

cobas[®] EBV

Quantitativer Nukleinsäuretest zur Verwendung auf den cobas[®] 5800/6800/8800 Systemen

In-vitro-Diagnostikum

cobas[®] EBV

P/N: 09040943190

Zur Verwendung auf dem cobas[®] 5800 System

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Zur Verwendung auf den cobas[®] 6800/8800 Systemen

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 08688214190 oder
P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 oder
P/N: 09051953190

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	4
Zusammenfassung und Erklärung des Tests	4
Reagenzien und Materialien	7
cobas® EBV-Reagenzien und Kontrollen	7
cobas® omni-Reagenzien für die Probenvorbereitung.....	10
Lagerungsbedingungen für Reagenzien	11
Handhabung der Reagenzien für das cobas® 5800 System bzw. die cobas® 6800/8800 Systeme.....	11
Zusätzlich benötigte Materialien für die cobas® 5800/6800/8800 Systeme	12
Benötigte Geräte und Software.....	13
Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung	14
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen.....	14
Umgang mit Reagenzien	15
Gute Laborpraxis.....	15
Entnahme, Transport und Lagerung von Proben	16
Proben.....	16
Gebrauchsanweisung	18
Hinweise zum Verfahren	18
Durchführung des cobas® EBV-Tests auf den cobas® 5800/6800/8800 Systemen	18
Ergebnisse	21
Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse auf dem cobas® 5800 System und den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 2.0 oder höher	21
Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse auf den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 1.4	21
Kontroll-Flags auf den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 1.4.....	22
Interpretation der Ergebnisse auf den cobas® 5800/6800/8800 Systemen.....	22
Interpretation der Ergebnisse auf dem cobas® 5800 System und den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 2.0 oder höher	23

Interpretation der Ergebnisse auf den cobas ® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 1.4.....	23
Verfahrenseinschränkungen.....	24
Nichtklinische Leistungsmerkmale	25
Systemäquivalenz	25
Wichtigste Leistungsmerkmale	25
Nachweisgrenze (LoD).....	25
Linearer Bereich.....	26
Laborinterne Präzision.....	27
Genotypverifizierung	28
Spezifität.....	28
Analytische Spezifität	28
Analytische Spezifität – Störsubstanzen	29
Korrelation der Methoden.....	30
Gesamtsystemausfall	31
Kreuzkontamination	31
Bewertung der klinischen Leistung	31
Reproduzierbarkeit des cobas ® EBV-Tests	31
Leistungsmerkmale des cobas ® EBV-Tests	32
Weitere Informationen	35
Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests	35
Symbole	36
Technischer Support.....	37
Hersteller und Importeur.....	37
Marken und Patente.....	37
Copyright.....	37
Literatur	38
Dokumentversion.....	39

Verwendungszweck

Der **cobas**® EBV-Test ist ein *in-vitro*-Nukleinsäure-Amplifikationstest zur quantitativen Bestimmung von Epstein-Barr-Virus (EBV)-DNA in EDTA-Humanplasma auf den **cobas**® 5800/6800/8800 Systemen.

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

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

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Hintergrund

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

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

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

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

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

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

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

Nutzen von NAT-Tests

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

Erklärung des Tests

Der cobas® EBV-Test ist ein quantitativer Test zur Verwendung auf den cobas® 5800/6800/8800 Systemen. Der cobas® EBV-Test ermöglicht den Nachweis und die quantitative Bestimmung von EBV-DNA in EDTA-Plasma von Infizierten. Zur quantitativen Bestimmung der Viruslast dient ein nicht aus EBV stammender DNA-Quantifizierungsstandard (DNA-QS), der bei der Verarbeitung jeder Probe zugegeben wird. Der DNA-QS dient zudem zur Überwachung des gesamten Prozesses der Probenvorbereitung und PCR-Amplifikation. Zusätzlich kommen bei dem Test drei externe Kontrollen zum Einsatz: eine Positivkontrolle mit hohem Titer, eine Positivkontrolle mit niedrigem Titer und eine Negativkontrolle. Die hoch positiven und niedrig positiven externen Kontrollen werden durch Verdünnung einer Stammlösung mit einem Titer hergestellt, der auf den ersten internationalen WHO-Standard für EBV (NIBSC code: 09/260) rückführbar ist. Jede Charge des Amplifikations-/Detektions-Kits ist so kalibriert, dass sie auf den ersten internationalen WHO-Standard für EBV (NIBSC-Code 09/260) rückführbar ist.

Testprinzipien

Der **cobas**® EBV-Test beruht auf einer vollautomatisierten Probenvorbereitung (Extraktion und Aufreinigung der Nukleinsäuren) gefolgt von PCR-Amplifikation und Detektion. Das **cobas**® 5800 System ist als ein integriertes Gerät ausgelegt. Die **cobas**® 6800/8800 Systeme bestehen aus einem Probenzufuhrmodul, einem Transfermodul, einem Aufarbeitungsmodul und einem Analysenmodul. Die automatisierte Datenverwaltung erfolgt über die Software des **cobas**® 5800 Systems oder der **cobas**® 6800/8800 Systeme, die die Ergebnisse aller Tests als „Target not detected“, „EBV-DNA nachgewiesen unter der unteren Quantifizierungsgrenze“, „EBV-DNA nachgewiesen über der oberen Quantifizierungsgrenze“ einstuft oder einen Wert im linearen Bereich von „untere Quantifizierungsgrenze < x < obere Quantifizierungsgrenze“ angibt. Die Ergebnisse können direkt am Bildschirm des Systems eingesehen, exportiert oder als Bericht ausgedruckt werden.

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

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

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

Reagenzien und Materialien

cobas® EBV-Reagenzien und Kontrollen

Die mit dem cobas® EBV-Test mitgelieferten Materialien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Alle zusätzlich benötigten Materialien sind in Tabelle 2 bis Tabelle 4 sowie Tabelle 8 bis Tabelle 9 aufgeführt.

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

Tabelle 1 cobas® EBV

cobas® EBV

Bei 2–8 °C lagern.

Kassette mit 192 Tests (P/N 09040943190)

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

Tabelle 2 cobas® EBV/BKV Control Kit

cobas® EBV/BKV Control Kit

Bei 2–8 °C lagern.

Zur Verwendung auf dem cobas® 5800 System und den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 2.0 oder höher (P/N 09040951190)

Zur Verwendung auf den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 1.4 (P/N 08688214190 oder P/N 09040951190)

Kitkomponenten	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit	Sicherheitssymbole und -hinweise*
Schwach positive EBV/BKV-Kontrolle (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001 % in Lambda-Bakteriophagenhüllprotein verkapselte synthetische (Plasmid) EBV-DNA, Normal-Humanplasma, EBV-DNA nicht mittels PCR-Methoden nachweisbar < 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  <p>WARNUNG</p> <p>H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe tragen. P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. P501: Inhalt/Behälter einer zugelassenen Abfallbeseitigungsanlage zuführen. 55965-84-9 Reaktionsmasse von: 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1).</p>
Hoch positive EBV/BKV-Kontrolle (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001 % in Lambda-Bakteriophagenhüllprotein verkapselte synthetische (Plasmid) EBV-DNA, Normal-Humanplasma, EBV-DNA nicht mittels PCR-Methoden nachweisbar < 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  <p>WARNUNG</p> <p>H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe tragen. P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. P501: Inhalt/Behälter einer zugelassenen Abfallbeseitigungsanlage zuführen. 55965-84-9 Reaktionsmasse von: 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1).</p>

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

** Gefährliche Substanz oder gefährliches Gemisch.

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

Bei 2–8 °C lagern.

Zur Verwendung auf dem **cobas®** 5800 System und den **cobas®** 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 2.0 oder höher (P/N 09051953190)

Zur Verwendung auf den **cobas®** 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 1.4 (P/N 07002238190 oder P/N 09051953190)

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

cobas® omni-Reagenzien für die Probenvorbereitung

Tabelle 4 cobas® omni Reagenzien für die Probenvorbereitung

Reagenzien	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit	Sicherheitssymbole und -hinweise*
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Bei 2–8 °C lagern. (P/N 06997546190)	Magnetische Glaspartikel, Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4-hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid	480 Tests	Keine Angabe
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Bei 2–8 °C lagern. (P/N 06997511190)	Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4-hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid	4 × 875 ml	Keine Angabe
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Bei 2–8 °C lagern. (P/N 06997538190)	43 % (Gew.-%) Guanidinthiocyanat**, 5 % (Massenvol.-%) Polidocanol**, 2 % (Massenvol.-%) Dithiothreitol**, Dihydro-Natriumcitrat	4 × 875 ml	 <p>GEFAHR</p> <p>H302 + H332: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen. H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung. EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz/Gehörschutz tragen. P303 + P361 + P353: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen. P304 + P340 + P310: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. P305 + P351 + P338 + P310: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen. P391: Verschüttete Mengen aufnehmen. 593-84-0 Guanidinthiocyanat 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol</p>
cobas® omni Wash Reagent (WASH) Bei 15–30 °C lagern. (P/N 06997503190)	Natriumcitratdihydrat, 0,1 % Methyl-4-Hydroxybenzoat	4,2 l	Keine Angabe

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

** Gefährliche Substanz oder gefährliches Gemisch.

Lagerungsbedingungen für Reagenzien

Reagenzien müssen wie in Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 angegeben gelagert und gehandhabt werden.

Reagenzien, die sich nicht im cobas® 5800 System oder in den cobas® 6800/8800 Systemen befinden, bei der in Tabelle 5 angegebenen Temperatur lagern.

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

Reagenz	Lagertemperatur
cobas® EBV	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

Handhabung der Reagenzien für das cobas® 5800 System bzw. die cobas® 6800/8800 Systeme

Reagenzien im cobas® 5800 System oder in den cobas® 6800/8800 Systemen werden bei angemessenen Temperaturen aufbewahrt und ihr Verfallsdatum wird vom System überwacht. Das System lässt die Verwendung der Reagenzien nur zu, wenn alle in Tabelle 6, Tabelle 7 und Tabelle 8 angegebenen Bedingungen erfüllt sind. Das System verhindert automatisch die Verwendung von abgelaufenen Reagenzien. Die Informationen zur verbleibenden Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits und zur zulässigen Anzahl der Verwendungen des Kits der für den Test benötigten Reagenzien finden Sie in der Benutzeroberfläche des Systems.

Tabelle 6 Bedingungen für die Haltbarkeit der Reagenzien, die vom cobas® 5800 System überwacht werden

Reagenz	Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits	Zulässige Anzahl an Verwendungen des Kits	Haltbarkeit im Gerät
cobas® EBV	90 Tage ab erstem Gebrauch	40	36 Tage ab dem Laden
cobas® EBV/BKV Control Kit	Gefäß für den Einmalgebrauch*	8	36 Tage ab dem Laden
cobas® Buffer Negative Control Kit	Gefäß für den Einmalgebrauch	16	36 Tage ab dem Laden

Tabelle 7 Bedingungen für die Haltbarkeit für Reagenzien, die von den **cobas®** 6800/8800 Systemen überwacht werden

Reagenz	Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits	Zulässige Anzahl an Verwendungen des Kits	Haltbarkeit im Gerät (außerhalb der Kühlung im Gerät)
cobas® EBV	90 Tage ab erstem Gebrauch	40	40 Stunden
cobas® EBV/BKV Control Kit	Gefäß für den Einmalgebrauch	8	8 Stunden
cobas® Buffer Negative Control Kit	Gefäß für den Einmalgebrauch	16	10 Stunden

Tabelle 8 gibt die Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits mit den **cobas® omni** Reagenzien an. Das System überprüft vor jedem Testdurchgang die Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits und ob die Reagenzienmenge ausreicht. Daher ist für diese Reagenzien keine zulässige Anzahl an Verwendungen des Kits und keine Haltbarkeit im Gerät festgelegt.

Tabelle 8 Bedingung für die Haltbarkeit der **cobas® omni** Reagenzien, die von den **cobas®** 5800/6800/8800 Systemen überwacht werden

Reagenz	Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits
cobas® omni Lysis Reagent	30 Tage ab dem Laden
cobas® omni MGP Reagent	30 Tage ab erstem Gebrauch
cobas® omni Specimen Diluent	30 Tage ab dem Laden
cobas® omni Wash Reagent	30 Tage ab dem Laden

Zusätzlich benötigte Materialien für die **cobas®** 5800/6800/8800 Systeme

Tabelle 9 Materialien zur Verwendung auf den **cobas®** 5800/6800/8800 Systemen

Material	P/N
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190

Tabelle 10 Verbrauchsmaterialien zur Verwendung auf dem **cobas® 5800 System***

Material
cobas® omni Processing Plate 24
cobas® omni Liquid Waste Plate 24
cobas® omni Amplification Plate 24
Pipettenspitzen CORE TIPS mit Filter, 1 ml
Pipettierspitzen CORE TIPS mit Filter, 300 µl
cobas® omni Liquid Waste Container
Beutel für Festabfälle oder Beutel für Festabfälle mit Einsatz
S-Carrier für Röhrchen mit 16 Positionen komplett
Rack-Carrier mit 5 Positionen

* Bestellnummern sind der Benutzerunterstützung des **cobas® 5800 Systems** zu entnehmen.

Tabelle 11 Verbrauchsmaterialien zur Verwendung auf den **cobas® 6800/8800 Systemen***

Material
cobas® omni Processing Plate
cobas® omni Amplification Plate
cobas® omni Pipette Tips
cobas® omni Liquid Waste Container
Beutel für Festabfälle und Festabfallbehälter oder Beutel für Festabfälle mit Einsatz und Kit-Schublade

* Bestellnummern sind der Benutzerunterstützung der **cobas® 6800/8800 Systeme** zu entnehmen.

Benötigte Geräte und Software

Die **cobas® 5800 Software**, die **cobas® 6800/8800 Software** und das **cobas® EBV Analysenpaket (ASAP)** für die **cobas® 5800/6800/8800 Systeme** müssen installiert sein.

Für die **cobas® 5800** und die **cobas® 6800/8800 Systemsoftware 2.0** oder höher werden die **x800 Data Manager-Software** und der **PC (bzw. Server)** mit dem System bereitgestellt.

Für die **cobas® 6800/8800 Systemsoftware 1.4** ist der **IG-Server (Instrument Gateway)** Bestandteil der Systeme.

Tabelle 12 Ausstattung

Ausstattung	P/N
cobas® 5800 System	08707464001
cobas® 6800 System	05524245001 und 09575154001
cobas® 8800 System	05412722001 und 09575146001
Probenzufuhrmodul für die cobas® 6800/8800 Systeme	06301037001 und 09936882001

Zusätzliche Informationen finden Sie in der Benutzerunterstützung des **cobas® 5800 Systems** bzw. der **cobas® 6800/8800 Systeme**.

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

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

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

- Nur zur Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Der **cobas**® EBV-Test wurde nicht zur Verwendung als Screening-Test für das Vorliegen von EBV in Blut oder Blutprodukten evaluiert.
- Alle Patientenproben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ und dem CLSI-Dokument M29-A4 beschrieben zu behandeln.^{15, 16} Dieses Verfahren darf nur von Personal angewandt werden, das mit dem **cobas**® EBV-Test und den **cobas**® 5800/6800/8800 Systemen vertraut und in der Handhabung infektiöser Materialien geschult ist.
- Alle von Menschen gewonnenen Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und müssen unter Anwendung genereller Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Wenn Material verschüttet wurde, betroffenes Areal unverzüglich mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 0,5%igem Natrium- oder Kaliumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser desinfizieren oder die jeweiligen Laborverfahren beachten.
- Das **cobas**® EBV/BKV Control Kit enthält aus menschlichem Blut gewonnenes Plasma. Bei der Untersuchung des Ausgangsmaterials mittels PCR-Methoden konnten geringe Mengen von EBV-DNA nachgewiesen werden, die in einem vertretbaren Bereich lagen. Mit keiner der bekannten Testmethoden kann jedoch eine Übertragung von Infektionserregern durch humane Blutprodukte ausgeschlossen werden.
- **Vollblut und andere Proben in Primärröhrchen nicht einfrieren.**
- Nur die mitgelieferten oder die als erforderlich angegebenen Verbrauchsmaterialien verwenden, um eine optimale Leistung des Tests zu gewährleisten.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage beim zuständigen Kundendienst von Roche Diagnostics erhältlich.
- Alle Verfahren und Vorschriften sind sorgfältig einzuhalten, um eine korrekte Durchführung des Tests sicherzustellen. Jede Abweichung von den Verfahren und Vorschriften kann sich auf die optimale Leistung des Tests auswirken.
- Es kann zu falsch-positiven Ergebnissen kommen, wenn während der Handhabung und Bearbeitung der Proben eine Probenverschleppung nicht vermieden wird.
- Wird eine Flüssigkeit verschüttet, die Guanidinhydrochlorid enthält, mit einem geeigneten Laborreinigungsmittel und Wasser beseitigen. Enthält die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Stoffe, muss der betroffene Bereich **ZUERST** mit Laborreinigungsmittel und Wasser und anschließend mit 0,5%igem Natrium- oder Kaliumhypochlorit gereinigt werden.
- Da über 90 % aller Erwachsenen chronische EBV-Träger sind und bis zu 10^8 Kopien/ml EBV-Viren über den Speichel ausscheiden, sowie aufgrund der hohen Sensitivität des Tests, sind entsprechende Maßnahmen im Labor zur Vermeidung von Kontaminationen unerlässlich.¹⁷

- Schwerwiegende Vorkommnisse, die bei Verwendung dieses Tests auftreten, müssen den zuständigen Behörden und dem Hersteller gemeldet werden.

Umgang mit Reagenzien

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

Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sind Laborhandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille zu tragen. Um eine Kontamination zu vermeiden, müssen die Handschuhe zwischen der Handhabung von Proben und den **cobas® EBV**-Kits, der schwach positiven EBV/BKV-Kontrolle (EBV/BKV L(+)_C), der hoch positiven EBV/BKV-Kontrolle (EBV/BKV H(+)_C), der **cobas®** Buffer Negative Control (BUF (-)_C) und den **cobas® omni** Reagenzien jeweils gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit den Proben und Kontrollen nicht kontaminiert werden.
- Nach Gebrauch der Proben und Kitreagenzien sowie nach dem Ausziehen der Handschuhe gründlich die Hände waschen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5%igem Natrium- oder Kaliumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren. Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abwischen.
- Wenn Flüssigkeiten auf dem **cobas® 5800** oder **cobas® 6800/8800** Gerät verschüttet wurden, die Oberflächen gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung des **cobas® 5800** Systems bzw. der **cobas® 6800/8800** Systeme reinigen und dekontaminieren.

Entnahme, Transport und Lagerung von Proben

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

Alle Proben bei den angegebenen Temperaturen lagern.

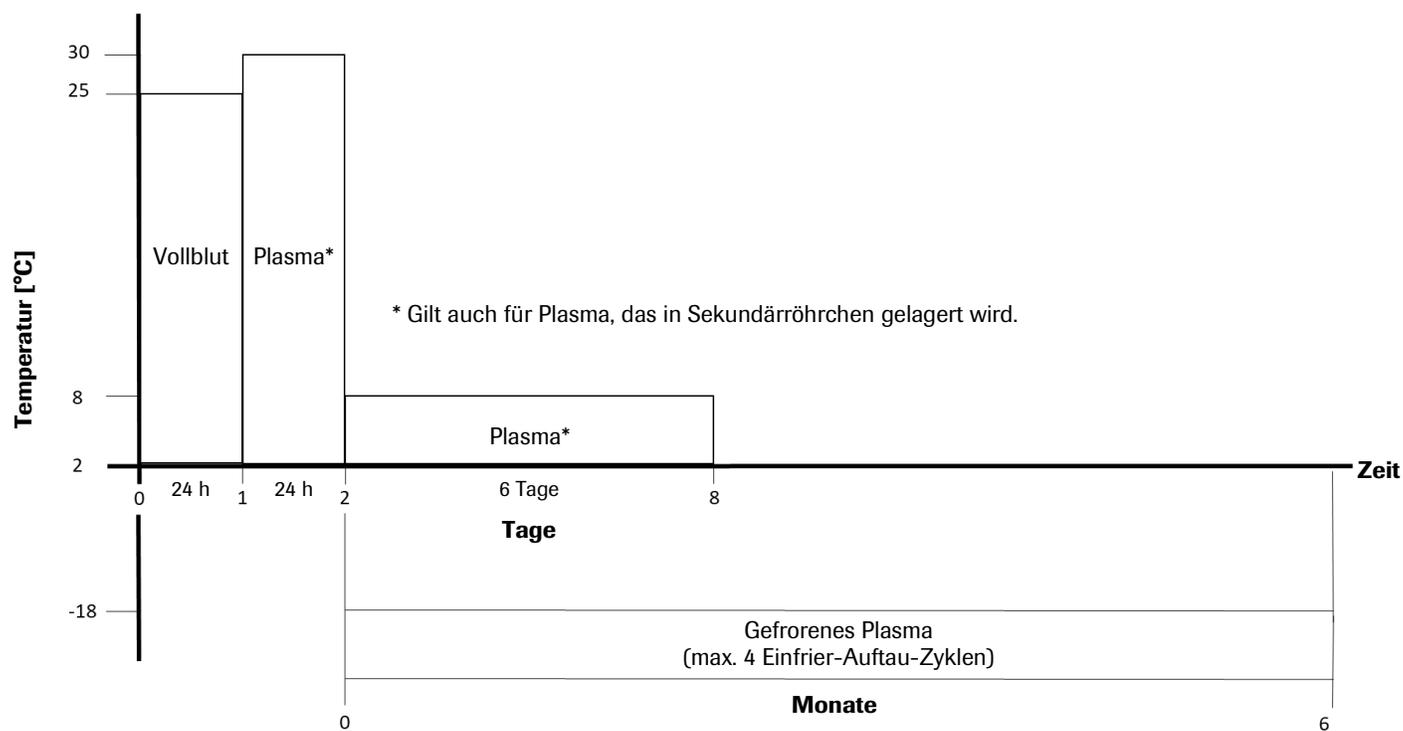
Erhöhte Umgebungstemperaturen wirken sich auf die Probenhaltbarkeit aus.

Bei Verwendung gefrorener Proben in Sekundärröhrchen die Proben bei Raumtemperatur (15–30 °C) vollständig auftauen lassen, kurz mischen (z. B. 3 bis 5 Sekunden im Vortexer) und anschließend zentrifugieren, um das gesamte Probenvolumen am Röhrchenboden zu sammeln.

Falls nach dem Zentrifugieren das Risiko besteht, dass Zellen in das Plasma resuspendiert wurden, sollte vor der Verarbeitung auf dem Gerät eine erneute Zentrifugation in Betracht gezogen werden.

Proben

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

Abbildung 1 Lagerbedingungen für Proben

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

Gebrauchsanweisung

Hinweise zum Verfahren

- Die **cobas**® EBV-Reagenzien, das **cobas**® EBV/BKV Control Kit, das **cobas**® Buffer Negative Control Kit und die **cobas**® **omni** Reagenzien nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Verbrauchsmaterialien nicht wiederverwenden. Sie sind ausschließlich zum Einmalgebrauch vorgesehen.
- Zur Durchführung des **cobas**® EBV-Tests ist ein Probenvolumen von mindestens 350 µl erforderlich, davon werden 200 µl verarbeitet.

Durchführung des **cobas**® EBV-Tests auf den **cobas**® 5800/6800/8800 Systemen

- Die Bedienung des Geräts ist in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 5800 Systems und der **cobas**® 6800/8800 Systeme ausführlich beschrieben.
- Informationen zur ordnungsgemäßen Wartung der Geräte finden Sie in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 5800 Systems bzw. der **cobas**® 6800/8800 Systeme.
- Darauf achten, dass die Barcode-Etiketten auf den Probenröhrchen durch die Öffnungen an der Seite der RD5- bzw. MPA-Probenracks sichtbar sind. Barcode-Spezifikationen und zusätzliche Informationen zum Laden von Probenröhrchen sind in der Benutzerunterstützung des **cobas**® 5800 Systems bzw. der **cobas**® 6800/8800 Systeme enthalten.

Abbildung 2 cobas® EBV-Testablauf auf dem cobas® 5800 System

1	Beim System anmelden.
2	Proben in das System laden: <ul style="list-style-type: none">• Probenracks in das System laden.• Vorbereitung erfolgt automatisch durch das System.• Tests auswählen.
3	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien auf Anforderung des Systems nachfüllen: <ul style="list-style-type: none">• Testspezifische Reagenzkassette(n) laden.• Kontroll-Miniracks laden.• Probenaufarbeitungsspitzen laden.• Elutionsspitzen laden.• Probenaufarbeitungsplatten laden.• Flüssigabfallplatten laden.• Amplifikationsplatten laden.• MGP-Kassette laden.• Specimen Diluent nachfüllen.• Lysereagenz nachfüllen.• Waschreagenz nachfüllen.
4	Den Lauf starten, indem Sie in der Benutzeroberfläche die Schaltfläche für den Bearbeitungsstart auswählen; alle nachfolgenden Läufe starten automatisch, sofern sie nicht manuell verschoben werden.
5	Ergebnisse prüfen und exportieren.
6	Probenröhrchen, die die Anforderungen an das Mindestvolumen erfüllen, bei Bedarf für weitere Anwendungen entnehmen und verschließen. Das Gerät reinigen: <ul style="list-style-type: none">• Leere Kontroll-Miniracks entnehmen.• Leere testspezifische Reagenzkassette(n) entnehmen.• Die Amplifikationsplattenschublade leeren.• Flüssigabfall entsorgen.• Festabfall entsorgen.

Abbildung 3 cobas® EBV-Testablauf auf den cobas® 6800/8800 Systemen

1	Beim System anmelden. Zum Vorbereiten des Systems „Start“ drücken. Tests auswählen.
2	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien auf Anforderung des Systems nachfüllen: <ul style="list-style-type: none">• Testspezifische Reagenzkassette laden.• Kontrollkassetten laden.• Pipettierspitzen laden.• Probenaufarbeitungsplatten laden.• MGP-Reagenz laden.• Amplifikationsplatten laden.• Specimen Diluent nachfüllen.• Lysereagenz nachfüllen.• Waschreagenz nachfüllen.
3	Proben in das System laden: <ul style="list-style-type: none">• Probenracks und Racks für gestopfte Spitzen in das Probenzufuhrmodul laden.• Sicherstellen, dass die Proben im Transfermodul aufgenommen wurden.
4	Lauf mit der Schaltfläche „Manuell starten“ in der Benutzeroberfläche starten oder den automatischen Start des Laufs nach 120 Minuten (oder wenn der Batch vollständig ist) programmieren.
5	Ergebnisse prüfen und exportieren.
6	Probenröhrchen, die die Anforderungen an das Mindestvolumen erfüllen, bei Bedarf für weitere Anwendungen entnehmen und verschließen. Das Gerät reinigen: <ul style="list-style-type: none">• Leere Kontrollkassetten entnehmen.• Die Amplifikationsplattenschublade leeren.• Flüssigabfall entsorgen.• Festabfall entsorgen.

Ergebnisse

Die **cobas**® 5800/6800/8800 Systeme dienen zur automatischen Bestimmung der EBV-DNA-Konzentration in Proben und Kontrollen. Die EBV-DNA-Konzentration wird in internationalen Einheiten pro Milliliter (IE/ml) angegeben.

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse auf dem **cobas**® 5800 System und den **cobas**® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 2.0 oder höher

- Mindestens alle 72 Stunden und mit jeder neuen Kitcharge werden eine **cobas**® Buffer Negative Control [(-) Ctrl] sowie zwei **cobas**® EBV/BKV Positive Controls, eine schwach positive Kontrolle [EBV/BKV L(+)C] und eine hoch positive Kontrolle [EBV/BKV H(+)C], mitgeführt. Positiv- bzw. Negativkontrollen können, wenn dies aufgrund der Laborverfahren und/oder der geltenden Vorschriften erforderlich ist, auch häufiger angesetzt werden.
- Die Ergebnisse der Kontrollen werden in der Anwendung „Kontrollen“ angezeigt.
- Die Software und/oder den Bericht auf Flags kontrollieren, um die Gültigkeit der entsprechenden Testergebnisse sicherzustellen. (Eine Liste der Flag-Codes finden Sie in der Benutzerunterstützung des x800 Data Managers.)
- Kontrollen werden in der Spalte „Kontrollergebnis“ mit „Gültig“ gekennzeichnet, wenn die entsprechenden Zielsequenzen der Kontrollen als gültig ausgegeben werden. Kontrollen werden in der Spalte „Kontrollergebnis“ mit „Ungültig“ gekennzeichnet, wenn die entsprechenden Zielsequenzen der Kontrollen als ungültig ausgegeben werden.
- Bei mit „Ungültig“ gekennzeichneten Kontrollen erscheint in der Spalte „Flags“ ein Hinweis. In der Detailansicht werden weitere Informationen dazu angezeigt, warum die Kontrolle als ungültig ausgegeben wurde und was der Flag bedeutet.
- Ist eine der Kontrollen ungültig, müssen alle Kontrollen und alle zugehörigen Proben erneut getestet werden.

Die Gerätesoftware nimmt je nach den Kontrollergebnissen automatisch eine Validierung der Ergebnisse vor.

HINWEIS: Das **cobas**® 5800 System und die **cobas**® 6800/8800 Systeme mit Softwareversion 2.0 oder höher werden mit der Standardeinstellung ausgeliefert, bei der mit jedem Lauf ein Satz Kontrollen (Positiv- und Negativkontrollen) analysiert wird; es kann aber je nach Laborverfahren und geltenden Vorschriften auch so konfiguriert werden, dass das Intervall bis zu 72 Stunden beträgt. Für weitere Informationen wenden Sie sich an Ihren Roche Servicetechniker und/oder den technischen Kundendienst von Roche.

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse auf den **cobas**® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 1.4

- Mit jedem Batch werden eine **cobas**® Buffer Negative Control [(-) Ctrl] und zwei **cobas**® EBV/BKV Positive Controls, eine schwach positive Kontrolle [EBV/BKV L(+)C] und eine hoch positive Kontrolle [EBV/BKV H(+)C] mitgeführt.
- Die Software und/oder den Bericht auf Flags und entsprechende Ergebnisse kontrollieren, um die Gültigkeit des Batches zu überprüfen.
- Eine Beschreibung aller Flags ist der Benutzerunterstützung der **cobas**® 6800/8800 Systeme zu entnehmen.
- Der Batch ist gültig, wenn für keine der Kontrollen Flags ausgegeben werden. Wenn der Batch ungültig ist, muss der Test mit allen Proben wiederholt werden.

Die Gerätesoftware nimmt je nach den Kontrollergebnissen automatisch eine Validierung der Ergebnisse vor.

Kontroll-Flags auf den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 1.4

Tabelle 13 Kontroll-Flags für Negativ- und Positivkontrollen

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

Interpretation der Ergebnisse auf den cobas® 5800/6800/8800 Systemen

Bei gültigen Batches sind die einzelnen Proben in der Software des cobas® 5800 Systems bzw. der cobas® 6800/8800 Systeme und/oder in den Berichten auf Flags zu kontrollieren. Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

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

Tabelle 14 Interpretation der Ergebnisse für die einzelnen Zielsequenzen

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

^a Das Probenergebnis „< Titer Min“ (Zielsequenz nachgewiesen unter der unteren Quantifizierungsgrenze) muss im Kontext mit anderen klinischen Daten interpretiert werden und darf nicht als alleinige Grundlage für Therapieentscheidungen herangezogen werden.

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

Interpretation der Ergebnisse auf dem cobas® 5800 System und den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 2.0 oder höher

Die Ergebnisse der Proben werden in der Software in der Anwendung „Ergebnisse“ angezeigt.

Bei gültigen Kontroll-Batches die einzelnen Proben in der Software und/oder im Bericht auf Flags kontrollieren. Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

- Einem gültigen Kontroll-Batch zugehörige Proben werden in der Spalte „Kontrollergebnis“ als „Gültig“ angezeigt, wenn für alle Kontrollzielsequenzen das Ergebnis „Gültig“ ausgegeben wurde. Einem fehlgeschlagenen Kontroll-Batch zugehörige Proben werden in der Spalte „Kontrollergebnis“ als „Ungültig“ angezeigt, wenn für alle Kontrollzielsequenzen das Ergebnis „Ungültig“ ausgegeben wurde.
- Wenn die zu einem Probenergebnis gehörigen Kontrollen ungültig sind, wird das Probenergebnis mit einem der folgenden Flags versehen:
 - Q05D: Fehler bei der Ergebnisvalidierung infolge einer ungültigen Positivkontrolle
 - Q06D: Fehler bei der Ergebnisvalidierung infolge einer ungültigen Negativkontrolle
- Die Ergebniswerte in der Spalte „Ergebnisse“ zu den einzelnen Zielergebnissen einer Probe sind wie in Tabelle 14 oben dargestellt zu interpretieren.
- Wenn mindestens eine Zielsequenz einer Probe als „Ungültig“ gekennzeichnet wurde, zeigt die Software einen Hinweis in der Spalte „Flags“ an. In der Detailansicht werden weitere Informationen dazu angezeigt, warum die Zielsequenz(en) der Probe als ungültig ausgegeben wurde(n) und was der Flag bedeutet.

Interpretation der Ergebnisse auf den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 1.4

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

- Die Proben werden in der Spalte „Gültig“ mit „Ja“ gekennzeichnet, wenn für alle angeforderten Zielregionen gültige Ergebnisse erhalten wurden. Die Proben werden in der Spalte „Gültig“ mit „Nein“ gekennzeichnet, wenn ggf. zusätzliche Interpretationen und Maßnahmen erforderlich sind.
- Die Ergebniswerte zu den einzelnen Zielsequenzen einer Probe sind wie in Tabelle 14 oben dargestellt zu interpretieren.

Verfahrenseinschränkungen

- Der **cobas**® EBV-Test ist ausschließlich für den Gebrauch mit dem **cobas**® EBV/BKV Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit, **cobas**® **omni** MGP Reagent, **cobas**® **omni** Lysis Reagent, **cobas**® **omni** Specimen Diluent und **cobas**® **omni** Wash Reagent auf den **cobas**® 5800/6800/8800 Systemen validiert.
- Zuverlässige Ergebnisse hängen von der sachgemäßen Entnahme, Lagerung und Bearbeitung der Proben ab.
- Dieser Test wurde ausschließlich für die Verwendung mit EDTA-Plasma validiert. Wenn mit dem **cobas**® EBV-Test andere Arten von Proben getestet werden, können falsche Ergebnisse erzielt werden. Die Messung der Viruslast in Plasma ist nicht direkt mit der Messung anderer Probenarten vergleichbar.
- Die Quantifizierung von EBV-DNA kann durch das Probenentnahmeverfahren, patientenbezogene Faktoren (d. h. Alter, Vorhandensein von Symptomen) und/oder das Infektionsstadium beeinflusst werden.
- Wie bei allen molekularen Tests können Mutationen in den Zielregionen, die durch den **cobas**® EBV-Test abgedeckt werden, die Primer- und/oder Sondenbindung beeinträchtigen und dadurch zur Unterquantifizierung oder Nichterkennung des Virus führen.
- Bevor Benutzer zwischen verschiedenen Verfahren wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren im eigenen Labor Studien zur Korrelation der Methoden durchführen, um die Unterschiede der Verfahren zu ermitteln. Außerdem sollten Benutzer stets die eigenen Richtlinien und Verfahren beachten.
- Der **cobas**® EBV-Test ist nicht zur Verwendung als Screening-Test für das Vorliegen von EBV in Blut oder Blutprodukten vorgesehen.

Nichtklinische Leistungsmerkmale

Systemäquivalenz

Die Systemäquivalenz der **cobas**® 5800, **cobas**® 6800 und **cobas**® 8800 Systeme wurde anhand von Leistungsstudien belegt. Die in dieser Gebrauchsanweisung aufgeführten Daten zeigen, dass die Leistungsmerkmale für alle Systeme gleich sind.

Wichtigste Leistungsmerkmale

Nachweisgrenze (LoD)

Internationaler WHO-Standard

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

Die Ergebnisse für EDTA-Plasma sind in Tabelle 15 bis Tabelle 17 dargestellt. Die Untersuchungen ergeben, dass bei der am wenigsten empfindlichen Charge die Konzentration 18,8 IE/ml beträgt (gemäß PROBIT wird für die Konzentration bei einem 95 %-Konfidenzintervall zwischen 14,5 und 27,5 IE/ml in EDTA-Plasma eine Trefferquote von 95 % erwartet). Die geringste Konzentration mit einer Trefferquote von ≥ 95 % in EDTA-Plasma beträgt 20,0 IE/ml.

Tabelle 15 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, Charge 1

Ausgangstiterkonzentration (EBV-DNA, IE/ml)	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	62	98,4
20,0	63	61	96,8
10,0	63	53	84,1
5,0	63	37	58,7
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	18,8 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 14,5–27,5 IE/ml		

Tabelle 16 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, Charge 2

Ausgangstiterkonzentration (EBV-DNA, IE/ml)	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	58	92,1
5,0	63	35	55,6
2,5	63	20	31,8
0,0	63	0	0,0
Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	12,4 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 10,0–17,0 IE/ml		

Tabelle 17 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, Charge 3

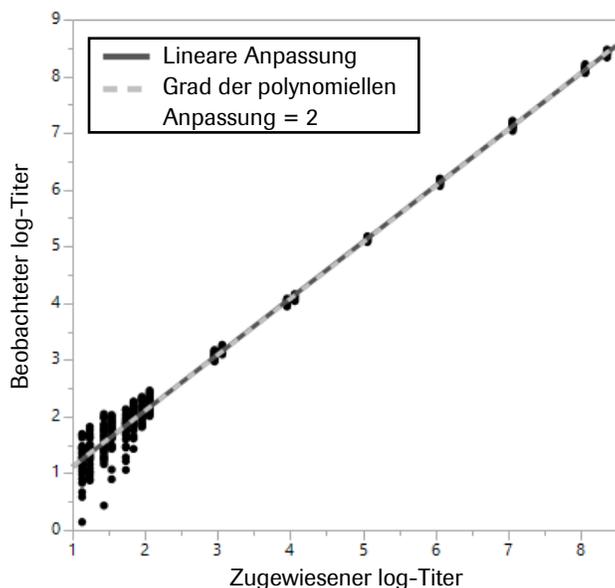
Ausgangstiterkonzentration (EBV-DNA, IE/ml)	Anzahl gültiger Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	62	98,4
10,0	63	48	76,2
5,0	63	38	60,3
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	18,6 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 14,4–27,1 IE/ml		

Linearer Bereich

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

Jede Panelprobe wurde mit 36 Replikaten über drei Chargen von **cobas**® EBV-Testreagenzien getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 4 dargestellt.

Es wurde gezeigt, dass der lineare Bereich des **cobas**® EBV-Tests von $1,40 \times 10^1$ IE/ml bis $2,30 \times 10^8$ IE/ml reicht und die absolute Abweichung von der nichtlinearen Regression in EDTA-Humanplasma maximal $\pm 0,1 \log_{10}$ beträgt (siehe Abbildung 4). Im gesamten linearen Bereich liegt die Genauigkeit des Tests innerhalb von $\pm 0,2 \log_{10}$.

Abbildung 4 Bestimmung des linearen Bereichs für EDTA-Plasma

Laborinterne Präzision

Die Präzision des **cobas**® EBV-Tests wurde anhand einer Verdünnungsreihe bestimmt, bei der EBV-DNA des Genotyps 1 mit hohem Titer in EBV-negativem EDTA-Plasma analysiert werden. Dabei wurden an 12 Tagen unter Verwendung von drei Geräten und drei Anwendern sechs Verdünnungsstufen mit 72 Replikaten für jede Verdünnung über drei Chargen von **cobas**® EBV-Reagenzien getestet. Alle Proben durchliefen das gesamte **cobas**® EBV-Testverfahren auf vollautomatisierten **cobas**® 6800/8800 Systemen. Die hier angegebene Präzision spiegelt daher alle Aspekte des Testverfahrens wider. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

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

Tabelle 18 Laborinterne Präzision des **cobas**® EBV-Tests

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

Genotypverifizierung

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

- Verifizierung der Nachweisgrenze
- Verifizierung des linearen Bereichs

Verifizierung der Nachweisgrenze für Genotyp 2

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

Verifizierung des linearen Bereichs für Genotyp 2

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

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

Spezifität

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

Analytische Spezifität

Zur Evaluierung der analytischen Spezifität des cobas® EBV-Tests wurde ein Panel aus Mikroorganismen mit EBV-DNA-positivem und EBV-DNA-negativem EDTA-Plasma für Bakterien und Hefe auf eine Konzentration von $1,00E+06$ Einheiten/ml (Zellen/ml, CFU/ml, IFU/ml, CCU/ml) und für Viren auf eine Konzentration zwischen $3,00E+05$ und $1,00E+06$ Einheiten/ml (IE/ml, Kopien/ml, Zellen/ml, TCID₅₀/ml) verdünnt. Die verwendeten Organismen sind in Tabelle 19 aufgeführt. Jede Panelprobe wurde mit dem cobas® EBV-Test evaluiert. Keines der Nicht-EBV-Pathogene beeinträchtigte die Testleistung.

Tabelle 19 Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität getestete Mikroorganismen

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

Analytische Spezifität – Störsubstanzen

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

Zusätzlich wurden die in Tabelle 20 aufgeführten Wirkstoffe in dreifacher C_{\max} -Konzentration mit und ohne EBV-DNA getestet.

Keine der potenziellen Störsubstanzen führte zu einer Störung der Testleistung.

Tabelle 20 Wirkstoffe, die auf einen möglichen störenden Einfluss auf die quantitative Bestimmung von EBV-DNA mit dem cobas® EBV-Test getestet wurden

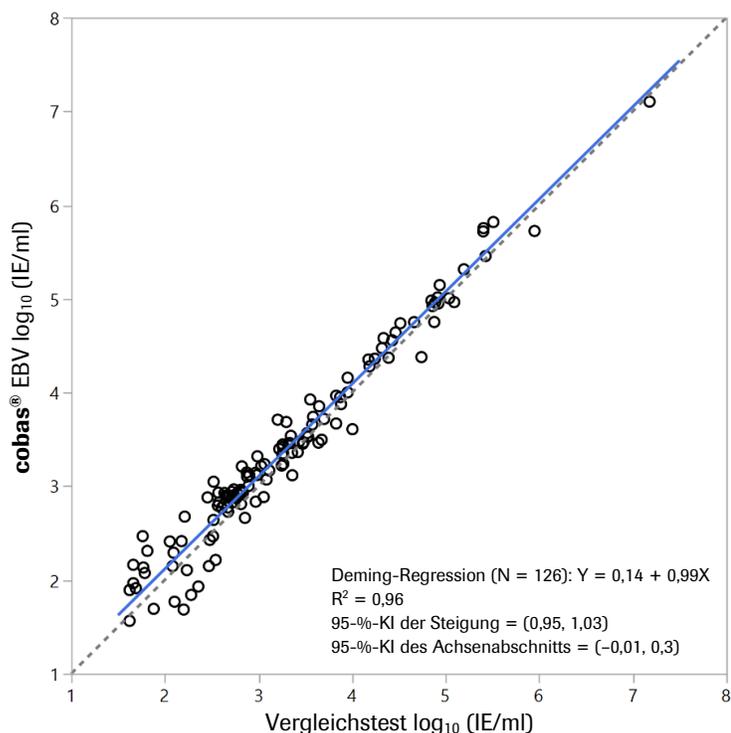
Wirkstoffklasse	Freiname	
Antimikrobiotikum	Cefotetan	Sulfamethoxazol
	Clavulanat-Kalium	Ticarcillin-Dinatrium
	Fluconazol	Trimethoprim
	Piperacillin	Vancomycin
	Tazobactam-Natrium	Micafungin
Substanzen zur Behandlung von Herpes-Viren	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Acyclovir	Letermovir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

Korrelation der Methoden

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

Die Ergebnisse der Deming-Regression sind in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5 Regressionsanalyse des cobas® EBV-Tests im Vergleich zum Vergleichstest



Gesamtsystemausfall

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

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

Kreuzkontamination

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

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

Bewertung der klinischen Leistung

Reproduzierbarkeit des **cobas**® EBV-Tests

Die Reproduzierbarkeit des **cobas**® EBV-Tests wurde unter Einbeziehung von Faktoren (Reagenzcharge, Testzentrum, Batch und Testtag) evaluiert, die sich bei routinemäßigen klinischen Tests darauf auswirken könnten, welche Ergebnisse erzielt werden. Die Untersuchung wurde an 3 Testzentren mit 3 Reagenzchargen eines aus positiven sowie eines aus negativen Proben bestehenden Probenpanels durchgeführt. Daraus ergibt sich eine Gesamtanzahl von 270 Tests (ohne Kontrollen). Beide Panels wurden mit EDTA-Plasma erstellt, das für das EBV-Kapsidantigen spezifische IgG negativ war, zur Bestätigung der Negativität mittels Plasma-NAT auf EBV getestet und mit einem internationalen WHO-Standard für EBV, EBV-Zellkulturüberstand oder einem EBV-DNA enthaltenden Lambda-Phagemid versetzt. Zwei Anwender an jedem Standort testeten jede Reagenzcharge über einen Zeitraum von 5 Tagen. Es wurden 2 Läufe (1 Lauf = 1 Batch; 1 Batch = 1 Panel + 3 Kontrollen) pro Anwender und Tag durchgeführt, und für jeden Lauf wurden 3 Replikate jeder Panelprobe analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21 Zuordenbarer Prozentsatz der Gesamtvarianz (% TV), Standardabweichung (SD) der Gesamtpräzision und lognormaler VK (%) der EBV-DNA-Konzentration (\log_{10} IE/ml) nach positiver Panelprobe

Erwartungswert der EBV-DNA-Konzentration (\log_{10} IE/ml)	Gemessene mittlere ^a EBV-DNA-Konzentration (\log_{10} IE/ml)	Anzahl der Tests ^b	Charge % TV ^c (VK %) ^d	Testzentrum % TV ^c (VK %) ^d	Tag/Anwender % TV ^c (VK %) ^d	Batch % TV ^c (VK %) ^d	Innerhalb eines Batches % TV ^c (VK %) ^d	Gesamtpräzision SD ^e	Gesamtpräzision VK (%) ^d
2,02	2,09	270	11 % (11,97)	2 % (5,30)	0 % (0,00)	3 % (6,34)	84 % (34,25)	0,158	37,56
3,70	3,68	270	43 % (10,07)	15 % (5,92)	0 % (0,00)	16 % (6,23)	26 % (7,81)	0,067	15,43
4,70	4,68	270	39 % (8,54)	10 % (4,24)	0 % (0,00)	24 % (6,63)	28 % (7,18)	0,059	13,70
5,70	5,50	268	7 % (11,39)	58 % (34,36)	0 % (0,00)	21 % (20,18)	15 % (17,08)	0,191	46,16
7,70	7,76	270	27 % (8,63)	15 % (6,52)	0 % (0,88)	13 % (6,01)	45 % (11,26)	0,073	16,83

^a Mittels SAS-MIXED-Verfahren berechnet.

^b Anzahl der gültigen Tests mit nachweisbarem DNA-Wert.

^c % TV = Prozentualer Anteil an der Gesamtvarianz.

^d VK % = Lognormaler prozentualer Variationskoeffizient = $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Anhand Gesamtvariabilität aus SAS-MIXED-Verfahren berechnet.

Hinweis: Die Tabelle umfasst nur Ergebnisse mit nachweisbarem DNA-Wert. SD = Standardabweichung; VK (%) = Variationskoeffizient; EBV = Epstein-Barr-Virus.

Der **cobas**® EBV-Test wies für die jeweilige Vergleichskonzentration eine akzeptable klinische Reproduzierbarkeit auf. Zudem erkannte das System 100 % der Proben mit einer Konzentration der 3fachen LLoQ korrekt. Das **cobas**® 6800 und das **cobas**® 8800 System haben den gleichen modularen Aufbau und erwiesen sich bei Verwendung des **cobas**® EBV-Tests als äquivalent. Alle ermittelten Grenzen der 95-%-Konfidenzintervalle für die Differenz zwischen 2 Messungen für denselben Patienten lagen im Bereich von $\pm 0,53 \log_{10}$ IE/ml. Dies bedeutet, dass der Test als klinisch relevant erachtete Änderungen der EBV-DNA-Konzentration feststellen kann.

In den 270 gültigen Tests mit den negativen Panelproben, die auf den **cobas**® 6800/8800 Systemen durchgeführt wurden, wurde bei 14 Proben (5,19 %) Positivität unterhalb der LLoQ festgestellt. Die Ergebnisse standen nicht mit einem bestimmten Gerät/Zentrum oder einer bestimmten Reagenzcharge in Zusammenhang. Das Vorliegen von EBV-DNA in diesen Proben wurde durch die heminested PCR und DNA-Sequenzierung bestätigt.

Leistungsmerkmale des **cobas**® EBV-Tests

Die klinischen Leistungsmerkmale des **cobas**® EBV-Tests wurden an drei Testzentren näher untersucht. Dazu wurde die EBV-DNA-Konzentration sowohl in klinischen Proben (unverdünnte und verdünnte) von mit EBV infizierten und nicht infizierten Patienten als auch in künstlich hergestellten EDTA-Plasmaproben, die mit einem EB-Kulturvirus versetzt wurden, gemessen. Als Vergleichstest diente ein etablierter laborentwickelter Nukleinsäuretest, hier „Vergleichs-EBV-LDT“ genannt (LDT: Laboratory Developed Test). Von allen mit dem **cobas**® EBV-Test und dem EBV-Vergleichstest getesteten Proben waren 464 (439 unverdünnte oder verdünnte klinische Proben von 72 Transplantatempfängern sowie 25 künstlich hergestellte Proben) in beiden Tests gültig und für eine Analyse der klinischen Konkordanz auswertbar.

Tabelle 22 Konkordanzanalyse zwischen dem **cobas®** EBV-Test und dem Vergleichs-LDT zu den EBV-DNA-Konzentrationsergebnissen für alle Proben

cobas® EBV (log₁₀ IE/ml)	Vergleichs- EBV-LDT (log₁₀ IE/ml) Target Not Detected	Vergleichs- EBV-LDT (log₁₀ IE/ml) < LLoQ (< 2)	Vergleichs- EBV-LDT (log₁₀ IE/ml) 2 bis < 2,6	Vergleichs- EBV-LDT (log₁₀ IE/ml) 2,6 bis < 3,2	Vergleichs- EBV-LDT (log₁₀ IE/ml) 3,2 bis 3,8	Vergleichs- EBV-LDT (log₁₀ IE/ml) > 3,8	Gesamt
Target Not Detected	95	17	17	0	0	0	129
< LLoQ (< 2)	39	46	75	11	0	0	171
2 bis < 2,6	1	2	16	37	6	0	62
2,6 bis < 3,2	1	0	5	15	30	1	52
3,2 bis 3,8	0	0	0	0	9	11	20
> 3,8	0	0	0	0	1	29	30
Gesamt	136	65	113	63	46	41	464
Übereinstimmung Spalte (%)	(134/136) 98,5 %	(65/65) 100 %	(96/113) 85,0 %	(52/63) 82,5 %	(40/46) 87,0 %	(40/41) 97,6 %	-
(95%-KI) ^a	(94,8 %, 99,6 %)	(94,4 %, 100 %)	(77,2 %, 90,4 %)	(71,4 %, 90,0 %)	(74,3 %, 93,9 %)	(87,4 %, 99,6 %)	-

Hinweis: LLoQ = untere Quantifizierungsgrenze des Vergleichs-EBV-LDT (100 IE/ml).

Für den Vergleichs-EBV-LDT wurde eine Standardabweichung von 0,3 log₁₀ IE/ml ermittelt (Studie zur analytischen Präzision des EBV-LDT).

In diese Tabelle wurden die gepaarten Proben aufgenommen, die für die Analyse der klinischen Konkordanz auswertbar waren.

^a Es wurde angenommen, dass alle Proben voneinander unabhängig sind.

KI = Konfidenzintervall.

Eine DNA-Sequenzierung repräsentativer Proben von Patienten mit durchgängig um mehr als 1 log₁₀ IE/ml des DNA-Werts versetzten Ergebnissen ergab für keine Primer- oder Sondenzielregion des **cobas®** EBV-Tests eine Sequenz-Fehlpaarung.

Als nicht übereinstimmend waren Ergebnisse definiert, die weiter als ein Kästchen von der Diagonalen entfernt sind (grau dargestellt). Für „Übereinstimmung Spalte“, in der Spalte „Target Not Detected“ für den Vergleichs-EBV-LDT, wurden die Zahlen für „Target Not Detected“ und „< LLoQ (< 2)“ für den **cobas®** EBV-Test zusammengeführt. Der Grund dafür, die Zellen für „< LLoQ“ und „Target Not Detected“ für die Spalte „Target Not Detected“ zusammenzunehmen, ist, dass der Unterschied zwischen keinem nachgewiesenen Ziel und einer Konzentration unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze klinisch nicht erheblich ist und beide sich aus analytischer Sicht im unteren Messbereich befinden, der anfällig für zufällige Abweichungen ist.

Von den 43 negativen Proben, die für die Bestimmung der NPA beim **cobas®** EBV-Test zusammengestellt wurden und im Vergleichs-EBV-LDT negativ waren, waren 41 Proben im **cobas®** EBV-Test negativ. Damit lag die NPA bei 95,4 % mit einem exakten 95%-KI von 84,2 % bis 99,4 %. Zwei Proben, die im Vergleichs-EBV-LDT negativ waren, waren im **cobas®** EBV-Test positiv (< LLoQ) und im ergänzenden serologischen Test seropositiv für das für EBV-VCA (Viruskapsidantigen) und EBNA-1 spezifische IgG.

Die Konkordanz zwischen dem **cobas®** EBV-Test und dem Vergleichs-EBV-LDT wurde zudem anhand verschiedener klinischer Schwellenwerte ausgewertet.

Tabelle 23 Zusammenfassung der Konkordanz zwischen dem **cobas®** EBV-Test und dem Vergleichs-EBV-LDT für alle Proben anhand verschiedener Schwellenwerte

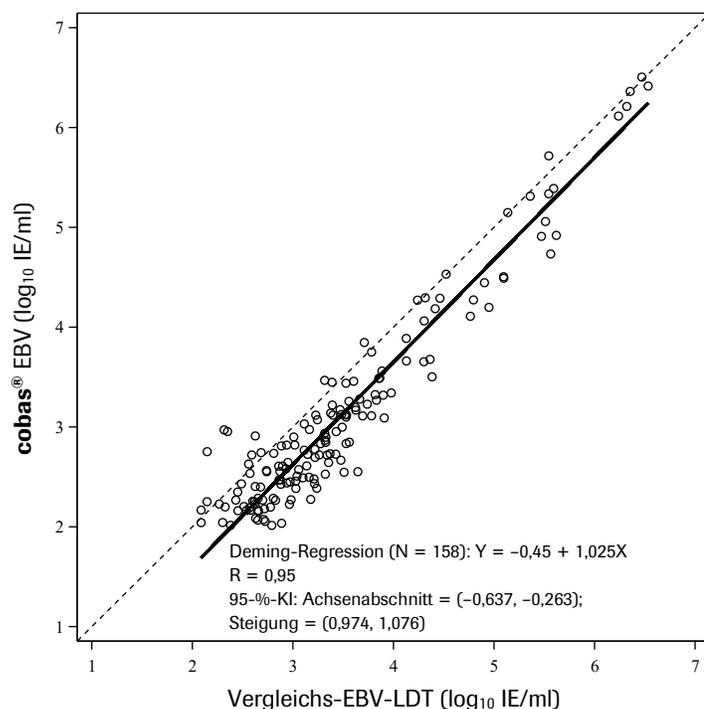
	Übereinstimmung in Prozent < Schwellenwert 95 %-KI ^b (n/N)	Übereinstimmung in Prozent ≥ Schwellenwert 95 %-KI ^b (n/N)
Target Not Detected	98,5 % (134/136) (94,8 %, 99,6 %)	89,6 % (294/328) (85,9 %, 92,5 %)
LLoQ ^a (2,0 log ₁₀ IE/ml)	98,0 % (197/201) (95,0 %, 99,2 %)	60,8 % (160/263) (54,8 %, 66,5 %)
3,0 log ₁₀ IE/ml	100,0 % (363/363) (99,0 %, 100,0 %)	64,4 % (65/101) (54,6 %, 73,0 %)
4,0 log ₁₀ IE/ml	100,0 % (431/431) (99,1 %, 100,0 %)	84,8 % (28/33) (69,1 %, 93,3 %)

^a LLoQ = untere Quantifizierungsgrenze des Vergleichs-EBV-LDT (100 IE/ml).

^b KI = Konfidenzintervall.

Von allen mit dem **cobas®** EBV-Test getesteten Proben, die im Vergleichs-EBV-Test EBV-positiv waren, waren insgesamt 158 (139 unverdünnte oder verdünnte klinische Proben von 28 Transplantatempfängern sowie 19 künstlich hergestellte Proben) für die Korrelationsanalyse an den drei Testzentren auswertbar.

Abbildung 6 Korrelation zwischen dem **cobas®** EBV-Test und dem Vergleichs-EBV-LDT für alle Proben: Diagramm der linearen Deming-Regression der DNA-Konzentration (log₁₀ IE/ml)



Eine zusätzlich durchgeführte Diagrammanalyse zu Abweichungen bei der DNA-Konzentration zeigte eine systematische Abweichung zwischen den beiden Tests, die für den gesamten überlappenden linearen Bereich konstant ist. Das 95-%-KI für den Achsenabschnitt der angelegten Gerade in den analysierten Diagrammen lag bei $-0,456$ bis $0,104$ und damit im Bereich von $\pm 0,6$ log₁₀ IE/ml (± 2 -mal die Standardabweichung für die analytische Präzision des Vergleichs-EBV-LDT).

Des Weiteren wurde eine mittlere systematische Abweichung von $-0,364 \log_{10}$ IE/ml ermittelt, und die systematische Abweichung zwischen den beiden Tests betrug $0,352 \log_{10}$ IE/ml und $-0,376 \log_{10}$ IE/ml für Proben mit einer DNA-Konzentration von 3 bzw. 4 \log_{10} IE/ml.

Weitere Informationen

Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests

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

* Für die cobas® omni Sekundärröhrchen wurde ein Totvolumen von 150 μ l ermittelt. Andere Teströhrchen können unterschiedliche Totvolumina aufweisen und mehr oder weniger Mindestvolumen erfordern. Für weitere Informationen wenden Sie sich an den zuständigen Servicemitarbeiter von Roche Diagnostics.

Symbole

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

Tabelle 24 Symbole zur Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten

 Alter oder Geburtsdatum	 Produkt nicht für eine patientennahe Testung geeignet	 Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Internationalen Einheiten pro PCR-Reaktion
 Zusatz-Software	 Produkt nicht für Selbsttests geeignet	 Seriennummer
 Sollbereich (Kopien/mL)	 Vertrieb <i>(Hinweis: ggf. Angabe von Land/Region unter dem Symbol)</i>	 Zentrum, Labor
 Sollbereich (IE/mL)	 Nicht wiederverwenden	 Standardverfahren
 Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft	 Frauen, weiblich	 Mit Ethylenoxid sterilisiert
 Barcode-Datenblatt	 Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung	 Im Dunkeln lagern
 Chargenbezeichnung	 Globale Artikelnummer GTIN	 Temperaturbegrenzung
 Biogefährdung	 Import	 Testdefinitionsdatei
 Bestellnummer	 <i>In-vitro</i> -Diagnostikum	 Diese Seite oben
 CE-Kennzeichnung für Konformität; dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für <i>In-vitro</i> -Diagnostika.	 Unterer Grenzwert des Sollbereichs	 Ultrasensitives Verfahren
 Entnahmedatum	 Männer, männlich	 Einmalige Produktkennung
 Gebrauchsanweisung beachten	 Hersteller	 Oberer Grenzwert des Sollbereichs
 Ausreichend für <n> Tests	 Negativkontrolle	 Fülllinie für Urin
 Inhalt des Kits	 Nicht steril	 Für die USA: Vorsicht: In den USA darf dieses Produkt nach den gesetzlichen Vorschriften nur durch einen Arzt oder auf ärztliche Verschreibung abgegeben werden.
 Kontrolle	 Patientenname	 Verwendbar bis
 Herstellungsdatum	 Patienten-ID	
 Produkt für patientennahe Tests	 Hier abziehen	
 Produkt zur Eigenanwendung	 Positivkontrolle	
	 Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Kopien pro PCR-Reaktion.	

Technischer Support

Für technischen Support wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Hersteller und Importeur

Tabelle 25 Hersteller und Importeur



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

Hergestellt in den USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marken und Patente

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

Copyright

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Literatur

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:453-5. PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. PMID: 23464993.
3. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343:481-92. PMID: 10944566.
4. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica*. 2016;101:803-11. PMID: 27365460.
5. Allen UD, Preiksaitis JK. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:107-20. PMID: 23465004.
6. San-Juan R, Comoli P, Caillard S, et al. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 7:109-18. PMID: 24475976.
7. Nijland ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, Ten Berge IJ. Epstein-Barr virus-positive posttransplant lymphoproliferative disease after solid organ transplantation: Pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Transplant Direct*. 2016;2:e48. PMID: 27500242.
8. Tsai DE, Douglas L, Andreadis C, et al. EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: Results of a two-arm prospective trial. *Am J Transplant*. 2008;8:1016-24. PMID: 18312608.
9. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, Minor PD. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals*. 2016;44:423-33. PMID: 27461128.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. 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 Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline, 4th ed. CLSI Document M29-A4. Wayne, PA: CLSI, 2014.
17. Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000496. PMID: 19578433.

Dokumentversion

Dokumentversionsübersicht	
Doc Rev. 4.0 12/2024	<p>Für die cobas® 6800/8800 Systeme wurden Informationen zur Systemsoftware Version 2.0 hinzugefügt.</p> <p>Der NIBSC-Code 09/260 für den internationalen WHO-Standard wurde hinzugefügt.</p> <p>Die Beispiele für Ergebnisse, die auf den cobas® 6800/8800 Systemen mit Softwareversion 1.4 angezeigt werden, wurden aktualisiert.</p> <p>Die Bestellnummern der Verbrauchsmaterialien wurden entfernt. Es wird nun auf die Benutzerunterstützung der cobas® 5800 und cobas® 6800/8800 Systeme für detaillierte Informationen zu Verbrauchsmaterialien verwiesen.</p> <p>Das Symbol „Rx Only“ wurde von der Titelseite entfernt.</p> <p>Die Symbolbezeichnungen auf der Symbolseite wurden im Zuge der Harmonisierung aktualisiert.</p> <p>Bei Fragen wenden Sie sich bitte an den Kundendienst von Roche Diagnostics vor Ort.</p>

Unter dem folgenden Link finden Sie eine Zusammenfassung des Berichts zu Sicherheit und Leistung:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>