniki ujemne uzyskano dla wszystkich próbek z drobnoustrojami bez sekwencji docelowej BKV, a wyniki dodatnie uzyskano dla wszystkich próbek z drobnoustrojami z docelową sekwencją BKV. Ponadto średni log₁₀ miana każdej próbki dodatniej pod względem BKV zawierającej potencjalnie reagujący krzyżowo drobnoustrój mieścił się w granicach $\pm 0,5$ log₁₀ średniego log₁₀ miana odpowiedniej dodanej dodatniej kontroli.

Tabela 24 Drobnoustroje badane pod kątem reaktywności krzyżowej

Wirusy	Bakterie	Bakterie	Drożdżaki
Wirus opryszczki typu 2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
Wirus brodawczaka ludzkiego 16	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida glabrata</i>
-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	-
-	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
-	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus oralis/viridans</i>	-
-	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	-
-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
-	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-
-	<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-
-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-
-	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus jensenii</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	-	-
-	<i>Morganella morganii</i>	-	-

Swoistość analityczna – substancje interferujące

Zbadano podwyższony poziom albuminy (0,5% wagowo-obj.), bilirubiny związanej (1% wagowo-obj.), glukozy (1% wagowo-obj.), komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (1,00E+06 komórek/ml), śluzu (w obecności 1 wymazówki ze śluzem na 4,3 ml próbki), kwaśnego pH (pH 4), zasadowego pH (pH 9), nasienia (1 wymazówka zanurzona w nasieniu na 4,3 ml próbki), sodu (300 mEq/l) i pełnej krwi (10% obj.) w obecności (600 IU/ml) i przy braku DNA BKV. Wykazano, że testowane interferencje endogenne nie zakłócały działania testu **cobas®** BKV.

Dodatkowo zbadano składniki leków wymienione w Tabeli 25 w obecności i pod nieobecność DNA BKV.

Za wyjątkiem sproszkowanego talku, żadna z potencjalnie interferujących substancji nie wykazywała interferencji z testem. Sproszkowany talk w stężeniu $\leq 0,05\%$ nie wykazywał interferencji z testem **cobas®** BKV. W teście **cobas®** BKV wyniki ujemne uzyskano dla wszystkich próbek bez docelowego BKV, a wyniki dodatnie uzyskano dla wszystkich próbek z docelowym BKV. Ponadto średni $\log_{10}$ miana każdej próbki dodatniej pod względem BKV zawierającej potencjalnie interferujące substancje mieścił się w granicach $\pm 0,5 \log_{10}$ średniego $\log_{10}$ miana odpowiedniej dodanej dodatniej kontroli.

Tabela 25 Składniki leków badane pod kątem interferencji z ilościowym oznaczeniem DNA BKV w teście cobas® BKV

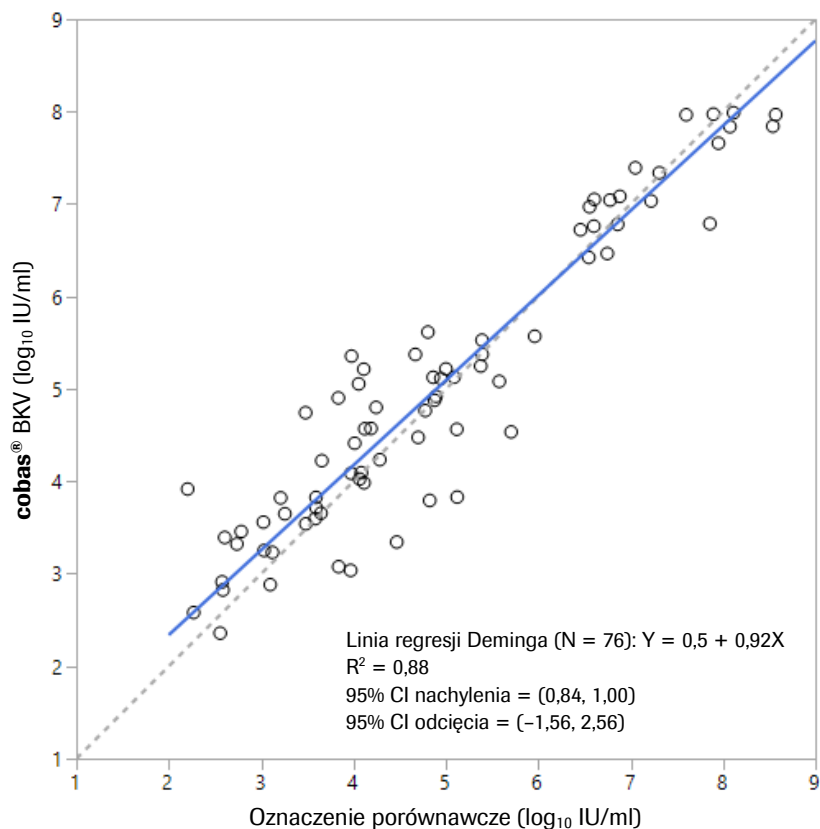
Klasa leku	Substancja czynna	Stężenie	Nazwa własna leku
Przeciwdrobnoustrojowy	Klotrimazol	100 µg/ml	Krem dopochwowy Gyne-Lotrimin 7
	Metronidazol	701 µmol/l	Arilin rapid Czopki dopochwowe Vagi Metro Cream Nidazea Gel
Estrogen, hormon steroidowy	Estradiol	4,41 nmol/l	Krem dopochwowy z estradiolem Estrace
Środki przeciwbólowe	Chlorowodorek fenazopirydyny	200 µg/ml	Azo Standard
	Paracetamol	1324 µmol/l	Paracetamol
Preparaty nawilżające	Glikol propylenowy	1000 µg/ml	K-Y UltraGel
Niesterydowe leki przeciwzapalne	Kwas acetylosalicylowy	3,62 mmol/l	Kwas acetylosalicylowy
	Naproksen	2170 µmol/l	Naproksen
	Ibuprofen	2425 µmol/l	Ibuprofen
Nie dotyczy	Talk	0,05% (wag./obj.)	Talk sproszkowany

Korelacja metody

Wiarygodność testu **cobas®** BKV oceniono w odniesieniu do oznaczenia porównawczego przez analizę próbek moczu od pacjentów zakażonych wirusem BKV. Próbki moczu w zakresie oznaczenia obu testów zbadano w pojedynczych powtórzeniach. Przeprowadzono analizę regresji Deminga.

Rys. 8 zawiera wyniki regresji Deminga.

Rys. 8 Analiza regresji testu **cobas®** BKV w odniesieniu do oznaczenia porównawczego



Kontaminacja między próbkami

Częstość występowania kontaminacji pomiędzy próbkami w teście **cobas®** BKV określono przez oznaczenie 240 powtórzeń próbek osocza ujemnego dla BKV i 225 powtórzeń próbek wysokiego miana DNA BKV na poziomie około $1,00E+09$ IU/ml. Łącznie wykonano pięć przebiegów z użyciem próbek dodatnich i ujemnych w układzie naprzemiennym.

Wszystkie 240 powtórzenia ujemnej próbki były ważne i dały wynik ujemny, dając współczynnik zanieczyszczenia krzyżowego wynoszący 0,0% (górny jednostronny 95% przedział ufności wynoszący 1,24%).

Ocena skuteczności w badaniach klinicznych przeprowadzona w systemach cobas® 6800/8800

Powtarzalność testu cobas® BKV – próbki osocza krwi pobranej na EDTA

Powtarzalność testu cobas® BKV oceniano w odniesieniu do wielu czynników, takich jak seria odczynników, ośrodki badawczy, partia i dni, w których przeprowadzono test, które mogą wpływać na zgłaszane wyniki rutynowych testów klinicznych. Ocena została przeprowadzona w 3 ośrodkach badawczych przy użyciu 3 serii odczynników oraz panelu próbek dodatnich i ujemnych, co dało łącznie 270 testów na stężenie (nie uwzględniając kontroli). Panele zostały przygotowane z osocza krwi pobranej na EDTA, które było ujemne w kierunku przeciwciał VAC IgG przeciwko wirusowi BKV. Zostały również przebadane pod kątem wirusa BKV zgodnie z protokołem przeprowadzania testu NAT na osoczu. Ponadto do paneli dodano międzynarodowy standard WHO BKV lub DNA pochodzącego z hodowli wirusa BKV o genotypie Ib (najbardziej powszechnym). We wszystkich ośrodkach dwóch operatorów testowało każdą serię odczynników przez 5 dni. Każdego dnia wykonywano dwa przebiegi (1 przebieg = 1 partia; 1 partia = 1 panel + 3 kontrole), a podczas każdego przebiegu analizowano 3 powtórzenia każdego elementu panelu. Zestawienie wyników oceny, patrz Tabela 26.

Tabela 26 Możliwe do przypisania procentowe udziały zmienności całkowitej (%TV), odchylenia standardowego precyzji całkowitej (OS), i logarytmiczno-normalnego CV (%) stężenia DNA BKV ($\log_{10}$ IU/ml) wg. dodatnich elementów panelu

Oczekiwane stężenie DNA BKV ($\log_{10}$ IU/ml)	Obserwowane średnie ^a stężenie DNA wirusa BKV ($\log_{10}$ IU/ml)	Liczba testów ^b	Seria %TV ^c (CV%) ^d	Ośrodek %TV ^c (CV%) ^d	Dzień/operator %TV ^c (CV%) ^d	Partia %TV ^c (CV%) ^d	W ramach partii %TV ^c (CV%) ^d	Precyzja całkowita OS ^e	Współczynnik zmienności (%) ^d rozkładu logarytmiczno-normalnego precyzji całkowitej
1,81	1,74	270	9% (20,63)	6% (17,69)	0% (0,00)	7% (19,15)	78% (68,05)	0,304	79,43
3,70	3,52	270	10% (9,79)	10% (9,57)	14% (11,44)	25% (15,16)	40% (19,38)	0,131	30,91
4,70	4,51	270	3% (4,42)	24% (13,46)	0% (0,00)	56% (20,58)	17% (11,27)	0,118	27,71
5,70	5,54	270	7% (5,66)	28% (11,50)	0% (0,00)	40% (13,85)	25% (10,84)	0,094	21,94
7,70	7,62	269	4% (3,27)	49% (11,00)	0% (0,00)	13% (5,60)	34% (9,10)	0,068	15,74

^a Obliczono z użyciem procedury SAS MIXED.

^b Liczba ważnych testów z wykrywalnym poziomem DNA.

^c %TV = procentowy udział w zmienności całkowitej.

^d CV% = logarytmiczno-normalny procentowy współczynnik zmienności = $\sqrt{10^{[OS^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Obliczono z użyciem całkowitej zmienności procedury SAS MIXED.

Uwaga: Tabela obejmuje wyłącznie wyniki z wykrywalnym poziomem DNA. OS = odchylenie standardowe. CV = współczynnik zmienności; BKV = wirus BK.

Test **cobas® BKV** wykazał akceptowalną powtarzalność kliniczną przy stężeniach w obrębie zakresu liniowego. Ponadto system wykrył 100% z 3 próbek z LLoQ. Systemy **cobas® 6800** i **cobas® 8800** cechuje modułowa konstrukcja. Są one równoważne w przypadku wykonywania testu **cobas® BKV**. Wszystkie granice oszacowanych 95% przedziałów ufności związanych z różnicą między 2 pomiarami dotyczącymi tego samego pacjenta mieściły się w zakresie $\pm 0,84 \log_{10}$ IU/ml. Oznacza to, że za pomocą testu można ocenić zmiany poziomów DNA wirusa BKV o istotnym znaczeniu klinicznym.

Z 270 ważnych testów dotyczących ujemnych elementów panelu i wykonanych w systemach **cobas® 6800/8800** wszystkie próbki dały wynik „Target Not Detected” (Nie wykryto targetu). Oznacza to, że procentowa zgodność wyników ujemnych (NPA) wynosiła 100%, przy czym ścisły 95% przedział ufności mieścił się w granicach od 98,6% do 100%.

Wiarygodność kliniczna testu **cobas® BKV** – próbki osocza krwi pobranej na EDTA

Wiarygodność kliniczna testu **cobas® BKV** została dodatkowo oceniona w trzech ośrodkach badawczych. Zmierzono poziomy DNA wirusa BKV w próbkach klinicznych (rozcieńczonych i nierozcieńczonych) pobranych od pacjentów zakażonych i niezakażonych wirusem BKV oraz w spreparowanych próbkach osocza krwi pobranej na EDTA z dodanym wirusem BKV z hodowli. Wyniki porównano z wynikami uznanego testu do oznaczania kwasów nukleinowych opracowanego laboratoryjnie (LDT) (oznaczenie porównawcze BKV LDT). Ze wszystkich próbek oznaczonych za pomocą testu **cobas® BKV** i oznaczenia porównawczego BKV łącznie 550 próbek (217 nierozcieńczonych i 303 rozcieńczone próbki kliniczne od 129 biorców przeszczepu oraz 30 próbek spreparowanych) dało wyniki ważne w obu testach i kwalifikowało się do klinicznej analizy zgodności (Tabela 27).

Tabela 27 Analiza zgodności testu **cobas® BKV** i oznaczenia porównawczego LDT na podstawie wyników poziomów DNA wirusa BKV oznaczonych we wszystkich próbkach

cobas® BKV ($\log_{10}$ IU/ml)	Oznaczenie porównawcze BKV LDT ($\log_{10}$ IU/ml) Target Not Detected	Oznaczenie porównawcze BKV LDT ($\log_{10}$ IU/ml) < LLoQ (< 2,3)	Oznaczenie porównawcze BKV LDT ($\log_{10}$ IU/ml) od 2,3 do < 3,0	Oznaczenie porównawcze BKV LDT ($\log_{10}$ IU/ml) od 3,0 do < 3,7	Oznaczenie porównawcze BKV LDT ($\log_{10}$ IU/ml) od 3,7 do 4,4	Oznaczenie porównawcze BKV LDT ($\log_{10}$ IU/ml) > 4,4	Ogółem
Target Not Detected	107	7	5	0	0	0	119
< LLoQ (< 2,3)	23	51	39	0	0	0	113
od 2,3 do < 3,0	0	3	40	62	1	0	106
od 3,0 do < 3,7	0	0	1	71	42	0	114
od 3,7 do 4,4	0	0	0	0	26	26	52
> 4,4	0	0	0	0	1	45	46
Ogółem	130	61	85	133	70	71	550
Zgodność kolumny (%)	(130/130) 100,0%	(61/61) 100,0%	(80/85) 94,1%	(133/133) 100,0%	(69/70) 98,6%	(71/71) 100,0%	-
(Punktacja 95% CI) ^a	(97,1%, 100%)	(94,1%, 100,0%)	(87,0%, 97,5%)	(97,2%, 100,0%)	(92,3%, 99,7%)	(94,9%, 100,0%)	-

Uwaga: CI = przedział ufności; LLoQ = dolna granica oznaczalności oznaczenia porównawczego BKV LDT (200 IU/ml = $2,3 \log_{10}$ IU/ml). Odchylenie standardowe oznaczenia porównawczego BKV LDT oszacowano na $0,37 \log_{10}$ IU/ml (na podstawie analitycznego badania precyzji BKV LDT przeprowadzonego przez Uniwersytet Indiany). Stężenie analitu wynoszące $3,0 \log_{10}$ IU/ml odpowiadało wartości LLoQ + 2σ ; stężenie $3,7 \log_{10}$ IU/ml odpowiadało wartości LLoQ + 4σ , natomiast stężenie $4,4 \log_{10}$ IU/ml odpowiadało wartości LLoQ + 6σ przy przedziale zakresu wynoszącym 2σ . W tabeli uwzględniono sparowane próbki kwalifikujące się do analizy zgodności klinicznej.

^a Założona niezależność między wszystkimi próbkami.

Wyniki niezgodne zostały zdefiniowane jako oddalone o ponad jedno pole od przekątnej (pola zacieniowane). Liczbę próbek o wyniku Target Not Detected (TND) widoczną w komórce Zgodność kolumny LDT uzyskano poprzez dodanie wartości komórek **cobas**® BKV Target Not Detected i < LLoQ (< 2,3). Uzasadnieniem dodania przyległych komórek < LLoQ i TND w kolumnie TND jest fakt, że różnica pomiędzy wartościami TND i < LLoQ nie jest istotna klinicznie, a analitycznie obie te wartości znajdują się przy dolnej granicy zakresu pomiarowego, więc może mieć na nie wpływ błąd losowy.

Z 43 próbek ujemnych pod kątem DNA BKV pobranych do oceny NPA za pomocą testu **cobas**® BKV wszystkie 43 próbki dały wynik ujemny w teście **cobas**® BKV. Oznacza to, że NPA wynosiła 100%, przy czym ścisły 95% przedział ufności mieścił się w granicach od 91,8% do 100%.

Zgodność testu **cobas**® BKV i oznaczenia porównawczego BKV LDT oceniono, stosując różne kliniczne wartości progowe (Tabela 28).

Tabela 28 Podsumowanie zgodności testu **cobas**® BKV i oznaczenia porównawczego BKV LDT przy zastosowaniu różnych wartości progowych dla wszystkich próbek

Wartości progowe*	Zgodność procentowa < wartość progowa 95% CI (n/N)	Zgodność procentowa ≥ wartość progowa 95% CI (n/N)
Target Not Detected	82,3% (107/130) (74,8%, 87,9%)	97,1% (408/420) (95,1%, 98,4%)
LLoQ (2,3 log ₁₀ IU/ml)	98,4% (188/191) (95,5%, 99,5%)	87,7% (315/359) (83,9%, 90,7%)
3,0 log ₁₀ IU/ml	99,6% (275/276) (98,0%, 99,9%)	77,0% (211/274) (71,7%, 81,6%)
4,0 log ₁₀ IU/ml	100,0% (447/447) (99,1%, 100,0%)	67,0% (69/103) (57,4%, 75,3%)

Uwaga: próbki z wynikiem „Target Not Detected” (Nie wykryto targetu) zaklasyfikowano jako „< wartości progowej w IU/ml”.

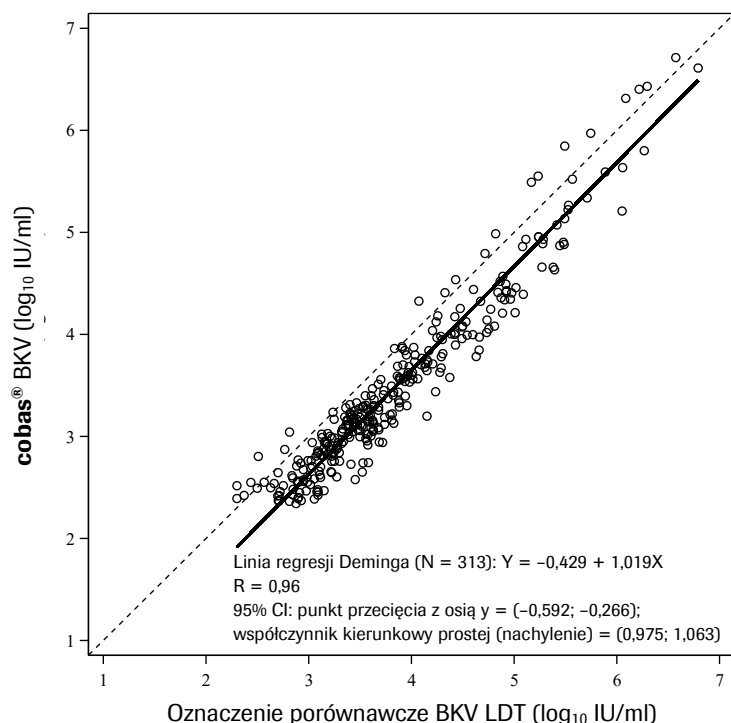
LLoQ = dolna granica oznaczalności oznaczenia porównawczego BKV LDT (200 IU/ml = 2,3 log₁₀ IU/ml).

95% przedział ufności (CI) obliczony metodą Score przy założeniu niezależności między wszystkimi próbkami.

* Wartości progowe wynosiły 1000 IU/ml = 3,0 log₁₀ IU/ml i 10 000 IU/ml = 4,0 log₁₀ IU/ml.

Ze wszystkich próbek oznaczonych za pomocą testu **cobas**® BKV, które po wykonaniu oznaczenia porównawczego BKV były dodatnie w kierunku BKV, łącznie 313 próbek (133 nierozcieńczone próbki kliniczne i 159 rozcieńczonych próbek klinicznych od 68 biorców przeszczepu oraz 21 spreparowanych próbek) kwalifikowało się do analizy korelacji w trzech ośrodkach badawczych (Ryc. 9).

Ryc. 9 Korelacja testu **cobas® BKV** z oznaczeniem porównawczym BKV LDT dla wszystkich próbek: wykres regresji liniowej Deminga poziomów DNA ($\log_{10}$ IU/ml)



Dodatkowa analiza wykresu rozrzutu przedstawiającego różnice w poziomach DNA wykazała różnicę systematyczną pomiędzy obydwooma testami, która jest stała przez cały nakładający się zakres liniowy. 95% przedział ufności punktu przecięcia prostej regresji z osią y na wykresach rozrzutu wynosił (-0,404; -0,168), co mieści się w granicy $\pm 0,74 \log_{10}$ IU/ml (± 2 odchylenia standardowe precyzji analitycznej oznaczenia porównawczego BKV LDT). Ponadto średni rozrzut oszacowano na $-0,357 \log_{10}$ IU/ml, a za pomocą równania prostej regresji na wykresach rozrzutu obliczono, że różnica systematyczna między obydwooma testami wynosiła $-0,343 \log_{10}$ IU/ml i $-0,362 \log_{10}$ IU/ml w przypadku próbek o poziomach DNA wynoszących odpowiednio $3 \log_{10}$ IU/ml i $4 \log_{10}$ IU/ml.

Powtarzalność testu **cobas® BKV** – próbki stabilizowanego moczu

Powtarzalność testu **cobas® BKV** oceniano w odniesieniu do wielu czynników, takich jak seria odczynników, ośrodek badawczy, partia i dni, w których przeprowadzono test, które mogą wpływać na zgłaszane wyniki rutynowych testów klinicznych. Ocena została przeprowadzona w 3 ośrodkach badawczych przy użyciu 3 serii odczynników oraz panelu próbek dodatnich i ujemnych, co dało łącznie 270 testów na stężenie (nie uwzględniając kontroli). Panele zostały przygotowane z próbek moczu stabilizowanego na podłożu **cobas® PCR Media**, w przypadku których potwierdzono wynik ujemny pod kątem DNA wirusa BKV za pomocą przeprowadzonego zgodnie z protokołem testu na obecność kwasów nukleinowych (NAT) moczu. Ponadto do próbek dodano międzynarodowy standard WHO BKV lub DNA pochodzącego z hodowli wirusa BKV o genotypie Ia. We wszystkich ośrodkach dwóch operatorów testowało każdą serię odczynników przez 5 dni. Każdego dnia wykonywano dwa przebiegi (1 przebieg = 1 partia; 1 partia = 1 panel + 3 kontrole), a podczas każdego przebiegu analizowano 3 powtórzenia każdego elementu panelu. Zestawienie wyników oceny, patrz Tabela 29.

Tabela 29 Możliwe do przypisania procentowe udziały zmienności całkowitej (%TV), odchylenia standardowego precyzji całkowitej (OS), i logarytmiczno-normalnego CV (%) stężenia DNA BKV ($\log_{10}$ IU/ml) wg. dodatnich elementów panelu (stabilizowany mocz)

Oczekiwane stężenie DNA BKV	Obserwowane średnie ^a stężenie DNA wirusa BKV	Liczba testów ^b	Seria %TV ^c (CV%) ^d	Ośrodek %TV ^c (CV%) ^d	Dzień/ operator %TV ^c (CV%) ^d	Partia %TV ^c (CV%) ^d	W ramach partii %TV ^c (CV%) ^d	Precyzja całkowita OS ^e	Precyzja całkowita CV (%) ^d
2,78	2,92	270	59% (12,64)	0% (1,15)	0% (0,00)	0% (0,00)	40% (10,41)	0,071	16,47
3,70	3,78	270	47% (8,14)	2% (1,62)	8% (3,31)	0% (0,00)	43% (7,72)	0,051	11,83
4,70	4,80	270	38% (5,02)	2% (1,28)	6% (2,07)	0% (0,00)	53% (5,96)	0,035	8,17
5,70	5,70	270	21% (3,12)	0% (0,00)	0% (0,00)	0% (0,00)	79% (6,12)	0,030	6,87
7,70	7,69	270	2% (1,51)	19% (4,84)	6% (2,79)	0% (0,00)	73% (9,53)	0,048	11,17

Uwaga: Tabela obejmuje wyłącznie wyniki z wykrywalnym poziomem DNA. SD = odchylenie standardowe; CV = procentowy współczynnik zmienności; BKV = wirus BK.

^a Obliczono z użyciem procedury SAS MIXED.

^b Liczba ważnych testów z wykrywalnym poziomem DNA.

^c %TV = procentowy udział w zmienności całkowitej.

^d CV% = logarytmiczno-normalny procentowy współczynnik zmienności = $\sqrt{10^{[OS^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Obliczono z użyciem całkowitej zmienności procedury SAS MIXED.

Test **cobas®** BKV wykazał akceptowalną powtarzalność kliniczną przy stężeniach w obrębie zakresu liniowego. Ponadto system wykrył 100% z 3 próbek z LLoQ. Systemy **cobas®** 6800 i **cobas®** 8800 cechuje modułowa konstrukcja. Są one równoważne w przypadku wykonywania testu **cobas®** BKV. Wszystkie granice oszacowanych 95% przedziałów ufności związanych z różnicą między 2 pomiarami dotyczącymi tego samego pacjenta mieściły się w zakresie $\pm 0,20 \log_{10}$ IU/ml. Oznacza to, że za pomocą testu można ocenić zmiany poziomów DNA wirusa BKV o istotnym znaczeniu klinicznym. System wykazał 99,26% procentową zgodność wyników ujemnych przy CI, 97,3–99,9%. Z 270 ważnych testów dla ujemnego elementu panelu 2 próbki (0,74%) miały poziom DNA < LLoQ wyników dodatnich. Dalsza analiza tych wyników wykazała, że nie były one związane z konkretnym aparatem/ośrodkiem ani serią odczynników. Dodatkowe sekwencjonowanie DNA potwierdziło obecność wirusa BKV. Oznaczone sekwencje BKV różniły się od tych z kontroli dodatniej i szczepu wirusa BKV wykorzystanego do przygotowania panelu, wykluczając zanieczyszczenie podczas przygotowania panelu i wskazując na ślady wirurii w jednej z 25 próbek moczu wchodzących w skład próbki spulowanej, która została wykorzystana do przygotowania panelu ujemnego.

Wiarygodność testu **cobas®** BKV – próbki stabilizowanego moczu

Wiarygodność kliniczna testu **cobas®** BKV została dodatkowo oceniona w trzech ośrodkach badawczych. Zmierzono poziomy DNA wirusa BKV w próbkach klinicznych moczu pobranych od pacjentów zakażonych i niezakażonych BKV. Probki ustabilizowano na podłożu **cobas®** PCR Media. Wyniki porównano z wynikami uznanego testu LDT (oznaczenie porównawcze BKV LDT).

Ze wszystkich próbek oznaczonych za pomocą testu **cobas®** BKV i oznaczenia porównawczego BKV łącznie 308 nierozcieńczonych próbek moczu pobranych od 84 biorców przeszczepu i stabilizowanych na podłożu **cobas®** PCR Media kwalifikowało się do analizy zgodności klinicznej w trzech ośrodkach badawczych (Tabela 30).

Tabela 30 Analiza zgodności testu **cobas®** BKV i oznaczenia porównawczego LDT na podstawie wyników poziomów DNA wirusa BKV ($\log_{10}$ IU/ml) oznaczonych we wszystkich próbkach (stabilizowany moczek)

cobas® BKV ($\log_{10}$ IU/ml)	Oznaczenie porównawcze BKV LDT Target Not Detected	Oznaczenie porównawcze BKV LDT < LLoQ (< 3,0)	Oznaczenie porównawcze BKV LDT od 3,0 do < 3,3	Oznaczenie porównawcze BKV LDT od 3,3 do < 3,6	Oznaczenie porównawcze BKV LDT od 3,6 do 3,9	Oznaczenie porównawcze BKV LDT >3,9	Ogółem
Target Not Detected	62	6	0	0	0	0	68
< LLoQ (< 3,0)	4	22	0	0	0	1	27
od 3,0 do < 3,3	0	2	0	0	0	0	2
od 3,3 do < 3,6	0	0	6	3	0	0	9
od 3,6 do 3,9	0	0	2	11	10	0	23
>3,9	0	0	0	2	8	169	179
Ogółem	66	30	8	16	18	170	308
Zgodność kolumny (%)	(66/66) 100,0%	(30/30) 100,0%	(6/8) 75,0%	(14/16) 87,5%	(18/18) 100,0%	(169/170) 99,4%	-
(Punktacja 95% CI) ^a	(94,5%, 100,0%)	(88,6%, 100,0%)	(40,9%, 92,9%)	(64,0%, 96,5%)	(82,4%, 100,0%)	(96,7%, 99,9%)	-

Uwaga: CI = przedział ufności; LLoQ = dolna granica oznaczalności oznaczenia porównawczego BKV LDT (1000 IU/ml = 3,0 $\log_{10}$ IU/ml); LDT = test opracowany laboratoryjnie; BKV = wirus BK.

Odchylenie standardowe oznaczenia porównawczego BKV LDT oszacowano na 0,15 $\log_{10}$ IU/ml (badanie weryfikacyjne oznaczenia porównawczego BKV LDT).

Stężenie analitu wynoszące 3,3 $\log_{10}$ IU/ml odpowiadało wartości LLoQ + 2 σ ; stężenie 3,6 $\log_{10}$ IU/ml odpowiadało wartości LLoQ + 4 σ , natomiast stężenie 3,9 $\log_{10}$ IU/ml odpowiadało wartości LLoQ + 6 σ przy przedziale zakresu wynoszącym 2 σ .

W tabeli uwzględniono sparowane próbki kwalifikujące się do analizy zgodności klinicznej.

^a Założona niezależność między wszystkimi próbkami.

Sekwencjonowanie DNA próbek reprezentatywnych od pacjentów, których wyniki cechują się stałym przesunięciem o ponad 1 $\log_{10}$ IU/ml poziomowi DNA, nie wykazało niedopasowań sekwencji docelowych w przypadku startera i sondy w teście **cobas®** BKV. Wyniki niezgodne zostały zdefiniowane jako oddalone o ponad jedno pole od przekątnej (pola zacieniowane). Liczbę próbek o wyniku Target Not Detected (TND) widoczną w komórce Zgodność kolumny LDT uzyskano poprzez dodanie wartości komórek **cobas®** BKV Target Not Detected i < LLoQ (< 3,0). Uzasadnieniem dodania przyległych komórek < LLoQ i TND w kolumnie TND jest fakt, że różnica pomiędzy wartościami TND i < LLoQ nie jest istotna klinicznie, a analitycznie obie te wartości znajdują się przy dolnej granicy zakresu pomiarowego, więc może mieć na nie wpływ błąd losowy. Z 66 próbek ujemnych pod kątem DNA BKV pobranych do oceny NPA za pomocą testu **cobas®** BKV 61 próbek dało ważny wynik. Wszystkie 61 próbek dało wynik ujemny w teście **cobas®** BKV. Oznacza to, że NPA wynosiła 100%, przy czym ścisły 95% przedział ufności mieścił się w granicach od 94,1% do 100%.

Zgodność testu **cobas®** BKV i oznaczenia porównawczego BKV LDT oceniono, stosując różne kliniczne wartości progowe (Tabela 31).

Tabela 31 Podsumowanie zgodności testu **cobas®** BKV i oznaczenia porównawczego BKV LDT przy zastosowaniu różnych wartości progowych dla wszystkich próbek (stabilizowany mocz)

Wartość progowa*	Zgodność procentowa < 95% CI wartości progowej (n/N)	Zgodność procentowa ≥ 95% CI wartości progowej (n/N)
Target Not Detected	93,9% (62/66) (85,4%, 97,6%)	97,5% (236/242) (94,7%, 98,9%)
LLoQ (3,0 log ₁₀ IU/ml)	97,9% (94/96) (92,7%, 99,4%)	99,5% (211/212) (97,4%, 99,9%)
4,0 log ₁₀ IU/ml	90,9% (130/143) (85,1%, 94,6%)	99,4% (164/165) (96,6%, 99,9%)
7,0 log ₁₀ IU/ml	97,2% (242/249) (94,3%, 98,6%)	94,9% (56/59) (86,1%, 98,3%)

Uwaga: próbki z wynikiem „Target Not Detected” (Nie wykryto targetu) zaklasyfikowano jako „< wartości progowej w IU/ml”.

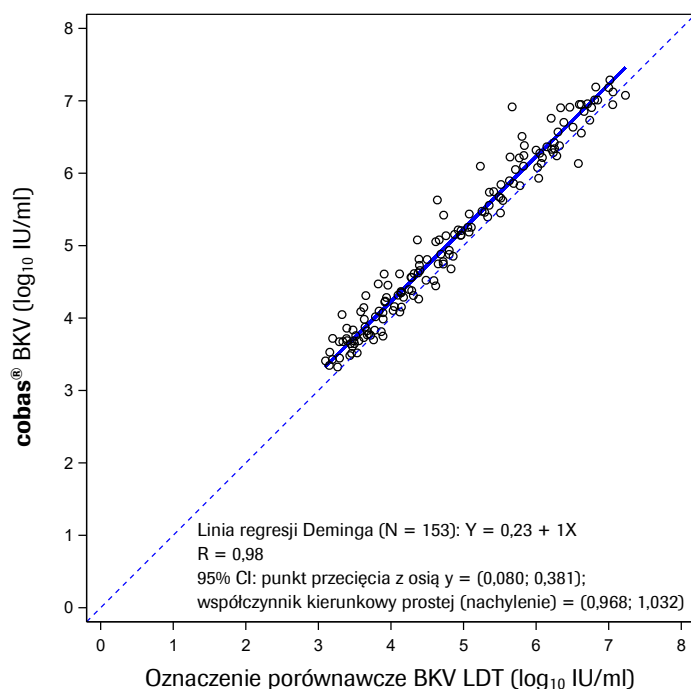
LLoQ = dolna granica oznaczalności oznaczenia porównawczego BKV LDT (1000 IU/ml = 3,0 log₁₀ IU/ml).

95% przedział ufności (CI) obliczony metodą Score przy założeniu niezależności między wszystkimi próbkami.

* Wartości progowe wynosiły 10 000 IU/ml = 4,0 log₁₀ IU/ml i 10 000 000 IU/ml = 7,0 log₁₀ IU/ml.

Ze wszystkich próbek oznaczonych za pomocą testu **cobas®** BKV, które po wykonaniu oznaczenia porównawczego BKV były dodatnie w kierunku wirusa BKV, łącznie 153 nierozcieńczone próbki moczu pobrane od 55 biorców przeszczepu i stabilizowane na podłożu **cobas®** PCR Media kwalifikowały się do analizy korelacji w trzech ośrodkach badawczych (Ryc. 10).

Ryc. 10 Korelacja testu **cobas®** BKV z oznaczeniem porównawczym BKV LDT dla wszystkich próbek: Wykres regresji liniowej Deminga poziomów DNA (log₁₀ IU/ml) (stabilizowany mocz)



Dodatkowa analiza wykresu rozrzutu przedstawiającego różnice w poziomach DNA wykazała różnicę systematyczną pomiędzy obydwoma testami, która jest stała przez cały nakładający się zakres liniowy. 95% przedział ufności punktu przecięcia prostej regresji z osią y na wykresach rozrzutu wynosił (0,168; 0,488), co mieści się w granicy $\pm 0,5 \log_{10}$ IU/ml. Ponadto średni rozrzut oszacowano na $0,231 \log_{10}$ IU/ml, a za pomocą równania prostej regresji na wykresach rozrzutu obliczono, że różnica systematyczna między obydwoma testami wynosiła $0,248 \log_{10}$ IU/ml i $0,188 \log_{10}$ IU/ml w przypadku próbek o poziomach DNA wynoszących odpowiednio $4 \log_{10}$ IU/ml i $7 \log_{10}$ IU/ml.

Równoważność/porównanie systemu

Równoważność systemów **cobas® 5800**, **cobas® 6800** i **cobas® 8800** wykazano przez badanie skuteczności. Wyniki przedstawione w instrukcji użytkowania potwierdzają równoważne działanie wszystkich systemów.

Dodatkowe informacje

Najważniejsze cechy testu

Rodzaj próbki	Osocze krwi pobranej na EDTA	Mocz stabilizowany w podłożu cobas® PCR Media
Wymagana ilość próbki	350 µl*	550 µl*
Objętość przetwarzania	200 µl	400 µl
Czułość analityczna	21,5 IU/ml (dwustronny 95% przedział ufności: 16,3–32,4 IU/ml)	12,2 IU/ml (dwustronny 95% przedział ufności: 9,2–18,3 IU/ml)
Zakres liniowości	21,5 IU/ml – 1E+08 IU/ml	200 IU/ml – 1E+08 IU/ml
Swoistość	100%	100%
Wykrywane podtypy	Podtypy i BKV (z podgrupami Ia, Ib i Ic), II, III i IV	

* Dla próbek wtórnych **cobas® omni** zidentyfikowano objętość martwą wynoszącą 150 µl. Inne próbki używane do testów mogą mieć inną objętość martwą i wymagać większej lub mniejszej objętości minimalnej. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.

Oznaczenia

Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

Tabela 32 Oznaczenia stosowane na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR

Age/DOB	Wiek lub data urodzenia		Wyrób nieprzeznaczony do testów przy pacjencie	QS IU/PCR	IU QS na reakcję PCR, użyć jednostek międzynarodowych (IU) QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.
	Oprogramowanie pomocnicze		Wyrób nieprzeznaczony do samodzielnego testowania	SN	Numer seryjny
Assigned Range [copies/mL]	Przypisany zakres (kopie/mL)		Dystrybutor (Uwaga: pod symbolem może być wskazany właściwy kraj/region.)	Site	Ośrodek
Assigned Range [IU/mL]	Przypisany zakres (IU/mL)		Nie używać powtórnie	Procedure Standard	Procedura standardowa
EC REP	Autoryzowany Przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej		Kobieta	STERILE EO	Produkt sterylizowany tlenkiem etylenu
BARCODE	Arkusze kodów kreskowych		Wyłącznie do oceny działania w badaniach IVD		Przechowywać z dala od światła
LOT	Kod partii	GTIN	Numer globalny jednostki handlowej		Przestrzegać zakresu temperatury
	Zagrożenie biologiczne		Importer		Plik definicji testów
REF	Numer katalogowy	IVD	Wyrób do diagnostyki <i>in vitro</i>		Tą stroną do góry
	Oznaczenie zgodności CE – wyrób ten jest zgodny z obowiązującymi wymogami dotyczącymi oznaczenia CE dla wyrobu medycznego do diagnostyki <i>in vitro</i>	LLR	Dolna granica przypisanego zakresu	Procedure UltraSensitive	Procedura ultraczuła
Collect Date	Data pobrania		Mężczyzna	UDI	Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu
	Sprawdź w instrukcji użytkowania		Wytwórca	ULR	Górna granica przypisanego zakresu
	Zawartość wystarczająca na <n> testów	CONTROL -	Kontrola ujemna	Urine Fill Line	Linia napełniania moczem
CONTENT	Zawartość zestawu		Wyrób niejałowy	Rx Only	Tylko Stany Zjednoczone: prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzowi lub na zamówienie takiego lekarza.
CONTROL	Próba kontrolna		Nazwisko pacjenta		Termin przydatności
	Data produkcji		Numer pacjenta		
	Wyrób do testów przy pacjencie		Rozerwać tutaj		
	Wyrób do samodzielnego testowania	CONTROL +	Kontrola dodatnia		
		QS copies / PCR	Kopie QS na reakcję PCR, użyć kopii QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.		

Pomoc techniczna

W celu uzyskania wsparcia (pomocy) technicznego należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Wytwórca i importer

Tabela 33 Wytwórca i importer



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

Made in USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Znaki towarowe i patenty

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

Prawo autorskie

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Písmiennictwo

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. PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. PMID: 23464993.
3. Morel V, Martin E, Francois C, et al. A Simple and Reliable Strategy for BK Virus Subtyping and Subgrouping. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1177-85. PMID: 28151406.
4. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009;199:837-46. PMID: 19434930.
5. Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *J Infect*. 2014;68 Suppl 1:S2-8. PMID: 24119828.
6. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:e13528. PMID: 30859620.
7. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:503-28. PMID: 28298471.
8. Yamada Y, Tsuchiya T, Inagaki I, Seishima M, Deguchi T. Prediction of Early BK Virus Infection in Kidney Transplant Recipients by the Number of Cells With Intranuclear Inclusion Bodies (Decoy Cells). *Transplant Direct*. 2018;4:e340. PMID: 29464201.
9. Nickeleit V, Singh HK. Polyomaviruses and disease: is there more to know than viremia and viruria? *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20:348-58. PMID: 25933251.
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. 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. PMID: 7845459.
12. 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;80:869-78. PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.
17. Goetsch HE, Zhao L, Gnegy M, et al. Fate of the Urinary Tract Virus BK Human Polyomavirus in Source-Separated Urine. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84. PMID: 29374036.
18. Boan P, Hewison C, Swaminathan R, et al. Optimal use of plasma and urine BK viral loads for screening and predicting BK nephropathy. *BMC Infect Dis*. 2016;16:342. PMID: 27448566.

Wersja dokumentu

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc Rev. 2.0 09/2022	Zaktualizowano pierwszą stronę, tabelę 2 i tabelę 3 o dodatkowe numery P/N zestawów kontrolnych. Zaktualizowano sekcję Znaki towarowe i patenty oraz link. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.
Doc Rev. 3.0 05/2023	Przywrócenie minimalnej objętości próbki do oryginalnego poziomu (patrz Instrukcja użytkowania oraz sekcja Najważniejsze cechy testu). Zaktualizowano oświadczenie o właściwym organie. Dodano brakujący przypis do Tabeli 20. Drobne zmiany edycyjne tekstu. Zaktualizowano zapis marki cobas®. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.

Podsumowanie sprawozdania na temat bezpieczeństwa i parametrów działania można znaleźć pod następującym linkiem:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.