

cobas[®] BKV

Количественный тест для определения нуклеиновых кислот в системах cobas[®] 5800/6800/8800

Для диагностики *in vitro*

cobas[®] BKV

P/N: 09040960190

Для использования в системе cobas[®] 5800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Для использования в системах cobas[®] 6800/8800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 08688214190 или
P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 или
P/N: 09051953190

Содержание

Назначение	5
Описание теста	5
Реагенты и материалы	9
Реагенты и контроли теста cobas® BKV	9
Реагенты cobas® omni для пробоподготовки	12
Хранение реагентов и правила работы с ними	13
Требования к условиям использования реагентов для системы cobas® 5800	13
Требования к условиям использования реагентов для систем cobas® 6800/8800	14
Дополнительные необходимые материалы для системы cobas® 5800	15
Дополнительные необходимые материалы для систем cobas® 6800/8800	16
Необходимое оборудование и программное обеспечение	17
Меры предосторожности и правила работы	18
Меры предосторожности	18
Обращение с реагентами	19
Надлежащая лабораторная практика	19
Сбор, транспортировка и хранение образцов	20
Образцы плазмы с ЭДТА	20
Образцы мочи	21
Инструкция по работе с набором	23
Рекомендации по процедуре	23
Постановка теста cobas® BKV в системе cobas® 5800	23
Постановка теста cobas® BKV в системах cobas® 6800/8800	25
Результаты	26
Контроль качества и валидность результатов в системе cobas® 5800	26
Результаты тестирования контролей в системе cobas® 5800	26

Контроль качества и валидность результатов в системах cobas® 6800/8800	27
Флаги контролей в системах cobas® 6800/8800	27
Интерпретация результатов	28
Интерпретация результатов в системе cobas® 5800	28
Интерпретация результатов в системах cobas® 6800/8800	29
Ограничения процедуры	29

Доклинические испытания теста 31

Основные рабочие характеристики для образцов плазмы с ЭДТА, определяемые в системах cobas® 6800/8800	31
Предел обнаружения (LoD): Международный стандарт ВОЗ	31
Линейный диапазон	32
Внутрилабораторная воспроизводимость	33
Верификация субтипов	34
Специфичность	34
Аналитическая специфичность	35
Аналитическая специфичность: интерферирующие вещества	36
Корреляция методов	36
Системные ошибки	37
Перекрестная контаминация	37
Основные рабочие характеристики для образцов стабилизированной мочи, определяемые в системах cobas® 6800/8800	38
Предел обнаружения (LoD): Международный стандарт ВОЗ	38
Линейный диапазон	40
Внутрилабораторная воспроизводимость	40
Верификация субтипов	41
Специфичность	42
Аналитическая специфичность	42
Аналитическая специфичность: интерферирующие вещества	43
Корреляция методов	45
Перекрестная контаминация	45

Клинические испытания теста в системах cobas® 6800/8800..... 46

Воспроизводимость теста cobas® BKV для образцов плазмы с ЭДТА..... 46

Испытание теста cobas® BKV для образцов плазмы с ЭДТА 47

Воспроизводимость теста cobas® BKV для образцов стабилизированной мочи 49

Испытание теста cobas® BKV для образцов стабилизированной мочи 51

Эквивалентность/сравнение систем 53

Дополнительная информация..... 54

Основные характеристики теста 54

Условные обозначения 55

Техническая поддержка..... 56

Производитель и импортёр..... 56

Товарные знаки и патенты..... 56

Авторское право 56

Литература 57

Редакция документа 58

Назначение

Тест **cobas® BКV** предназначен для количественного определения ДНК вируса ВК (BKV) в образцах плазмы человека с ЭДТА и мочи, стабилизированной в **cobas® PCR Media**, методом амплификации нуклеиновых кислот *in vitro*.

При использовании образцов плазмы с ЭДТА тест **cobas® BКV** предназначен для применения в качестве вспомогательного средства для диагностики и ведения BКV-инфекции у пациентов, перенесших трансплантацию. У пациентов, которые проходят мониторинг BКV-инфекции, для выявления потребности в потенциальных изменениях схемы лечения и определения ответа на противовирусную терапию могут применяться серийные измерения концентрации ДНК в образцах плазмы с ЭДТА.

При использовании образцов мочи, стабилизированной в **cobas® PCR Media**, тест **cobas® BКV** предназначен для применения в качестве вспомогательного средства для диагностики и ведения BКV-инфекции у пациентов, перенесших трансплантацию.

Результаты теста **cobas® BКV** необходимо интерпретировать в контексте всех клинических и лабораторных данных.

Тест **cobas® BКV** не предназначен для применения в качестве скринингового теста для крови или ее продуктов.

Описание теста

Введение

У реципиентов трансплантатов повышен риск многих вирусных и бактериальных инфекций, которые с большей вероятностью могут вызвать серьезные нежелательные последствия для здоровья в популяции пациентов, перенесших трансплантацию, по сравнению с общей здоровой популяцией. Этот повышенный риск отчасти объясняется снижением функции иммунной системы вследствие применения иммуносупрессивных препаратов, которые пациенты после трансплантации получают с целью уменьшения вероятности отторжения трансплантата ^{1,2}.

Вирус ВК (BKV) представляет собой небольшой (~ 5 кб) безоболочечный вирус, содержащий дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), который принадлежит к семейству полиомавирусов. Существуют четыре основных субтипа BКV, из которых наиболее часто выявляется подтип I (80 %), и за ним следует подтип IV (15 %).³ Серопревалентность BКV составляет > 80 % в общей популяции здоровых взрослых ⁴. У иммунокомпетентных лиц BКV не связан со значительной патологией. Тем не менее, BКV-инфекция может вызвать заболевание с тяжелыми клиническими проявлениями у людей с ослабленным иммунитетом, включая реципиентов трансплантатов ⁵.

BKV-инфекции чаще всего поражают почки и мочевыводящие пути. После первичной инфекции вирус остается латентным в эпителии почечных канальцев и мочеточника и может активизироваться повторно у людей с ослабленным иммунитетом. Пациенты после трансплантации почек, по сравнению с реципиентами других типов трансплантатов, подвергаются более высокому риску осложнений, связанных с BКV, включая нефропатию, вызванную полиомавирусом (PVN), и стеноз мочеточника. Доля реципиентов почечных трансплантатов, у которых встречается PVN, достигает 10 %. Примерно у 50 % пациентов с PVN возникает отторжение трансплантата. Кроме того, приблизительно у 3 % реципиентов почечных трансплантатов развивается стеноз

мочеточника, связанный с BKV⁵. Трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) также чаще сопровождаются осложнениями, связанными с BKV, в большинстве случаев в форме геморрагического цистита (ГЦ). ГЦ развивается у 5–15 % пациентов после ТГСК¹.

В руководствах рекомендуется проводить регулярный мониторинг BKV-инфекции у пациентов с трансплантацией почки в течение 5 лет после операции.⁶ Такой подход позволяет выявить 80–90 % пациентов с риском развития PVN. Тестирование плазмы на наличие BKV-виремии рекомендуется проводить в рамках стратегии по выявлению пациентов с повышенным риском развития PVN либо в качестве подтверждающего теста для пациентов, у которых обнаружена BKV-вирурия, либо в качестве основного метода тестирования для стандартного скрининга⁶. В настоящее время отсутствуют рекомендации касательно стандартного мониторинга BKV-инфекции у пациентов, которые проходят ТГСК, и тестирование рекомендуется в первую очередь для оценки пациентов с гематурией и клиническими симптомами цистита. Однако уровень ДНК BKV, превышающий 10 000 копий/мл, связан с более высоким риском ГЦ у пациентов после трансплантации⁷.

Для пациентов после трансплантации почек, у которых наблюдается персистирующее повышение уровней ДНК BKV в плазме, обычно определяемое как значение выше 10 000 копий/мл, рекомендуется выполнять тестирование плазмы на наличие BKV каждые 1–2 недели, пока уровень ДНК не вернется к неопределяемому при двух последовательных измерениях.

Многие лабораторные количественные тесты на BKV не стандартизированы, что приводит к высокой вариабельности результатов между лабораториями и тестами^{6,7}. Кроме того, компоненты мочи могут вызывать агрегацию BKV, что также может влиять на вариабельность результатов количественного измерения^{8,9}. Формальная оценка воспроизводимости и валидности уровней ДНК BKV имеет решающее значение для обеспечения стабильных результатов (независимо от того, в какой лаборатории проводился анализ) в целях клинического ведения пациентов с заболеваниями, связанными с BKV.

Хотя точный порог обнаружения вируса, значимый с медицинской точки зрения, все еще является предметом дискуссий из-за вариабельности результатов между тестами, концепция критического порога представляется обоснованной и была обозначена в исследованиях естественного течения заболевания, показывающих, что более высокие уровни ДНК BKV коррелируют с повышенным риском развития PVN и ГЦ^{6,7}.

Обоснование тестирования нуклеиновых кислот (NAT)

Серологическое тестирование для обнаружения полиомавируса обычно не используется в клинических условиях; оно имеет значение только для определения того, был ли пациент ранее инфицирован BKV и подвержен ли риску реактивации вируса. Для получения результатов культуральных методов определения вируса требуется много времени, и поскольку они полуколичественные, то имеют ограниченное применение у пациентов с ослабленным иммунитетом, у которых часто обнаруживаются низкие уровни вируса. Прямое обнаружение ДНК BKV методом ПЦР в реальном времени обладает чрезвычайно широким динамическим диапазоном, воспроизводимостью, оптимальной чувствительностью и специфичностью для использования у пациентов, которые проходят трансплантацию.

Принципы теста

Тест **cobas® BKV** — это количественный тест, проводимый в системах **cobas® 5800/6800/8800**. Тест **cobas® BKV** позволяет осуществлять детекцию и количественное определение ДНК ВКВ в плазме с ЭДТА и моче, стабилизированной в **cobas® PCR Media**, от инфицированных пациентов. Количественное определение уровня ДНК ВКВ проводится относительно количественного стандарта ДНК (DNA-QS), не являющейся ДНК ВКВ, который вносится в каждый образец во время пробоподготовки. DNA-QS также используется как внутренний контроль для мониторинга всего процесса пробоподготовки и амплификации в ПЦР. Также в тесте применяются три внешних контроля: положительный высокотитражный, положительный низкотитражный и отрицательный. Положительный высокотитражный и положительный низкотитражный контроли получены путем разведения исходных материалов с концентрацией, прослеживаемой до международного стандарта ВОЗ для ВКВ. Каждый лот набора для амплификации/детекции калибруется относительно международного стандарта ВОЗ для ВКВ.

Процедуры, лежащие в основе теста

Тест **cobas® BKV** основан на полностью автоматизированной пробоподготовке (выделении и очистке нуклеиновых кислот) с последующей амплификацией в ПЦР и детекцией. Система **cobas® 5800** представляет собой один интегрированный прибор. Системы **cobas® 6800/8800** состоят из модуля подачи образцов, модуля переноса, модуля обработки и аналитического модуля. Автоматизированное управление данными осуществляется в программе системы **cobas® 5800** или **cobas® 6800/8800**, которая присваивает всем тестам следующие результаты: мишень не обнаружена, ДНК ВКВ обнаружена на уровне $< \text{LLOQ}$ (нижний предел количественного определения), ДНК ВКВ обнаружена на уровне $> \text{ULOQ}$ (верхний предел количественного определения) или указывает значение концентрации, которое находится в линейном диапазоне $\text{LLOQ} < x < \text{ULOQ}$. Результаты можно просматривать непосредственно на экране системы, экспортировать и распечатывать в виде отчета.

Нуклеиновые кислоты образца и вносимых в него молекул лямбды DNA-QS выделяются одновременно. Вирусные нуклеиновые кислоты освобождаются в результате внесения в образец протеазы и лизирующего реагента. Освободившаяся нуклеиновая кислота связывается с кремниевой поверхностью внесенных в образец магнитных стеклочастиц. Несвязавшиеся вещества и примеси, например денатурировавшие белки, клеточный дебрис, потенциальные ингибиторы ПЦР, удаляются на последующих этапах с помощью промывочного реагента, и очищенная нуклеиновая кислота элюируется со стеклочастиц буфером для элюции при повышенной температуре.

Избирательная амплификация нуклеиновой кислоты-мишени из образца достигается путем использования специфичной к вирусу двойной мишени из высококонсервативных участков генома ВКВ, расположенных в участках малого t-антигена ВКВ и VP2 ВКВ. Избирательная амплификация DNA-QS достигается путем использования аллель-специфичных прямого и обратного праймеров, подобранных с учетом отсутствия гомологии с геномом ВКВ. Термостабильный фермент ДНК-полимераза используется для амплификации. Последовательности-мишени и последовательности DNA-QS амплифицируются одновременно в ПЦР с единым профилем с заданными температурными этапами и числом циклов. В состав мастермикса входит трифосфат дезоксиуридина (dUTP) вместо трифосфата дезокситимидина (dTTP), который встраивается во вновь синтезируемые цепи ДНК (ампликон) ¹⁰⁻¹². Любые контаминирующие ампликоны из предыдущих постановок ПЦР разрушаются ферментом AmpErase, входящим в состав ПЦР-смеси, во время нагревания на первом этапе термоциклирования. Однако вновь синтезируемые ампликоны не элиминируются, поскольку фермент AmpErase инактивируется при нагревании выше 55 °C.

Мастермикс теста **cobas® BKV** содержит два зонда для детекции последовательностей-мишеней BКV и один зонд для детекции DNA-QS. Каждый зонд мечен мишень-специфичным флуоресцентным репортерным красителем, что позволяет проводить одновременную детекцию мишени BКV и DNA-QS по двум разным целевым каналам ^{13, 14}. Флуоресцентный сигнал интактного зонда подавляется гасителем. Во время этапа амплификации ПЦР зонды гибридизуются со специфичными матрицами одноцепочечной ДНК и разрушаются вследствие 5'-3'-нуклеазной активности ДНК-полимеразы. Это приводит к разделению репортерного и гасящего красителя и генерированию флуоресцентного сигнала. На каждом цикле ПЦР увеличивается количество разрушенных зондов и происходит кумулятивный рост сигнала от репортерного красителя. Детекция в режиме реального времени и дифференциация продуктов ПЦР происходит благодаря измерению флуоресцентного сигнала от репортерных красителей вирусной мишени и DNA-QS.

Реагенты и материалы

Реагенты и контроли теста cobas® BKV

Материалы, предоставляемые для теста cobas® BKV, перечислены в Табл. 1. Необходимые, но не предоставляемые материалы перечислены в Табл. 2 – Табл. 4 и в Табл. 8 – Табл. 10.

Информация о безопасном применении продукта представлена в разделе **Реагенты и материалы** и разделе **Меры предосторожности и правила работы с реагентами**.

Табл. 1 cobas® BKV

cobas® BKV

Хранить при температуре 2–8 °C

Кассета на 192 теста (P/N 09040960190)

Компоненты набора	Состав реагента	Количество в наборе 192 тестов
Раствор протеазы (PASE)	Трис буфер, < 0,05 % ЭДТА, хлорид кальция, ацетат кальция, 8 % протеиназа, глицерин EUN210: Паспорт безопасности предоставляется по запросу. EUN208: Содержит субтилизин, полученный из бактерий <i>Bacillus subtilis</i> . Может вызывать аллергическую реакцию.	22,3 мл
Количественный стандарт ДНК (DNA QS)	Трис буфер, < 0,05 % ЭДТА, < 0,001 % не относящийся к BKV конструкт ДНК, содержащий не относящиеся к BKV сайты посадки праймеров и уникального зонда (неинфекционная ДНК), < 0,002 % поли гА РНК (синтетическая), < 0,1 % азид натрия	21,2 мл
Буфер для элюции (EB)	Трис буфер, 0,2 % метил-4-гидроксibenзоат	21,2 мл
Мастермикс реагент 1 (MMX-R1)	Ацетат марганца, гидроксид калия, < 0,1 % азид натрия	7,5 мл
BKV мастермикс реагент 2 (BKV MMX-R2)	Трициновый буфер, ацетат калия, глицерин, < 18 % диметилсульфоксид, глицерин, < 0,1 % Tween 20, ЭДТА, < 0,12 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01 % прямые и обратные праймеры для BKV, < 0,01 % прямые и обратные праймеры для количественного стандарта, < 0,01 % меченные флуоресцентным красителем олигонуклеотидные зонды для BKV и количественного стандарта BKV, < 0,01 % олигонуклеотидный аптамер, < 0,01 % Z05D ДНК-полимераза, < 0,10 % фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальный), < 0,1 % азид натрия	9,7 мл

Табл. 2 Набор контролей cobas® EBV/BKV Control Kit**cobas® EBV/BKV Control Kit**

Хранить при 2–8 °C

Для использования в системе cobas® 5800 (P/N 09040951190)

Для использования в системах cobas® 6800/8800 (P/N 08688214190 или P/N 09040951190)

Компоненты набора	Состав реагента	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения *
Низкотитражный положительный контроль EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001 % синтетическая (плазмидная) ДНК BKV в оболочечном белке бактериофага Лямбда, нормальная плазма человека, негативная по ДНК BKV при тестировании методом ПЦР 0,1 % консервант ProClin® 300 **	4 мл (8 × 0,5 мл)	  ВНИМАНИЕ H317: При контакте с кожей может вызывать аллергическую реакцию. H412: Вредно для водной флоры и фауны с долгосрочными последствиями. P261: Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/аэрозолей. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P280: Использовать защитные перчатки. P333 + P313: При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться за медицинской помощью. P362 + P364: Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед использованием. P501: Утилизировать содержимое/контейнер в специализированном центре. 55965-84-9 Реакционная масса: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он (3:1).
Высокотитражный положительный контроль EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001 % синтетическая (плазмидная) ДНК BKV в оболочечном белке бактериофага Лямбда, нормальная плазма человека, негативная по ДНК BKV при тестировании методом ПЦР 0,1 % консервант ProClin® 300 **	4 мл (8 × 0,5 мл)	  ВНИМАНИЕ H317: При контакте с кожей может вызывать аллергическую реакцию. H412: Вредно для водной флоры и фауны с долгосрочными последствиями. P261: Избегать вдыхания пыли/дыма/газа/тумана/паров/аэрозолей. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P280: Использовать защитные перчатки. P333 + P313: При раздражении кожи или появлении сыпи: обратиться за медицинской помощью. P362 + P364: Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед использованием. P501: Утилизировать содержимое/контейнер в специализированном центре. 55965-84-9 Реакционная масса: 5-хлоро-2-метил-4-изотиазолин-3-он и 2-метил-2Н-изотиазол-3-он (3:1).

* Маркировка безопасности продукта соответствует рекомендациям EU GHS.

** Опасное для здоровья вещество или смесь.

09478124001-03RU

Doc Rev. 3.0

Табл. 3 Набор буферной отрицательной контроли **cobas®** Buffer Negative Control Kit**cobas® Buffer Negative Control Kit**

Хранить при 2–8 °C

Для использования в системе **cobas®** 5800 (P/N 09051953190)Для использования в системах **cobas®** 6800/8800 (P/N 07002238190 или P/N 09051953190)

Компоненты набора	Состав реагента	Количество в наборе
Буферный отрицательный контроль cobas® (BUF (-) C)	Трис буфер, < 0,1 % азид натрия, ЭДТА, 0,002 % поли гА РНК (синтетическая)	16 мл (16 × 1 мл)

Реагенты cobas® omni для пробоподготовки

Табл. 4 Реагенты cobas® omni для пробоподготовки

Реагенты	Состав реагента	Количество в наборе	Маркировка безопасности и предупреждения *
Реагент cobas® omni MGP Reagent (MGP) Хранить при 2–8 °C (P/N 06997546190)	Магнитные стеклочастицы, трис буфер, 0,1 % метил-4-гидроксibenзоат, < 0,1 % азид натрия	480 тестов	Неприменимо
Дилуент для образцов cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Хранить при 2–8 °C (P/N 06997511190)	Трис буфер, 0,1 % метил-4-гидроксibenзоат, < 0,1 % азид натрия	4 × 875 мл	Неприменимо
Лизирующий реагент cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Хранить при 2–8 °C (P/N 06997538190)	43 % (м/м) гуанидин тиоцианат **, 5 % (м/о) полидоканол **, 2 % (м/о) дитиотреитол **, дигидрат цитрата натрия EUN032: При контакте с кислотой выделяет особо токсичный газ.	4 × 875 мл	 ОПАСНО H302 + H332: Вредно при проглатывании или вдыхании. H314: вызывает серьезные ожоги и повреждения глаз. H411: Токсично для водных организмов с долгосрочными последствиями. P273: Избегать попадания в окружающую среду. P280: Использовать перчатки, спецодежду и средства для защиты глаз/лица. P303 + P361 + P353: ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или волосы): немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой. P304 + P340 + P310: ПРИ ВДЫХАНИИ: вынести пострадавшего на свежий воздух и обеспечить ему полный покой в удобном для дыхания положении. Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу-специалисту. P305 + P351 + P338 + P310: ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если вы пользуетесь ими и если это легко сделать. Продолжить промывание глаз. Немедленно обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу-специалисту. P391: Ликвидировать просыпания/проливы/утечки. 593-84-0 Гуанидин тиоцианат 9002-92-0 Полидоканол 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-димеркаптобутан-2,3-диол
Промывочный реагент cobas® omni Wash Reagent (WASH) Хранить при 15–30 °C (P/N 06997503190)	Дигидрат цитрата натрия, 0,1 % метил-4-гидроксibenзоат	4,2 л	Неприменимо

* Маркировка безопасности продукта соответствует рекомендациям EU GHS.

** Опасное для здоровья вещество или смесь.

Хранение реагентов и правила работы с ними

Условия хранения реагентов и работы с ними приведены в Табл. 5, Табл. 6 и Табл. 7.

Когда реагенты не загружены в систему cobas® 5800 или cobas® 6800/8800, они должны храниться при температурах, указанных в Табл. 5.

Табл. 5 Хранение реагентов (когда реагенты не загружены в систему)

Реагент	Температура хранения
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

Требования к условиям использования реагентов для системы cobas® 5800

Когда реагенты загружены в систему cobas® 5800, они хранятся при необходимых температурах и их сроки годности отслеживаются системой. Система допускает использование реагентов, только если они соответствуют всем условиям, приведенным в Табл. 6. Система автоматически блокирует использование реагентов с истекшим сроком годности. Табл. 6 содержит сведения об условиях использования реагентов в соответствии с требованиями системы cobas® 5800.

Табл. 6 Требования системы cobas® 5800 к срокам хранения реагентов

Реагент	Срок годности набора	Стабильность открытого набора	Число постановок, для которых может использоваться набор	Стабильность на борту
cobas® BKV	Не истек	90 дней после первого использования	Максимум 40 постановок	Максимум 36 дней **
cobas® EBV/BKV Control Kit	Не истек	Неприменимо *	Неприменимо	Максимум 36 дней **
cobas® Buffer Negative Control Kit	Не истек	Неприменимо *	Неприменимо	Максимум 36 дней **
cobas® omni Lysis Reagent	Не истек	30 дней после загрузки **	Неприменимо	Неприменимо
cobas® omni MGP Reagent	Не истек	30 дней после загрузки **	Неприменимо	Неприменимо
cobas® omni Specimen Diluent	Не истек	30 дней после загрузки **	Неприменимо	Неприменимо
cobas® omni Wash Reagent	Не истек	30 дней после загрузки **	Неприменимо	Неприменимо

* Реагенты для однократного применения.

** Время определяется после первой загрузки реагента в систему cobas® 5800.

Требования к условиям использования реагентов для систем cobas® 6800/8800

Когда реагенты загружены в системы cobas® 6800/8800, они хранятся при необходимых температурах и их сроки годности отслеживаются системой. Системы cobas® 6800/8800 допускают использование реагентов, только если они соответствуют всем условиям, приведенным в Табл. 7. Система автоматически блокирует использование реагентов с истекшим сроком годности. Табл. 7 содержит сведения об условиях использования реагентов в соответствии с требованиями систем cobas® 6800/8800.

Табл. 7 Требования систем cobas® 6800/8800 к срокам хранения реагентов

Реагент	Срок годности набора	Стабильность открытого набора	Число постановок, для которых может использоваться набор	Стабильность после загрузки (общее время в системе, вне холодильника)
cobas® BKV	Не истек	90 дней после первого использования	Максимум 40 постановок	Максимум 40 часов
cobas® EBV/BKV Control Kit	Не истек	Неприменимо *	Неприменимо	Максимум 8 часов
cobas® Buffer Negative Control Kit	Не истек	Неприменимо *	Неприменимо	Максимум 10 часов
cobas® omni Lysis Reagent	Не истек	30 дней после загрузки **	Неприменимо	Неприменимо
cobas® omni MGP Reagent	Не истек	30 дней после загрузки **	Неприменимо	Неприменимо
cobas® omni Specimen Diluent	Не истек	30 дней после загрузки **	Неприменимо	Неприменимо
cobas® omni Wash Reagent	Не истек	30 дней после загрузки **	Неприменимо	Неприменимо

* Реагенты для однократного применения.

** Время определяется после первой загрузки реагента в системы cobas® 6800/8800.

Дополнительные необходимые материалы для системы cobas® 5800

Табл. 8 Реагенты и расходные материалы для работы с системой cobas® 5800

Материал	P/N
Планшет для обработки образцов cobas® omni 24	08413975001
Амплификационный планшет cobas® omni 24	08499853001
Планшет для жидких отходов cobas® omni 24	08413983001
Наконечники CORE TIPS с фильтром, 1 мл	04639642001
Наконечники CORE TIPS с фильтром, 300 мкл	07345607001
Контейнер для жидких отходов cobas® omni	07094388001
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190
Пакет для твердых отходов или Пакет для твердых отходов с вставкой	07435967001 или 08030073001
Вторичные пробирки cobas® omni 13 × 75 (опционально)	06438776001
Набор вторичных пробирок cobas® PCR Media Secondary Tube Kit *	07958048190
Набор сменных колпачков для пробирок cobas® PCR Media	07958056190
Штатив для одноразовых пробирок cobas® PCR Media (опционально)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050 — светло-зеленый 16 мм штатив MPA *, **	03143449001
RD5 RACK 0001-0050 LR — стандартный штатив RD *, **	11902997001
Штатив для пробирок на 16 позиций *	09224319001
Штатив на 5 позиций *	09224475001

* Обратитесь в ваше региональное представительство Roche за подробным списком доступных для заказа штативов для образцов.

** Штатив MPA 16 мм или штатив для пробирок на 16 позиций являются предпочтительными штативами для использования с образцами, собранными в пробирки cobas® PCR Media.

Дополнительные необходимые материалы для систем cobas® 6800/8800

Табл. 9 Реагенты и расходные материалы для работы с системами cobas® 6800/8800

Материал	P/N
Планшет для обработки образцов cobas® omni	05534917001
Амплификационный планшет cobas® omni	05534941001
Наконечники cobas® omni	05534925001
Контейнер для жидких отходов cobas® omni	07094388001
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190
Пакет для твердых отходов и контейнер для твердых отходов или Пакет для твердых отходов с вставкой и выдвижным контейнером для твердых отходов	07435967001 и 07094361001 или 08030073001 и 08387281001
Вторичные пробирки cobas® omni 13 × 75 (опционально)	06438776001
Набор вторичных пробирок cobas® PCR Media Secondary Tube Kit *	07958048190
Набор сменных колпачков для пробирок cobas® PCR Media	07958056190
Штатив для одноразовых пробирок cobas® PCR Media (опционально)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050 — светло-зеленый 16 мм штатив MPA *,**	03143449001

* Обратитесь в ваше региональное представительство Roche за подробным списком штативов для образцов, штативов для засоренных наконечников и лотков для штативов, подходящих приборам.

** Штатив MPA 16 мм является предпочтительным штативом для использования с образцами, собранными в пробирки cobas® PCR Media.

Табл. 10 Наборы для сбора образцов мочи, используемые с cobas® BKV

Набор для сбора образцов	P/N
Набор cobas® PCR Urine Sample Kit	05170486190
Набор cobas® PCR Media Kit	06466281190

Примечание. Набор cobas® PCR Urine Sample Kit используется для сбора и транспортировки образцов мочи. Каждый набор cobas® PCR Urine Sample Kit содержит 100 пакетов cobas® PCR Urine Sample Packets. Каждый пакет содержит 1 одноразовую пипетку и 1 пробирку cobas® PCR Media с 4,3 мл cobas® PCR Media. Реагент cobas® PCR Media используется для стабилизации нуклеиновых кислот во время транспортировки и хранения образцов мочи.

Для образцов мочи, которые непосредственно отправляются в лабораторию без использования набора cobas® PCR Urine Sample Kit для сбора, в качестве альтернативы можно использовать набор cobas® PCR Media Kit, содержащий 100 пробирок cobas® PCR Media (без одноразовых пипеток), при том, что образцы мочи должны быть перенесены в течение 24 часов с момента сбора.

Необходимое оборудование и программное обеспечение

Программное обеспечение системы **cobas® 5800** и аналитический пакет **cobas® BVV** для системы **cobas® 5800** должны быть установлены на прибор **cobas® 5800**. Программное обеспечение для управления данными Data Manager и ПК для системы **cobas® 5800** поставляется вместе с системой.

Программа **cobas® 6800/8800** и аналитический пакет **cobas® BVV** должны быть установлены на приборе (приборах). Сервер Instrument Gateway (IG) поставляется вместе с системой.

Табл. 11 Приборы

Оборудование	P/N
Система cobas® 5800	08707464001
Система cobas® 6800 (опция — подвижная)	05524245001 и 06379672001
Система cobas® 6800 (фиксированная)	05524245001 и 06379664001
Система cobas® 8800	05412722001
Модуль подачи образцов	06301037001

См. дополнительную информацию в поддержке пользователя и (или) руководстве пользователя системы **cobas® 5800** или систем **cobas® 6800/8800**.

Примечание. Обратитесь в ваше региональное представительство Roche за подробным списком доступных для заказа первичных и вторичных пробирок для образцов, штативов для образцов, штативов для засоренных наконечников и лотков для штативов, подходящих приборам.

Допускается применение с тестом **cobas® BVV** первичных пробирок, используемых для образцов мочи, собранных в среду для ПЦР **cobas® PCR Media**.

Меры предосторожности и правила работы

Меры предосторожности

Как и при выполнении любых тестов, соблюдение правил надлежащей лабораторной практики является условием качественного выполнения данного теста. Вследствие высокой аналитической чувствительности теста необходимо тщательно оберегать от контаминации реагенты и амплификационные смеси.

- Только для диагностики *in vitro*.
- Тест **cobas® BKV** не валидирован для использования в качестве скринингового теста на наличие BКV в крови и ее продуктах.
- Все образцы нужно рассматривать как потенциально инфекционные и соблюдать при работе с ними правила биологической безопасности, приведенные в документах Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories и CLSI Document M29-A4^{15, 16}. Только персонал, обученный работе с инфекционными материалами, а также работе с тестом **cobas® BKV** и системами **cobas® 5800/6800/8800**, может выполнять данную процедуру.
- Все материалы человеческого происхождения должны рассматриваться как потенциально инфекционные, работать с ними нужно с соблюдением стандартных мер предосторожности. При разливе материалов немедленно проведите дезинфекцию свежеприготовленным 0,6%-м раствором гипохлорита натрия или калия в дистиллированной или деионизованной воде или следуйте стандартным инструкциям, принятым в вашей организации.
- Набор контролей **cobas® EBV/BKV Control Kit** содержит плазму, полученную из крови человека. Исходный материал тестировался методами ПЦР, при этом обнаруживались приемлемые признаки низких уровней ДНК BКV. Ни один из известных методов не может обеспечить полную гарантию отсутствия инфекционных агентов в продуктах крови человека.
- **Не замораживайте образцы цельной крови и мочи в первичных пробирках.**
- Для оптимального выполнения теста используйте только входящие в состав системы или рекомендованные для нее производителем расходные материалы.
- Паспорта безопасности материалов (SDS) доступны по запросу в вашем региональном представительстве компании Roche.
- Внимательно следуйте рекомендациям и инструкциям для корректного проведения теста. Любое отклонение от инструкции может повлиять на результаты теста.
- Ложноположительные результаты могут быть получены при отсутствии адекватного контроля перекрестных контаминаций образцов на этапах пробоподготовки.
- Реагент **cobas® PCR Media** (из первичных пробирок для сбора образцов) содержит гуанидин гидрохлорид. **Не допускайте прямого контакта гуанидина гидрохлорида с гипохлоритом натрия (хлорки) или другими высокореактивными реагентами, такими как кислоты или основания. Эти смеси могут выделять токсичный газ.** При разливе жидкости, содержащей гуанидин гидрохлорид, обработайте поверхность лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционный материал, **СНАЧАЛА** обработайте поверхность лабораторным моющим средством и водой, затем 0,6%-м раствором гипохлорита натрия или калия.
- О любых серьезных инцидентах, имевших место при работе с данным тестом, сообщайте в местный уполномоченный орган и производителю.

Обращение с реагентами

- Работайте со всеми реагентами, контролями и образцами в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики для предотвращения перекрестной контаминации образцов и контролей.
- Перед началом работы осмотрите все кассеты реагентов, дилуэнт, лизирующий реагент и промывочный реагент и убедитесь в отсутствии протекания. При наличии протекания не используйте данный материал для постановки теста.
- Лизирующий реагент **cobas® omni** Lysis Reagent содержит гуанидин тиоцианат — потенциально опасное вещество. Не допускайте попадания реагента на кожу, в глаза, на слизистые оболочки. В случае попадания немедленно смойте большим количеством воды; в противном случае может возникнуть ожог.
- Реагенты наборов **cobas® BKV**, реагент **cobas® omni** MGP Reagent и дилуэнт для образцов **cobas® omni** Specimen Diluent содержат в качестве консерванта азид натрия. Не допускайте попадания реагента на кожу, в глаза, на слизистые оболочки. В случае попадания немедленно смойте большим количеством воды; в противном случае может возникнуть ожог. При проливе этих реагентов промойте их водой и затем вытрите.
- Не допускайте контакта лизирующего реагента **cobas® omni** Lysis Reagent, содержащего гуанидин тиоцианат, с раствором гипохлорита натрия (хлорки). Данная смесь может выделять высокотоксичный газ.
- Утилизируйте все материалы, контактировавшие с образцами и реагентами, в соответствии с государственными, федеральными и региональными правилами.

Надлежащая лабораторная практика

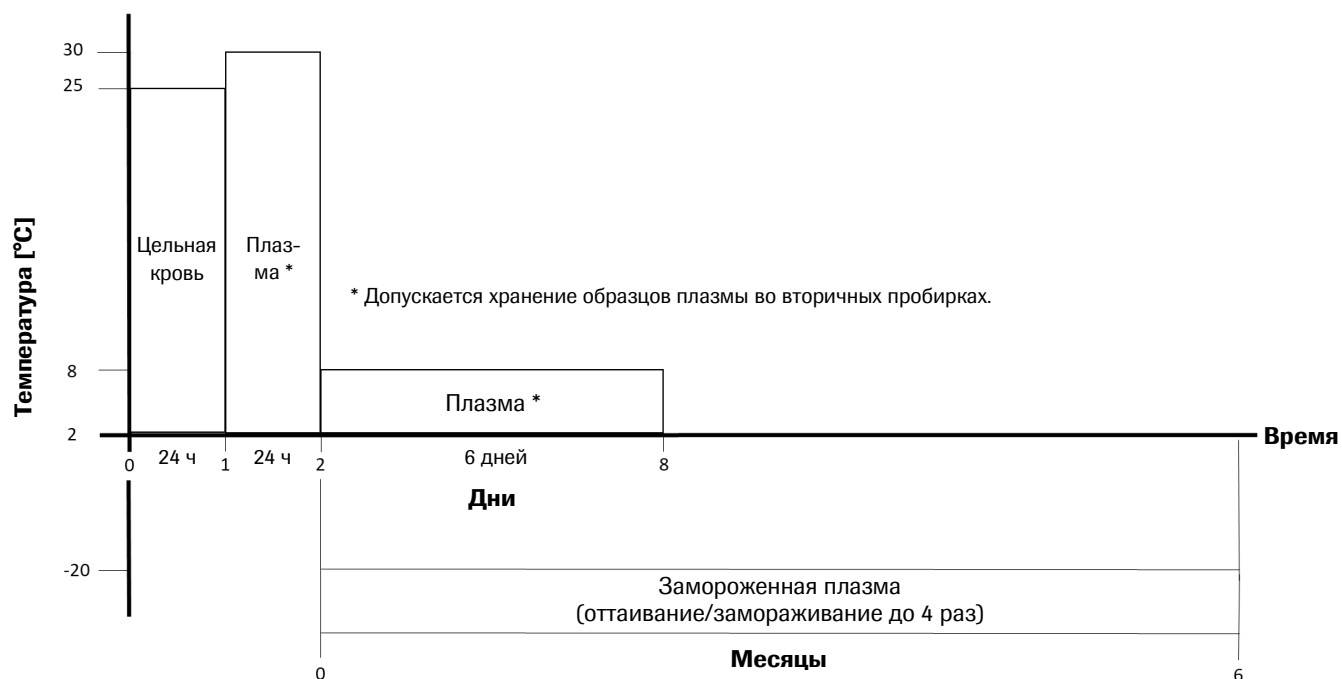
- Не пипетируйте ртом.
- Не ешьте, не пейте и не курите в рабочих лабораторных помещениях.
- Работайте со всеми реагентами и образцами в средствах для защиты глаз, лабораторном халате и одноразовых перчатках. Для предотвращения контаминаций меняйте перчатки после работы с образцами и наборами реагентов **cobas® BKV**, низкотитражным положительным контролем EBV/BKV Low Positive Control (EBV/BKV L(+))C), высокотитражным положительным контролем EBV/BKV High Positive Control (EBV/BKV H(+))C), наборами буферных отрицательных контролей **cobas® Buffer Negative Control Kit** и реагентами **cobas® omni**. Не допускайте контаминации перчаток при работе с образцами и контролями.
- Тщательно мойте руки после работы с образцами и компонентами набора и после снятия перчаток.
- Тщательно очищайте и дезинфицируйте все рабочие поверхности свежеприготовленным 0,6%-м раствором гипохлорита натрия или калия в дистиллированной или деионизованной воде, затем протирайте их 70%-м этанолом.
- При разлитии материала в приборе **cobas® 5800** или **cobas® 6800/8800** проведите очистку и дезинфекцию поверхности прибора(ов) в соответствии с инструкциями в поддержке пользователя и/или руководстве пользователя систем **cobas® 5800** или **cobas® 6800/8800**.

Сбор, транспортировка и хранение образцов

Примечание. Работайте со всеми образцами и контролями как с потенциально инфекционными материалами.

Образцы плазмы с ЭДТА

- Храните все образцы при рекомендованных температурах. Стабильность образцов снижается при повышенных температурах.
- При работе с замороженными образцами во вторичных пробирках поместите образцы в условия комнатной температуры (15–30 °C) до полного оттаивания, затем недолго перемешайте (например, на вортексе в течение 3–5 секунд) и осадите в центрифуге весь объем образца на дне пробирки.
- Цельная кровь должна быть собрана в пробирки для отделения плазмы BD Vacutainer® PPT™ для молекулярной диагностики или в стерильные пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Следуйте инструкциям производителя пробирок. См. Рис. 1.
- Образцы цельной крови, собранные в пробирки для отделения плазмы BD Vacutainer® PPT™ для молекулярной диагностики или в стерильные пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта, могут храниться и (или) транспортироваться до 24 часов при температуре 2–25 °C до отделения плазмы. Центрифугирование необходимо проводить в соответствии с инструкциями производителя.
- После отделения плазмы образцы могут храниться до 24 часов при температуре 2–30 °C в первичных или вторичных пробирках, после чего следует соблюдать следующие условия:
 - Хранение в первичных или вторичных пробирках до 6 дней при температуре 2–8 °C.
 - Хранение во вторичных пробирках до 6 месяцев при температуре ≤ –20 °C.
- Образцы плазмы стабильны до четырех циклов оттаивания/замораживания при хранении при температуре ≤ –20 °C.
- Если необходимо транспортировать образцы, они должны быть упакованы и маркированы в соответствии с правилами транспортировки образцов и инфекционных агентов, действующими в вашей стране, и (или) международными правилами.

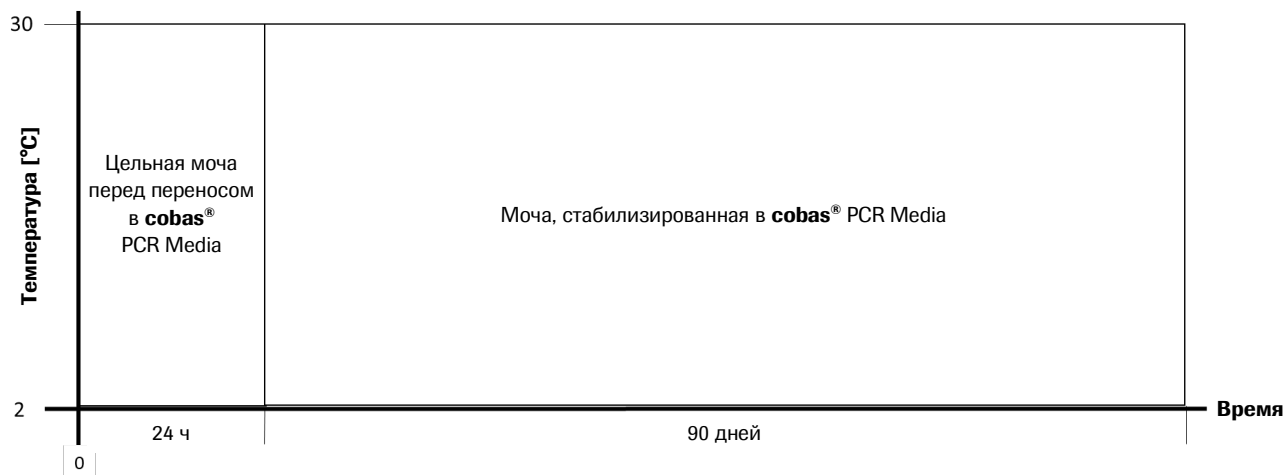
Рис. 1 Условия хранения образцов плазмы с ЭДТА

Образцы мочи

- В целях сбора и стабилизации образцов мочи для теста **cobas® BKV** используйте только набор **cobas® PCR Urine Sample Kit**. Тест **cobas® BKV** не был валидирован для использования с другими приспособлениями для сбора мочи или типами сред. Использование теста **cobas® BKV** с другими приспособлениями для сбора мочи или другими типами сред может привести к ложноотрицательным, ложноположительным и/или невалидным результатам.
- Образцы мочи должны быть сразу перенесены в пробирку **cobas® PCR Media** (стабилизированы). Если образцы не могут быть перенесены сразу, они могут храниться при температуре 2–30 °C до 24 часов. После стабилизации образцов мочи в среде **cobas® PCR Media** они могут храниться до 90 дней при температуре 2–30 °C. См. Рис. 2.
- Верхний уровень жидкости нетестированных образцов мочи должен находиться между двумя черными линиями в окне этикетки на пробирке **cobas® PCR Media**. Если уровень жидкости выше или ниже этих линий, образец не был собран надлежащим образом и не может быть использован для тестирования.
- Если для разведения в пробирке **cobas® PCR Urine Sample** недостаточно мочи (менее 4,3 мл), мочу можно развести вручную с помощью **cobas® PCR Media**. Перед тестированием с использованием теста **cobas® BKV** требуется не менее 0,5 мл чистой мочи, разведенной вручную в среде **cobas® PCR Media** (в соотношении 1:1).
- Чтобы избежать перекрестного загрязнения обработанных образцов, следует использовать дополнительные крышки для пробирок **cobas® PCR Media** другого цвета (нейтральные; см. **Необходимые дополнительные материалы**) для повторного закрытия образцов после теста.
- Если требуется дополнительное тестирование, убедитесь, что в пробирке **cobas® PCR Media** осталось не менее 1,2 мл образца.

- Если необходимо транспортировать образцы, они должны быть упакованы и маркированы в соответствии с правилами транспортировки образцов и инфекционных агентов, действующими в вашей стране, и (или) международными правилами.

Рис. 2 Условия хранения образцов мочи



Инструкция по работе с набором

Рекомендации по процедуре

- Не используйте реагенты набора **cobas® BKV**, набор контролей **cobas® EBV/BKV Control Kit**, набор буферных отрицательных контролей **cobas® Buffer Negative Control Kit** и реагенты **cobas® omni** после истечения их срока годности.
- Не используйте повторно расходные материалы. Они предназначены только для однократного применения.
- Убедитесь, что этикетки со штрихкодом на пробирках для образцов видны через отверстия сбоку штативов RD5 или МРА. В руководстве пользователя системы **cobas® 5800** или систем **cobas® 6800/8800** приведены описание соответствующих штрихкодов и дополнительная информация о загрузке пробирок для образцов.
- Инструкции по эксплуатации и обслуживанию приборов приведены в поддержке пользователя и (или) руководстве пользователя системы **cobas® 5800** или систем **cobas® 6800/8800**.

Постановка теста **cobas® BKV** в системе **cobas® 5800**

Тест **cobas® BKV** можно проводить с минимальным необходимым объемом образца 350 мкл для плазмы с ЭДТА (обрабатываемый объем образца равен 200 мкл) и 550 мкл для стабилизированной мочи (обрабатываемый объем образца равен 400 мкл). Процедура теста подробно описана в поддержке пользователя и (или) руководстве пользователя системы **cobas® 5800**. На Рис. 3 ниже приведена схема процедуры.

- Пробирки с образцами должны быть открыты и загружены непосредственно в штативы для обработки в системе **cobas® 5800**.
- Одна постановка может включать комбинацию образцов (плазма, стабилизированная моча).

Образцы плазмы с ЭДТА и стабилизированной мочи должны обрабатываться посредством выбора типа образца в пользовательском интерфейсе **cobas® BKV**, как описано на Рис. 3, этап 2.

Рис. 3 Процедура теста **cobas®** BKV в системе **cobas®** 5800

1	Войти в систему Нажать кнопку «Старт», чтобы подготовить систему
2	Загрузка образцов в систему: • Загрузить штативы для образцов в систему • Система подготовится автоматически • Задать тесты ○ Выбрать «Plasma» (Плазма) для введения образцов плазмы с ЭДТА ○ Выбрать «Urine» (Моча) для введения образцов мочи, собранных в cobas® PCR Media ▪ Открыть пробирку ▪ Перенести пробирку непосредственно в штатив
3	Пополнение реагентов и расходных материалов по запросу системы: • Загрузить тест-специфичную(ые) кассету(ы) реагентов • Загрузить мини-штативы контролей • Загрузить наконечники обработки • Загрузить наконечники элюата • Загрузить планшеты обработки • Загрузить планшеты для жидких отходов • Загрузить амплификационные планшеты • Загрузить кассету MGP • Пополнить дилуэнт для образцов • Пополнить лизирующий реагент • Пополнить промывочный реагент
4	Запустить постановку нажатием кнопки «Начать обработку» в пользовательском интерфейсе; все последующие постановки будут запускаться автоматически, если запуск не отложен вручную
5	Просмотр и экспорт результатов
6	Извлеките и закройте все пробирки с образцами, отвечающие требованиям к минимальному объему, если они необходимы для будущего использования Очистка прибора: • Выгрузить пустые мини-штативы контролей • Выгрузить пустую(ые) тест-специфичную(ые) кассету(ы) реагентов • Освободить секцию амплификационных планшето • Удалить жидкие отходы • Удалить твердые отходы

Постановка теста cobas® BKV в системах cobas® 6800/8800

Тест cobas® BKV можно проводить с минимальным необходимым объемом образца 350 мкл для плазмы с ЭДТА (обрабатываемый объем образца равен 200 мкл) и 550 мкл для стабилизированной мочи (обрабатываемый объем образца равен 400 мкл). Процедура теста на приборе подробно описана в поддержке пользователя и/или руководстве пользователя систем cobas® 6800/8800 Systems. На Рис. 4 ниже приведена схема постановки теста.

- Пробирки с образцами должны быть открыты и загружены непосредственно в штативы для обработки в системах cobas® 6800/8800 Systems.
- Одна постановка может включать комбинацию образцов (плазма, стабилизированная моча).
- Образцы плазмы с ЭДТА и стабилизированной мочи должны обрабатываться посредством выбора типа образца в пользовательском интерфейсе cobas® BKV, как описано на Рис. 4, этап 1.

Рис. 4 Процедура теста cobas® BKV в системах cobas® 6800/8800

1	Войти в систему Нажать кнопку «Старт», чтобы подготовить систему Задать тесты: • Выбрать «Plasma» (Плазма) для введения образцов плазмы с ЭДТА • Выбрать «Urine» (Моча) для введения образцов мочи, собранных в cobas® PCR Media
2	Пополнение реагентов и расходных материалов по запросу системы: • Загрузить тест-специфичную кассету реагентов • Загрузить кассеты с контролями • Загрузить наконечники для дозаторов • Загрузить планшеты обработки • Загрузить реагент MGP • Загрузить амплификационные планшеты • Пополнить дилуэнт для образцов • Пополнить лизирующий реагент • Пополнить промывочный реагент
3	Загрузка образцов в систему: • Для первичных образцов мочи, собранных в cobas® PCR Media ○ Открыть пробирку ○ Перенести пробирку непосредственно в штатив • Загрузить штатив для образцов и штативы с наконечниками в модуль подачи образцов • Подтвердить, что образцы были приняты в модуль переноса образцов
4	Начните постановку, нажав кнопку «Ручной старт» в пользовательском интерфейсе, в ином случае постановка начнется автоматически через 120 минут или если партия заполнена
5	Просмотр и экспорт результатов
6	Извлеките и закройте все пробирки с образцами, отвечающие требованиям к минимальному объему, если они необходимы для будущего использования Очистка прибора: • Выгрузить пустые кассеты для контролей • Освободить секцию амплификационных планшетов • Удалить жидкие отходы • Удалить твердые отходы

Результаты

Системы **cobas**® 5800/6800/8800 автоматически определяют концентрацию ДНК BКV в образцах и контролях. Концентрация ДНК BКV выражается в Международных единицах на миллилитр (МЕ/мл).

Контроль качества и валидность результатов в системе **cobas**® 5800

- Один отрицательный контроль [(-) Ctrl] и два положительных контроля, низкотитражный положительный контроль [EBV/BKV L (+) C] и высокотитражный положительный контроль [EBV/BKV H (+) C], обрабатываются не реже, чем каждые 72 часа, и с каждым новым лотом набора. Положительные и (или) отрицательные контроли могут быть включены чаще на основе лабораторных правил и (или) местных нормативных требований.
- В программе системы **cobas**® 5800 и (или) отчете проверьте наличие флагов и соответствующих им результатов для проверки валидности результатов.

Невалидность результатов определяется программой **cobas**® 5800 автоматически на основании невалидных результатов для отрицательного или положительных контролей.

ПРИМЕЧАНИЕ. Система **cobas**® 5800 поставляется со стандартными настройками включения набора контролей (положительных и отрицательных) в каждую постановку, но может быть настроена на менее частое его включение с периодичностью до 72 часов в зависимости от лабораторных правил и (или) местных нормативных требований. Обратитесь к инженеру по обслуживанию Roche и (или) в службу технической поддержки Roche за дополнительной информацией.

Результаты тестирования контролей в системе **cobas**® 5800

Результаты для контролей отображаются в программе **cobas**® 5800 в приложении «Контроли».

- Контроли отмечены как «Валидно» в колонке «Результат контроля», если все мишени контроля признаны валидными. Контроли отмечены как «Невалидно» в колонке «Результат контроля», если все или одна мишень контроля признаны невалидными.
- Контроли, отмеченные как «Невалидно», отображаются с флагом в колонке «Флаги». Дополнительные сведения о том, почему контроль отображается невалидным, включая информацию о флаге, доступны в подробном представлении.
- Если один из контролей невалиден, необходимо повторить тестирование всех контролей и всех связанных образцов.

Контроль качества и валидность результатов в системах cobas® 6800/8800

- Один отрицательный контроль [(-) Ctrl] и два положительных контроля, низкотитражный положительный контроль [EBV/BKV L (+) C] и высокотитражный положительный контроль [EBV/BKV H (+) C], присутствуют в каждой постановке.
- В программе cobas® 6800/8800 или отчете проверьте наличие флагов и соответствующих им результатов для проверки валидности постановки.
- Постановка признается валидной, если нет флагов ни для одного из трех контролей, включающих один отрицательный и два положительных: EBV/BKV L (+) C, EBV/BKV H (+) C. Результат отрицательного контроля отображается как (-) Ctrl, а результаты низкотитражного и высокотитражного положительных контролей отображаются как EBV/BKV L (+) C и EBV/BKV H (+) C.

Невалидность результатов определяется программой cobas® 6800/8800 автоматически на основании невалидных результатов для отрицательного и положительных контролей.

Флаги контролей в системах cobas® 6800/8800

Табл. 12 Флаги отрицательного и положительных контролей

Отрицательный контроль	Флаг	Результат	Интерпретация
(-) Ctrl	Q02 (Невалидные результаты постановки для партии контролей)	Невалидно	Невалидный результат, или рассчитанный титр для отрицательного контроля не является негативным.
Положительный контроль	Флаг	Результат	Интерпретация
EBV/BKV L (+) C	Q02 (Невалидные результаты постановки для партии контролей)	Невалидно	Невалидный результат, или рассчитанный титр для низкотитражного положительного контроля находится вне заданного диапазона.
EBV/BKV H (+) C	Q02 (Невалидные результаты постановки для партии контролей)	Невалидно	Невалидный результат, или рассчитанный титр для высокотитражного положительного контроля находится вне заданного диапазона.

Если результаты постановки для партии контролей невалидны, повторите тестирование всех образцов из этой партии.

Интерпретация результатов

При получении валидных результатов постановки для партии проверьте наличие флагов для каждого отдельного образца в программах системы **cobas® 5800** и систем **cobas® 6800/8800** и (или) отчетах. Интерпретация результатов должна быть следующей:

- Валидная постановка может содержать как валидные, так и невалидные результаты для образцов.

Табл. 13 Интерпретация результатов по отдельным мишеням

Результаты	Интерпретация
Target Not Detected	ДНК BКV не обнаружена. Интерпретируйте результат как «BKV не обнаружен».
< Titer Min ^a	Рассчитанная концентрация ниже нижнего предела количественного определения (LLoQ) теста. Интерпретируйте результат как «BKV обнаружен, менее (Titer Min)». Минимальная концентрация для плазмы с ЭДТА = 21,5 МЕ/мл Минимальная концентрация для мочи = 200 МЕ/мл
Titer	Рассчитанная концентрация находится в пределах линейного диапазона теста: выше или равна минимальной концентрации и меньше или равна максимальной концентрации. Интерпретируйте результат как «(Titer) BКV обнаружено».
> Titer Max ^b	Рассчитанная концентрация выше верхнего предела количественного определения (ULoQ) теста. Интерпретируйте результат как «BKV обнаружен, более (Titer Max)». Максимальная концентрация для плазмы с ЭДТА и мочи = 1,0E+08 МЕ/мл

^a Результаты образца < Titer Min (мишень обнаружена на уровне < LLoQ [нижний предел количественного определения]) должны интерпретироваться с учетом других клинических данных и не должны быть единственным основанием для принятия решений о лечении.

^b Результат образца > Titer Max указывает на выявление образца, положительного по BКV в концентрации, превышающей верхний предел количественного определения теста (ULoQ). Если нужно получить количественный результат для образцов плазмы человека с ЭДТА, исходный образец следует развести BКV-негативной плазмой человека с ЭДТА и повторить тестирование. Затем умножьте полученный результат на коэффициент разведения.

Интерпретация результатов в системе cobas® 5800

Результаты образцов отображаются в программе **cobas® 5800** в приложении «Результаты».

При получении валидных результатов постановки для партии контролей проверьте наличие флагов для каждого отдельного образца в программе системы **cobas® 5800** и (или) отчете. Интерпретация результатов должна быть следующей:

- Образцы, связанные с валидной постановкой для партии контролей, отображаются как «Валидно» в колонке «Результат контроля», если все результаты для мишеней контроля признаны валидными. Образцы, связанные с невалидной постановкой для партии контролей, отображаются как «Невалидно» в колонке «Результат контроля», если все результаты для мишеней контроля признаны невалидными.

- Если связанные с результатом образца контроля невалидны, к результату будет добавлен соответствующий флаг из перечисленных ниже.
 - Q05D: валидность результата не подтверждена из-за наличия невалидного положительного контроля.
 - Q06D: валидность результата не подтверждена из-за наличия невалидного отрицательного контроля.
- Значения в колонке «Результаты» для результата отдельной мишени образца следует интерпретировать как показано в Табл. 13 выше.

Если одна или несколько мишеней образца отмечены как «Невалидно», в программе **cobas**® 5800 отобразится флаг в колонке «Флаги». Дополнительные сведения о том, почему мишени образца отображаются невалидными, включая информацию о флаге, доступны в подробном представлении.

Интерпретация результатов в системах **cobas**® 6800/8800

Для валидной постановки проверьте наличие флагов для каждого образца в программе систем **cobas**® 6800/8800 или отчете. Интерпретация результатов должна быть следующей:

- Образцы получают отметку «Да» в колонке «Валидно», если все требуемые результаты для мишеней признаны валидными. Для образцов с отметкой «Нет» в колонке «Валидно» могут потребоваться дополнительные сведения и действия.
- Значения для результата отдельной мишени образца должны быть интерпретированы как показано в Табл. 13 выше.

Ограничения процедуры

- Тест **cobas**® BKV валидирован только для работы с набором контролей **cobas**® EBV/BKV Control Kit, набором буферной отрицательной контроли **cobas**® Buffer Negative Control Kit, реагентом **cobas**® **omni** MGP Reagent, лизирующим реагентом **cobas**® **omni** Lysis Reagent, дилуентом для образцов **cobas**® **omni** Specimen Diluent и промывочным реагентом **cobas**® **omni** Wash Reagent в системах **cobas**® 5800/6800/8800.
- Надежность результатов теста зависит от адекватности сбора, хранения и обработки образцов.
- Данный тест валидирован только для работы с образцами плазмы с ЭДТА и стабилизированной мочи. Тестирование в **cobas**® BKV образцов другого типа может привести к неверным результатам теста. Измерения уровня ДНК в плазме и стабилизированной моче не могут быть напрямую сопоставлены друг с другом и с результатами других типов образцов.
- Количественное определение ДНК BKV зависит от методов сбора образцов, факторов пациента (например, наличие симптомов) и /или стадии инфекции.
- Разложение ДНК BKV в чистой моче может повлиять на количественное определение ¹⁷. Транспортировка мочи в **cobas**® PCR Media необходима для достижения стабильности образца.
- Количественная вариативность ДНК BKV, присущая моче, наблюдалась в экспериментах по исследованию стабильности образца в разные моменты времени отбора образцов (чистая моча) или в разных аликвотах одного и того же образца (чистая моча и моча, стабилизированная в **cobas**® PCR Media).

- Учитывая эти ограничения, результаты анализа ДНК ВКВ в моче следует интерпретировать с осторожностью в контексте клинических и других лабораторных данных, и они не должны быть единственным основанием для принятия решения о лечении.
- Моча может содержать высокие уровни ДНК ВКВ с риском контаминации при переносе ¹⁸.
- Как и при проведении любого молекулярного теста, мутации в участках вирусного генома, являющихся мишенями теста **cobas**® ВКВ, могут препятствовать связыванию праймеров или зондов и в результате приводить к заниженной оценке вирусной концентрации или неспособности обнаружить вирус.
- Вследствие естественных различий между технологиями пользователю рекомендуется, прежде чем заменить одну технологию на другую, провести корреляционные испытания для двух методов, чтобы оценить возможные различия между технологиями. Пользователи должны следовать политике и процедурам, принятым в их учреждении.
- Тест **cobas**® ВКВ не предназначен для применения в качестве скринингового теста на наличие ВКВ в крови или ее продуктах.

Доклинические испытания теста

Основные рабочие характеристики для образцов плазмы с ЭДТА, определяемые в системах cobas® 6800/8800

Предел обнаружения (LoD): Международный стандарт ВОЗ

Предел обнаружения теста cobas® BKV для Международного стандарта ВОЗ определяли путем анализа серии разведений 1-го Международного стандарта ВОЗ BКV, полученного от NIBSC (NIBSC 14/212), в BКV-негативной плазме человека с ЭДТА. Панели из шести концентраций, а также пустую пробу тестировали с использованием трех лотов наборов реагентов cobas® BКV в нескольких постановках в течение нескольких дней несколькими операторами на нескольких приборах.

Результаты для образцов плазмы с ЭДТА приведены в Табл. 14 – Табл. 16. Полученные результаты продемонстрировали, что при использовании наименее чувствительного лота при тестировании плазмы с ЭДТА концентрация, для которой ожидается частота выявления 95 % по PROBIT, составила 21,5 МЕ/мл; при этом 95%-й доверительный интервал составил 16,3–32,4 МЕ/мл. Наиболее низкая концентрация в образцах плазмы с ЭДТА при частоте выявления ≥ 95 % составила 19,0 МЕ/мл.

Табл. 14 Предел обнаружения для образцов плазмы с ЭДТА, лот 1

Номинальная концентрация (ДНК BКV, МЕ/мл)	Число валидных повторов	Число позитивных повторов	Частота выявления, %
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
Предел обнаружения по PROBIT при частоте выявления 95 %	21,5 МЕ/мл Доверительный интервал 95 %: 16,3–32,4 МЕ/мл		

Табл. 15 Предел обнаружения для образцов плазмы с ЭДТА, лот 2

Номинальная концентрация (ДНК BКV, МЕ/мл)	Число валидных повторов	Число позитивных повторов	Частота выявления, %
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
Предел обнаружения по PROBIT при частоте выявления 95 %	19,7 МЕ/мл Доверительный интервал 95 %: 15,0–29,2 МЕ/мл		

Табл. 16 Предел обнаружения для образцов плазмы с ЭДТА, лот 3

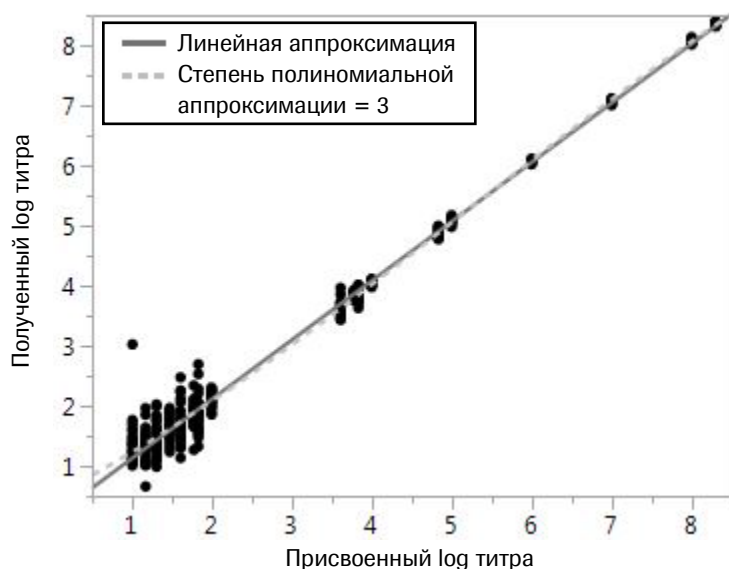
Номинальная концентрация (ДНК BКV, МЕ/мл)	Число валидных повторов	Число позитивных повторов	Частота выявления, %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	50	79,4
4,75	63	35	55,6
2,38	63	22	35,0
0	63	0	0,0
Предел обнаружения по PROBIT при частоте выявления 95 %	19,3 МЕ/мл Доверительный интервал 95 %: 14,8–28,5 МЕ/мл		

Линейный диапазон

Линейность теста **cobas® BКV** определяли с использованием серии разведений, состоящей из 18 образцов панели с ДНК BКV подгруппы Ib, перекрывающих линейный диапазон теста. Одиннадцать образцов панели, перекрывающих весь линейный диапазон, готовили из высокотитражной стоковой концентрации ДНК Лямбда. Клинический образец использовали для приготовления семи образцов панели, покрывающих средний и нижний уровни линейного диапазона.

Тестирование проводили в 36 повторах для каждой концентрации с тремя лотами набора реагентов **cobas® BКV**, результаты представлены на Рис. 5.

Линейный диапазон теста **cobas® BКV** при тестировании плазмы человека с ЭДТА составил от $1,01\text{E}+01$ до $1,97\text{E}+08$ МЕ/мл при абсолютном отклонении от оптимальной нелинейной регрессии менее или равном $\pm 0,1 \log_{10}$ (см. Рис. 5). В пределах линейного диапазона точность теста составляет $\pm 0,2 \log_{10}$.

Рис. 5 Линейный диапазон определения в плазме с ЭДТА

Внутрилабораторная воспроизводимость

Воспроизводимость теста **cobas® BKV** определяли методом анализа серии разведений высокотитражной ДНК ВКВ (подгруппа Ib) в ВКВ-негативной плазме с ЭДТА. Всего тестировали 5 разведений в 72 повторах для каждого разведения с тремя лотами набора реагентов **cobas® BKV** на четырех приборах с участием двух операторов на протяжении 12 дней. Каждый образец проходил полную постановку теста **cobas® BKV** в полностью автоматизированных системах **cobas® 6800/8800**. Таким образом, данные по воспроизводимости отражают все аспекты тестирования. Полученные результаты приведены в Табл. 17.

Тест **cobas® BKV** продемонстрировал высокую воспроизводимость для трех лотов набора реагентов, тестируемых в диапазоне концентраций от $9,83\text{E}+01$ МЕ/мл до $9,83\text{E}+05$ МЕ/мл.

Табл. 17 Внутрилабораторная воспроизводимость теста **cobas® BKV** *

Номинальная концентрация [МЕ/мл]	Определенная концентрация [МЕ/мл]	Плазма с ЭДТА			
		Лот 1	Лот 2	Лот 3	Все лоты
		СО	СО	СО	Общее СО
$1,00\text{E}+06$	$9,83\text{E}+05$	0,02	0,02	0,04	0,03
$1,00\text{E}+05$	$9,83\text{E}+04$	0,03	0,04	0,04	0,04
$1,00\text{E}+04$	$9,83\text{E}+03$	0,04	0,05	0,03	0,04
$6,00\text{E}+03$	$5,90\text{E}+03$	0,03	0,05	0,03	0,04
$1,00\text{E}+02$	$9,83\text{E}+01$	0,09	0,11	0,11	0,11

* Значения концентраций рассматривали как имеющие log-нормальное распределение и анализировали выраженными в $\log_{10}$. Столбцы со значениями стандартного отклонения (СО) представляют значения концентрации в логарифмической шкале для каждого из трех лотов набора реагентов.

Верификация субтипов

Способность теста cobas® BKV выявлять субтипы I (включая подгруппы Ia и Ic), II, III и IV BKV определяли указанными ниже методами:

- Верификация предела обнаружения
- Верификация линейного диапазона

Верификация предела обнаружения для субтипов I (включая подгруппы Ia и Ic), II, III и IV вируса

ДНК BKV пяти различных субтипов/подгрупп (Ia, Ic, II, III и IV) разводили до трех разных концентраций в BKV-негативной плазме с ЭДТА. Частоту выявления определяли при тестировании в 63 повторях для каждой концентрации. Тестирование проводили с использованием трех лотов набора реагентов теста cobas® BKV в нескольких постановках в течение нескольких дней несколькими операторами на нескольких приборах. Результаты подтверждают, что тест cobas® BKV позволяет обнаружить ДНК BKV пяти разных субтипов/подгрупп в концентрации, равной 21,5 МЕ/мл, с частотой выявления $\geq 95\%$.

Верификация линейного диапазона для субтипов I (включая подгруппы Ia и Ic), II, III и IV вируса

Для верификации линейности теста cobas® BKV для разных субтипов/подгрупп вируса использовали серии разведений, состоящие из восьми образцов панели, перекрывающих линейный диапазон теста. Тестирование проводили с тремя лотами набора реагентов cobas® BKV; каждую концентрацию тестировали в образцах плазмы с ЭДТА в 12 повторях.

Линейный диапазон теста cobas® BKV был подтвержден для всех пяти субтипов/подгрупп вируса (Ia, Ic, II, III и IV).

Специфичность

Специфичность теста cobas® BKV определяли методом тестирования BKV-негативных образцов плазмы с ЭДТА от индивидуальных доноров. Всего тестировали 104 индивидуальных образца плазмы с ЭДТА с использованием трех лотов набора реагентов cobas® BKV. Все образцы оказались отрицательными по ДНК BKV. При тестировании данной панели образцов специфичность теста cobas® BKV составила 100 % (нижний предел одностороннего 95%-го доверительного интервала: 97,16 %).

Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность теста cobas® BКV определяли путем тестирования панели образцов микроорганизмов при концентрации 1,00Е+06 единиц/мл (КОЕ/мл, клеток/мл, ЦОЕ/мл, ИЕ/мл) для бактерий и дрожжей и при концентрации от 1,00Е+05 единиц/мл до 1,00Е+06 единиц/мл (копий/мл, ИТД₅₀/мл, МЕ/мл, клеток/мл) для вирусов. Микроорганизмы разводили в плазме человека с ЭДТА, отрицательной по ДНК BКV, а также в плазме человека с ЭДТА, содержащей 100 МЕ/мл ДНК BКV. Тестировавшиеся микроорганизмы приведены в Табл. 18. Каждый образец тестировали в трех повторях. Ни один из тестируемых микроорганизмов, не относящихся к BКV, не оказывал интерферирующего влияния на результаты теста в тестируемых концентрациях. Отрицательный результат в тесте cobas® BКV был получен для всех микроорганизмов в образцах без BКV, положительный результат был получен для всех микроорганизмов, тестируемых в присутствии BКV. Кроме того, средний log₁₀ титра каждого BКV-позитивного образца, содержащего потенциально кросс-реактивные микроорганизмы, находился в пределах ±0,5 log₁₀ от среднего log₁₀ титра соответствующего положительного образца.

Табл. 18 Микроорганизмы, тестируемые для определения перекрестной реактивности

Вирусы	Бактерии	Дрожжи
Аденовирус типа 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Цитомегаловирус	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Вирус Эпштейна – Барр	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Вирус гепатита В	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Вирус гепатита С	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
Вирус простого герпеса типа 1	<i>Escherichia coli</i>	-
Вирус простого герпеса типа 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Вирус герпеса человека типа 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Вирус герпеса человека типа 7	<i>Mycobacterium avium</i>	-
Вирус герпеса человека типа 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
Вирус иммунодефицита человека 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Вирус иммунодефицита человека 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Папилломавирус человека	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Вирус JC (Джона Каннингема)	<i>Salmonella enterica</i>	-
Парвовирус В19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Обезьяний вирус sv40	-	-
Вирус варицелла зостер	-	-

Аналитическая специфичность: интерферирующие вещества

Образцы с повышенными уровнями триглицеридов (33 г/л), прямого билирубина (0,2 г/л), непрямого билирубина (0,2 г/л), альбумина (60 г/л), гемоглобина (2 г/л) и ДНК человека (2 мг/л) тестировали в присутствии (100 МЕ/мл) и в отсутствие ДНК BVK. Было показано, что протестированные эндогенные вещества не оказывали интерферирующего влияния на результаты теста cobas® BVK.

Кроме того, лекарственные препараты, приведенные в Табл. 19, тестировали в концентрациях, превышающих в три раза C_{max} , в присутствии и в отсутствие ДНК BVK.

Все потенциально интерферирующие препараты не оказывали интерферирующего влияния на результаты теста. Отрицательный результат в тесте cobas® BVK был получен для всех образцов без BVK, положительный результат был получен для всех образцов, тестировавшихся в присутствии BVK. Кроме того, средний $\log_{10}$ титра каждого BVK-позитивного образца, содержащего потенциально интерферирующие вещества, находился в пределах $\pm 0,5 \log_{10}$ среднего $\log_{10}$ титра соответствующего положительного образца.

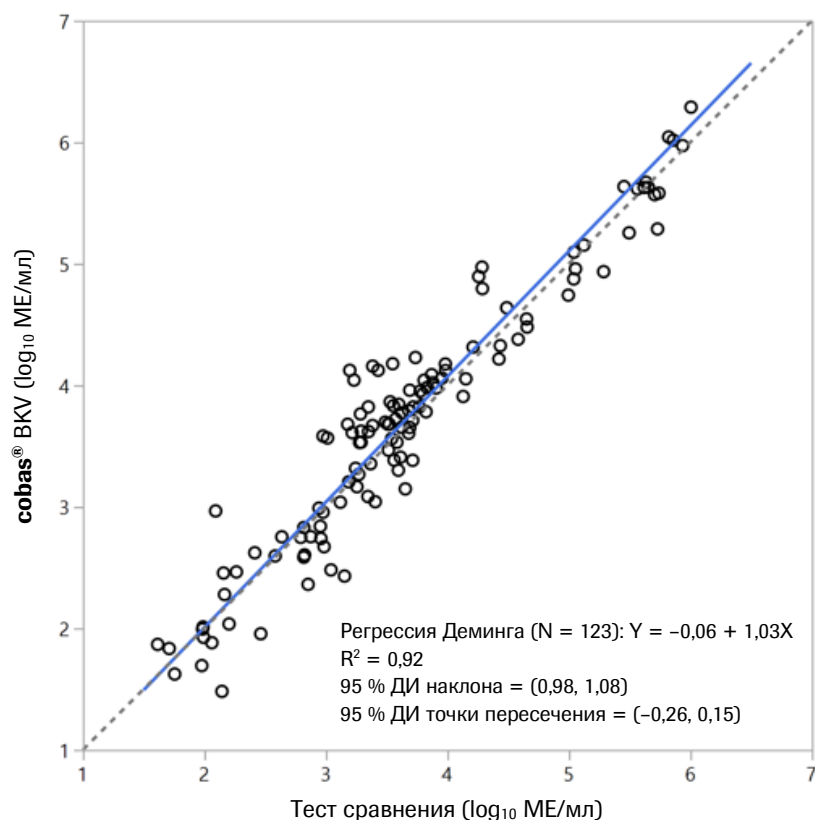
Табл. 19 Лекарственные препараты, тестировавшиеся для выявления интерферирующего влияния на количественное определение ДНК BVK в тесте cobas® BVK

Класс лекарственного препарата	Международное непатентованное название препарата	
Антимикробный препарат	Цефотетан	Сульфаметоксазол
	Калия clavulanat	Двунатриевый тикарциллин
	Флуконазол	Триметоприм
	Пиперацillin	Ванкомицин
	Натрия тазобактам	Микафунгин
Препараты для лечения герпетических инфекций	Ганцикловир	Цидофовир
	Валганцикловир	Фоскарнет
	Ацикловир	Летермовир
Иммунодепрессант	Азатиоприн	Преднизон
	Циклоспорин	Сиролимус
	Эверолимус	Такролимус
	Мофетила микофенолат	Микофеноловая кислота

Корреляция методов

Сравнительный анализ характеристик теста cobas® BVK и теста сравнения проводили методом анализа образцов плазмы с ЭДТА от BVK-инфицированных пациентов. Образцы плазмы с ЭДТА, значения уровней ДНК вируса в которых находились в пределах диапазона количественного определения обоих тестов, тестировали в одном повторе. Для полученных результатов был проведен регрессионный анализ методом Деминга.

Результаты анализа методом регрессии Деминга приведены на Рис. 6.

Рис. 6 Регрессионный анализ результатов теста **cobas® BKV** и теста сравнения

Системные ошибки

Частоту системной ошибки для теста **cobas® BKV** определяли при тестировании в 100 повторях образцов плазмы с ЭДТА, в которую вносили положительный по BKV клинический образец. Полученные образцы тестировали в концентрации $3 \times \text{LoD}$.

Результаты исследования показали, что все повторы дали валидный результат, положительный по BKV, при этом частота системной ошибки составила 0 % (верхний предел одностороннего 95%-го доверительного интервала: 2,95 %).

Перекрестная контаминация

Частоту перекрестной контаминации в тесте **cobas® BKV** определяли при тестировании BKV-негативного матрикса в 240 повторях и высокотитражного образца ДНК BKV с приблизительным титром $2,00\text{E}+07$ МЕ/мл в 225 повторях. Всего было проведено пять постановок, в которых положительные и отрицательные образцы были расставлены в шахматном порядке.

Все 240 повторов отрицательных образцов дали отрицательный результат, таким образом, частота перекрестной контаминации составила 0 % (верхний предел одностороннего 95%-го доверительного интервала: 1,24 %).

Основные рабочие характеристики для образцов стабилизированной мочи, определяемые в системах cobas® 6800/8800

Предел обнаружения (LoD): Международный стандарт ВОЗ

Предел обнаружения теста cobas® BKV для Международного стандарта ВОЗ определяли путем анализа серии разведений 1-го Международного стандарта ВОЗ BКV, полученного от NIBSC (NIBSC 14/212), в BКV-негативной пулированной моче, стабилизированной в cobas® PCR Media. Панели из шести концентраций, а также пустую пробу тестировали с использованием трех лотов наборов реагентов cobas® BКV в нескольких постановках в течение нескольких дней несколькими операторами на нескольких приборах.

Результаты тестирования пулированной мочи, стабилизированной в cobas® PCR Media, приведены в Табл. 20 – Табл. 22. Полученные результаты продемонстрировали, что при использовании наименее чувствительного лота при тестировании чистой мочи концентрация, для которой ожидается частота выявления 95 % по PROBIT, составила 12,2 МЕ/мл; при этом 95%-й доверительный интервал составил 9,2–18,3 МЕ/мл. Наиболее низкая концентрация в образцах чистой мочи при частоте выявления ≥ 95 % составила 10,0 МЕ/мл.

Табл. 20 Предел обнаружения для образцов мочи, лот 1

Номинальная концентрация (ДНК BКV, МЕ/мл)*	Число валидных повторов	Число позитивных повторов	Частота выявления, %
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
Предел обнаружения по PROBIT при частоте выявления 95 %	12,2 МЕ/мл Доверительный интервал 95 %: 9,2–18,3 МЕ/мл		

* Тестируемые образцы мочи, стабилизированные в cobas® PCR Media. Номинальная концентрация, используемая для расчета на основе чистой мочи.

Табл. 21 Предел обнаружения для образцов мочи, лот 2

Номинальная концентрация (ДНК BKV, МЕ/мл)*	Число валидных повторов	Число позитивных повторов	Частота выявления, %
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
Предел обнаружения по PROBIT при частоте выявления 95 %	11,9 МЕ/мл Доверительный интервал 95 %: 9,2–17,3 МЕ/мл		

* Тестируемые образцы мочи, стабилизированные в cobas® PCR Media. Номинальная концентрация, используемая для расчета на основе чистой мочи.

Табл. 22 Предел обнаружения для образцов мочи, лот 3

Номинальная концентрация (ДНК BKV, МЕ/мл)*	Число валидных повторов	Число позитивных повторов	Частота выявления, %
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
Предел обнаружения по PROBIT при частоте выявления 95 %	10,1 МЕ/мл Доверительный интервал 95 %: 7,8–14,7 МЕ/мл		

* Тестируемые образцы мочи, стабилизированные в cobas® PCR Media. Номинальная концентрация, используемая для расчета на основе чистой мочи.

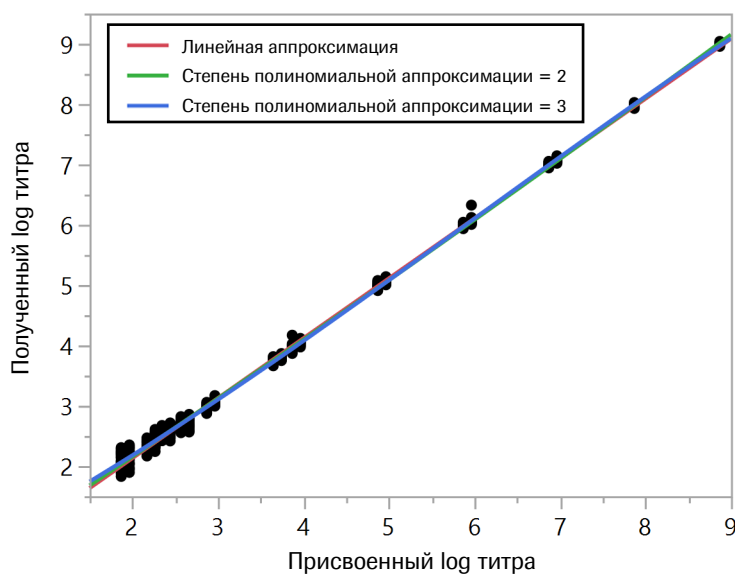
Линейный диапазон

Линейность теста **cobas® BKV** определяли с использованием серии разведений, клинического образца (подгруппа Ib BКV), при этом 10 членов полученной панели перекрывали линейный диапазон теста. Двенадцать образцов панели, перекрывающих весь линейный диапазон, готовили из высокотитражной стоковой концентрации ДНК Лямбда.

Тестирование проводили в 36 повторах для каждой концентрации с тремя лотами набора реагентов **cobas® BКV**, результаты представлены на Рис. 7.

Было продемонстрировано, что тест **cobas® BКV** является линейным в диапазоне от $7,41\text{E}+01$ МЕ/мл до $7,41\text{E}+08$ МЕ/мл при абсолютном отклонении от оптимальной нелинейной регрессии менее или равно $\pm 0,1 \log_{10}$ в пулированной моче, стабилизированной в **cobas® PCR Media** (см. Рис. 7). В пределах линейного диапазона точность теста составляет $\pm 0,2 \log_{10}$.

Рис. 7 Линейный диапазон определения в моче



Внутрилабораторная воспроизводимость

Воспроизводимость теста **cobas® BКV** определяли методом анализа серии разведений высокотитражной ДНК BКV (подгруппа Ib) в BКV-негативной пулированной моче, стабилизированной в **cobas® PCR Media**. Всего тестировали 5 разведений в 72 повторах для каждого разведения с тремя лотами набора реагентов **cobas® BКV** на двух приборах с участием двух операторов на протяжении 12 дней. Каждый образец проходил полную постановку теста **cobas® BКV** в полностью автоматизированных системах **cobas® 6800/8800**. Таким образом, данные по воспроизводимости отражают все аспекты тестирования. Полученные результаты приведены в Табл. 23.

Тест **cobas® BКV** продемонстрировал высокую воспроизводимость для трех лотов набора реагентов, тестируемых в диапазоне концентраций от $7,41\text{E}+02$ МЕ/мл до $7,41\text{E}+05$ МЕ/мл.

Табл. 23 Внутрिलाбораторная воспроизводимость теста **cobas® BKV** *

Номинальная концентрация [МЕ/мл]	Определенная концентрация [МЕ/мл]	Моча, стабилизированная в cobas® PCR Media			
		Лот 1	Лот 2	Лот 3	Все лоты
		CO	CO	CO	Общее CO
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

* Значения концентраций рассматривали как имеющие log-нормальное распределение и анализировали выраженными в $\log_{10}$. Столбцы со значениями стандартного отклонения (CO) представляют значения концентрации в логарифмической шкале для каждого из трех лотов набора реагентов.

Верификация субтипов

Способность теста **cobas® BKV** выявлять субтипы I (включая подгруппы Ia и Ic), II, III и IV **BKV** определяли указанными ниже методами:

- Верификация предела обнаружения
- Верификация линейного диапазона

Верификация предела обнаружения для субтипов I (включая подгруппы Ia и Ic), II, III и IV вируса

ДНК **BKV** пяти различных субтипов/подгрупп (Ia, Ic, II, III и IV) разводили до трех разных концентраций в **BKV**-негативной пулированной моче, стабилизированной в **cobas® PCR Media**. Частоту выявления определяли при тестировании в 63 повторях для каждой концентрации. Тестирование проводили с использованием трех лотов набора реагентов теста **cobas® BKV** в нескольких постановках в течение нескольких дней несколькими операторами на нескольких приборах. Результаты подтверждают, что тест **cobas® BKV** позволяет обнаружить ДНК **BKV** пяти разных субтипов/подгрупп в концентрации, равной 12,2 МЕ/мл, с частотой выявления $\geq 95\%$.

Верификация линейного диапазона для субтипов I (включая подгруппы Ia и Ic), II, III и IV вируса

Для верификации линейности теста **cobas® BKV** для разных субтипов/подгрупп вируса использовали серии разведений, состоящие из восьми образцов панели, перекрывающих линейный диапазон теста. Тестирование проводили с тремя лотами набора реагентов **cobas® BKV**; каждую концентрацию тестировали в образцах мочи, стабилизированной в **cobas® PCR Media**, в 12 повторях.

Линейный диапазон теста **cobas® BKV** был подтвержден для всех пяти субтипов/подгрупп вируса (Ia, Ic, II, III и IV).

Специфичность

Специфичность теста **cobas® BKV** определяли методом тестирования BКV-негативных образцов мочи, стабилизированной в **cobas® PCR Media**, от индивидуальных доноров. Всего тестировали 100 индивидуальных образцов мочи с использованием трех лотов набора реагентов **cobas® BKV**. Все образцы оказались отрицательными по ДНК BКV. При тестировании данной панели образцов специфичность теста **cobas® BKV** составила 100 % (нижний предел одностороннего 95%-го доверительного интервала: 97,05 %).

Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность теста **cobas® BKV** определяли путем тестирования панели образцов микроорганизмов в диапазоне концентраций от 1,00E+06 единиц/мл до 2,00E+06 единиц/мл (КОЕ/мл, клеток/мл, ЦОЕ/мл, ИЕ/мл) для бактерий и дрожжей и в концентрации 1,00E+05 единиц/мл (копий/мл, ИТД₅₀/мл, МЕ/мл, клеток/мл) для вирусов. Микроорганизмы разводили в моче, отрицательной по ДНК BКV, а также в моче, содержащей 600 МЕ/мл ДНК BКV. Тестируемые микроорганизмы приведены в Табл. 24. Каждый образец тестировали в трех повторах. Ни один из тестируемых микроорганизмов, не относящихся к BКV, не оказывал интерферирующего влияния на результаты теста в тестируемых концентрациях. Отрицательный результат в тесте **cobas® BKV** был получен для всех микроорганизмов в образцах без BКV, положительный результат был получен для всех микроорганизмов, тестируемых в присутствии BКV. Кроме того, средний $\log_{10}$ титра каждого BКV-позитивного образца, содержащего потенциально кросс-реактивные микроорганизмы, находился в пределах $\pm 0,5 \log_{10}$ от среднего $\log_{10}$ титра соответствующего положительного образца.

Табл. 24 Микроорганизмы, тестируемые для определения перекрестной реактивности

Вирусы	Бактерии	Бактерии	Дрожжи
Вирус простого герпеса типа 2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
Папилломавирус человека 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>	-	-

Аналитическая специфичность: интерферирующие вещества

Повышенные уровни альбумина (0,5 % м/о), конъюгированного билирубина (1 % м/о), глюкозы (1 % м/о), мононуклеарных клеток периферической крови ($1,00 \times 10^6$ клеток/мл), слизи (в присутствии 1 мазка слизи на 4,3 мл образца), кислого pH (pH 4), щелочного pH (pH 9), спермы (1 мазок, погруженный в сперму на 4,3 мл образца), натрия (300 мЭкв/л) и цельной крови (10 % о/о) в образцах тестировали в присутствии (600 МЕ/мл) и в отсутствие ДНК ВКВ. Было показано, что протестированные эндогенные вещества не оказывали интерферирующего влияния на результаты теста **cobas® BКV**.

Кроме того, лекарственные препараты, приведенные в Табл. 25, тестировали в присутствии и в отсутствие ДНК ВКВ.

Все потенциально интерферирующие вещества не оказывали интерферирующего влияния на результаты теста, за исключением порошкообразного талька. Порошкообразный тальк в концентрации $\leq 0,05$ % не оказывал интерферирующего влияния на **cobas® BКV**. Отрицательный результат в тесте **cobas® BКV** был получен для всех образцов без ВКВ, положительный результат был получен для всех образцов, тестируемых в присутствии ВКВ. Кроме того, средний $\log_{10}$ титра каждого ВКВ-позитивного образца, содержащего потенциально интерферирующие вещества, находился в пределах $\pm 0,5 \log_{10}$ среднего $\log_{10}$ титра соответствующего положительного образца.

Табл. 25 Лекарственные препараты, тестировавшиеся для выявления интерферирующего влияния на количественное определение ДНК BKV в тесте **cobas® BKV**

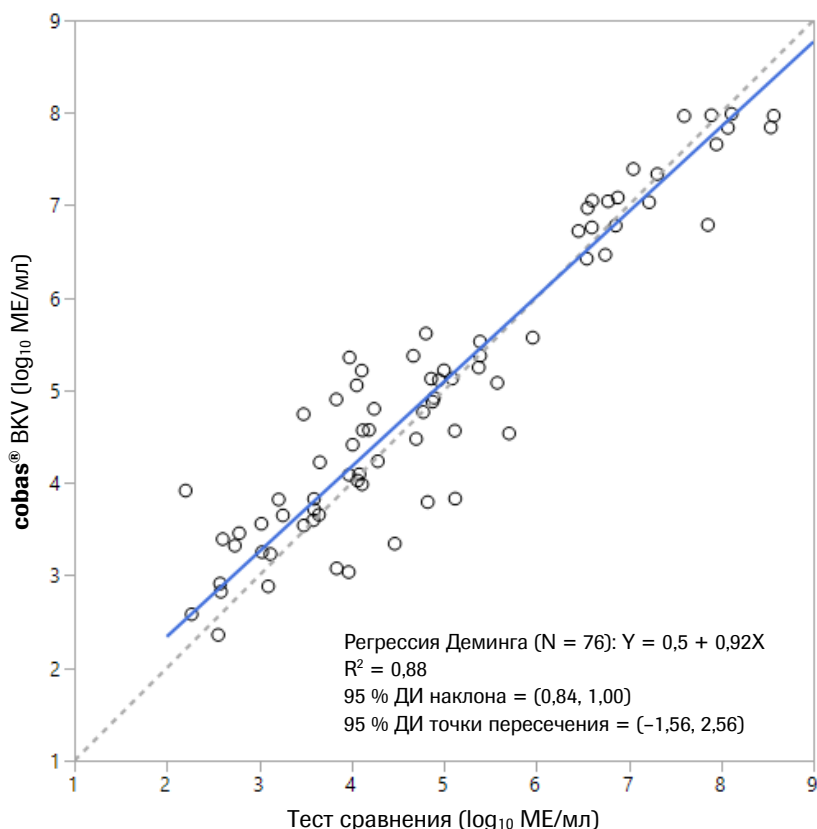
Класс лекарственного препарата	Активный ингредиент	Концентрация	Международное непатентованное название препарата
Антимикробный препарат	Клотримазол	100 мкг/мл	Гине-Лотримин 7
	Метронидазол	701 мкмоль/л	Арилин рапид Вагинальные суппозитории Крем Vagi Metro Гель Nidazea
Стероидный гормон эстроген	Эстрадиол	4,41 нмоль/л	Estrace
Анальгетики	Феназопиридин гидрохлорид	200 мкг/мл	Azo Standard
	Ацетаминофен	1324 мкмоль/л	Ацетаминофен
Лубрикант	Пропиленгликоль	1000 мкг/мл	K-Y UltraGel
Нестероидный противовоспалительный препарат	Ацетилсалициловая кислота	3,62 ммоль/л	Ацетилсалициловая кислота
	Напроксен	2170 мкмоль/л	Напроксен
	Ибупрофен	2425 мкмоль/л	Ибупрофен
Неприменимо	Тальк	0,05 % (м/о)	Тальк, порошок

Корреляция методов

Сравнительный анализ характеристик теста **cobas® BКV** и теста сравнения проводили методом анализа образцов мочи от ВКV-инфицированных пациентов. Образцы мочи, значения уровней ДНК вируса в которых находились в пределах диапазона количественного определения обоих тестов, тестировали в одном повторе. Для полученных результатов был проведен регрессионный анализ методом Деминга.

Результаты анализа методом регрессии Деминга приведены на Рис. 8.

Рис. 8 Регрессионный анализ результатов теста **cobas® BКV** и теста сравнения



Перекрестная контаминация

Частоту перекрестной контаминации в тесте **cobas® BКV** определяли при тестировании ВКV-негативного матрикса в 240 повторах и высокотитражного образца ДНК ВКV с приблизительным титром $1,00E+09$ МЕ/мл в 225 повторах. Всего было проведено пять постановок, в которых положительные и отрицательные образцы были расставлены в шахматном порядке.

Все 240 повторов отрицательных образцов дали отрицательный результат, таким образом, частота перекрестной контаминации составила 0,0 % (верхний предел одностороннего 95%-го доверительного интервала: 1,24 %).

Клинические испытания теста в системах cobas® 6800/8800

Воспроизводимость теста cobas® BКV для образцов плазмы с ЭДТА

Воспроизводимость теста cobas® BКV была оценена по множеству факторов (лот набора реагентов, лаборатория, постанова и дни тестирования), которые могли повлиять на полученные результаты рутинного клинического тестирования. Оценка проводилась в 3 испытательных лабораториях с использованием 3 лотов набора реагентов панели из положительных и отрицательных образцов, в результате чего общее количество тестов на концентрацию составляло 270 (не включая контроли). Панели были приготовлены с использованием плазмы с ЭДТА, не содержащей IgG к VCA BКV, протестированы на BКV методом NAT для плазмы в соответствии с протоколом, после чего в них внесли международный стандарт ВОЗ для BКV или ДНК культивированного вируса BКV с генотипом Ib (наиболее распространенный генотип). Два оператора в каждой лаборатории тестировали каждый лот набора реагентов на протяжении 5 дней. Каждый день выполнялось две постановки (1 тест = 1 постанова; 1 постанова = 1 панель + 3 контроля) с 3 повторами для каждого образца панели при каждой постановке. Результаты оценки приведены в Табл. 26.

Табл. 26 Процентные доли общей дисперсии (%ОВ), стандартное отклонение (CO) общей воспроизводимости и логнормальный KB (%) концентрации ДНК BКV ($\log_{10}$ МЕ/мл) положительного образца панели

Ожидаемая концентрация ДНК BКV ($\log_{10}$ МЕ/мл)	Наблюдаемая сред. ^a концентрация ДНК BКV ($\log_{10}$ МЕ/мл)	Количество тестов ^b	Лот %ОВ ^a (KB, %) ^c	Лаборатория %ОВ ^a (KB, %) ^c	День/оператор %ОВ ^a (KB, %) ^c	Постановка %ОВ ^a (KB, %) ^c	Внутри постанова %ОВ ^a (KB, %) ^c	Общая воспроизводимость CO ^d	Общая воспроизводимость, логнормальный KB (%) ^c
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 Рассчитано с использованием процедуры SAS MIXED.

^b Количество валидных тестов с детектируемым уровнем ДНК.

^c %ОВ = процентный вклад в общую дисперсию.

^c KB % = логнормальный процентный коэффициент вариации = кор. кв. $(10^{[CO^2 \times \ln(10)]} - 1) \times 100$.

^d С учетом общей вариации, полученной в ходе процедуры SAS MIXED.

Примечание. В таблице представлены только результаты с детектируемым уровнем ДНК. CO — стандартное отклонение.

KB — коэффициент вариации; BКV — вирус BК.

Тест cobas® BКV показал приемлемую клиническую воспроизводимость для концентраций на протяжении линейного диапазона. Кроме того, система обнаружила 100 % образцов с концентрацией $3 \times \text{LLoQ}$. Обе системы, cobas® 6800 и cobas® 8800, имеют модульную конструкцию и продемонстрировали эквивалентность при использовании теста cobas® BКV. Все оцениваемые значения 95%-го доверительного интервала (ДИ) различий между 2 измерениями образцов от одного и того же субъекта находились в диапазоне $\pm 0,84 \log_{10}$ МЕ/мл, и это указывает на то, что с помощью теста можно оценить изменения уровней ДНК BКV, которые считаются клинически значимыми.

Из 270 валидных тестов для отрицательных образцов панели, выполненных в системах cobas® 6800/8800, для всех образцов был получен результат «Target Not Detected» (Мишень не выявлена), таким образом, значение процента согласованности отрицательных результатов (ПСО) составило 100 % при точном 95 % ДИ от 98,6 % до 100 %.

Испытание теста cobas® BКV для образцов плазмы с ЭДТА

Клиническое испытание теста cobas® BКV было дополнительно проведено в трех лабораториях путем измерения уровней ДНК BКV в клинических образцах (как неразведенных, так и разведенных) инфицированных и не инфицированных BКV пациентов и в искусственных образцах плазмы с ЭДТА, в которые вносили культивированный вирус BКV, в сравнении с хорошо зарекомендовавшим себя лабораторным тестом на нуклеиновые кислоты (LDT) (тест сравнения BКV LDT). Из всех образцов, протестированных с использованием cobas® BКV и теста сравнения BКV, в общей сложности 550 образцов (217 неразведенных и 303 разведенных образцов от 129 субъектов после трансплантации и 30 искусственных образцов) были признаны валидными в ходе обоих тестов и подходящими для клинического анализа согласованности (Табл. 27).

Табл. 27 Анализ согласованности теста cobas® BКV и теста сравнения LDT по результатам определения уровня ДНК BКV для всех образцов

cobas® BКV (log ₁₀ МЕ/мл)	Тест сравнения BКV LDT (log ₁₀ МЕ/мл) Target Not Detected	Тест сравнения BКV LDT (log ₁₀ МЕ/мл) < LLoQ (< 2,3)	Тест сравнения BКV LDT (log ₁₀ МЕ/мл) От 2,3 до < 3,0	Тест сравнения BКV LDT (log ₁₀ МЕ/мл) От 3,0 до < 3,7	Тест сравнения BКV LDT (log ₁₀ МЕ/мл) От 3,7 до 4,4	Тест сравнения BКV LDT (log ₁₀ МЕ/мл) > 4,4	Всего
Target Not Detected	107	7	5	0	0	0	119
< LLoQ (< 2,3)	23	51	39	0	0	0	113
От 2,3 до < 3,0	0	3	40	62	1	0	106
От 3,0 до < 3,7	0	0	1	71	42	0	114
От 3,7 до 4,4	0	0	0	0	26	26	52
> 4,4	0	0	0	0	1	45	46
Всего	130	61	85	133	70	71	550
Согласованность в колонке (%)	(130/130) 100,0 %	(61/61) 100,0 %	(80/85) 94,1 %	(133/133) 100,0 %	(69/70) 98,6 %	(71/71) 100,0 %	-
(95 % ДИ) ^a	(97,1 %, 100 %)	(94,1 %, 100,0 %)	(87,0 %, 97,5 %)	(97,2 %, 100,0 %)	(92,3 %, 99,7 %)	(94,9 %, 100,0 %)	-

Примечание. ДИ — доверительный интервал; LLoQ — нижний предел количественного определения теста сравнения BКV LDT (200 МЕ/мл = 2,3 log₁₀ МЕ/мл). Стандартное отклонение для теста сравнения BКV LDT оценивается как 0,37 log₁₀ МЕ/мл (исследование аналитической воспроизводимости теста BКV LDT из Индианского университета). Концентрация анализируемого вещества 3,0 log₁₀ МЕ/мл соответствовала LLoQ + 2σ, 3,7 log₁₀ МЕ/мл соответствовала LLoQ + 4σ и 4,4 log₁₀ МЕ/мл соответствовала LLoQ + 6σ со значением интервала 2σ. В эту таблицу были включены парные образцы, подходящие для клинического анализа согласованности.

^a Предполагаемая независимость между всеми образцами.

Противоречивые результаты определялись как те, которые отстоят от диагонали более чем на один квадрат (обозначены затенением). Для согласованности в колонке «Target Not Detected» (Мишень не выявлена) (TND) для теста LDT ячейки «Target Not Detected» (Мишень не выявлена) и «< LLoQ (< 2,3)» для теста cobas® BКV были объединены. Обоснование добавления смежных ячеек < LLoQ и TND для колонки TND заключается в том, что разница между TND и < LLoQ не имеет клинического значения и что с точки зрения аналитики они находятся в нижней части диапазона измерения, на который может повлиять случайная ошибка.

Из 43 образцов, отрицательных по ДНК ВКВ, которые были собраны для оценки ПСО с тестом **cobas®** ВКВ, все 43 образца были отрицательными по результатам теста **cobas®** ВКВ, таким образом, значение ПСО составило 100 % при точном 95 % ДИ от 91,8 % до 100 %.

Согласованность между тестом **cobas®** ВКВ и тестом сравнения ВКВ LDT также была оценена с использованием различных клинических пороговых значений (Табл. 28).

Табл. 28 Обобщенные результаты оценки согласованности теста **cobas®** ВКВ и теста сравнения ВКВ LDT с помощью различных пороговых значений для всех образцов

Пороговые значения *	Процент согласованности < порогового значения	Процент согласованности ≥ порогового значения
	95 % ДИ (n/N)	95 % ДИ (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 МЕ/мл)	98,4 % (188/191) (95,5 %, 99,5 %)	87,7 % (315/359) (83,9 %, 90,7 %)
3,0 log ₁₀ МЕ/мл	99,6 % (275/276) (98,0 %, 99,9 %)	77,0 % (211/274) (71,7 %, 81,6 %)
4,0 log ₁₀ МЕ/мл	100,0 % (447/447) (99,1 %, 100,0 %)	67,0 % (69/103) (57,4 %, 75,3 %)

Примечание. Образцы с результатами «Target Not Detected» (Мишень не выявлена) были отнесены в категорию «< порогового значения в МЕ/мл».

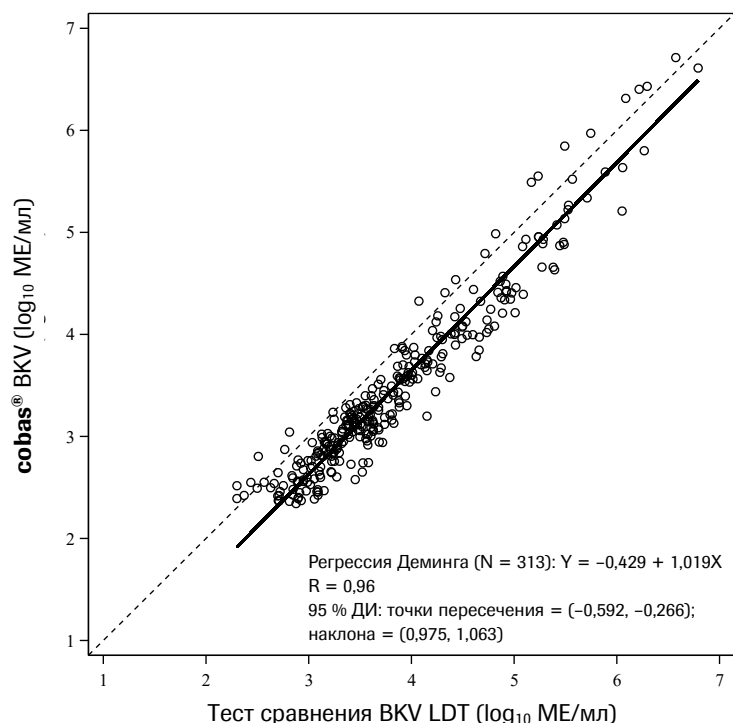
LLoQ — нижний предел количественного определения теста сравнения ВКВ LDT (200 МЕ/мл = 2,3 log₁₀ МЕ/мл).

95%-ный доверительный интервал (ДИ) рассчитан методом оценки, предполагающим независимость между образцами.

* Пороговые значения 1000 МЕ/мл = 3,0 log₁₀ МЕ/мл и 10 000 МЕ/мл = 4,0 log₁₀ МЕ/мл.

Из всех образцов, протестированных с использованием **cobas®** ВКВ, которые были признаны положительными по ВКВ при использовании теста сравнения ВКВ, было обнаружено 313 образцов (133 неразведенных и 159 разведенных клинических образцов от 68 субъектов после трансплантации и 21 искусственный образец), подходящих для корреляционного анализа в трех лабораториях (Рис. 9).

Рис. 9 Корреляция между тестом **cobas® BKV** и тестом сравнения BKV LDT для всех образцов: график линейной регрессии Деминга для уровней ДНК ($\log_{10}$ МЕ/мл)



Дополнительный анализ графика расхождений для уровней ДНК показал систематическое различие между обоими тестами, которое является постоянным в пределах перекрывающегося линейного диапазона. 95 % ДИ точки пересечения рассчитанной линии на графиках расхождений составил (от $-0,404$ до $-0,168$), что находится в пределах $\pm 0,74 \log_{10}$ МЕ/мл (± 2 -кратное стандартное отклонение аналитической воспроизводимости теста сравнения BKV LDT). Кроме того, среднее отклонение оценивалось как $-0,357 \log_{10}$ МЕ/мл, с использованием уравнения рассчитанной линии на графиках расхождений систематическая разница между обоими тестами составила $-0,343 \log_{10}$ МЕ/мл и $-0,362 \log_{10}$ МЕ/мл для образцов с уровнями ДНК 3 и $4 \log_{10}$ МЕ/мл соответственно.

Воспроизводимость теста **cobas® BKV** для образцов стабилизированной мочи

Воспроизводимость теста **cobas® BKV** была оценена по множеству факторов (лот набора реагентов, лаборатория, постановка и дни тестирования), которые могли повлиять на полученные результаты рутинного клинического тестирования. Оценка проводилась в 3 испытательных лабораториях с использованием 3 лотов набора реагентов панели из положительных и отрицательных образцов, в результате чего общее количество тестов на концентрацию составляло 270 (не включая контроли). Панели были подготовлены с использованием образцов мочи, стабилизированных в среде **cobas® PCR Media**, для которых был подтвержден отрицательный результат по ДНК BKV методом амплификации нуклеиновых кислот для мочи (NAT) в соответствии с протоколом и в которые внесли международный стандарт ВОЗ для BKV или ДНК культивированного вируса BKV с генотипом Ia. Два оператора в каждой лаборатории тестировали каждый лот набора реагентов на протяжении 5 дней. Каждый день выполнялось две постановки (1 тест = 1 постановка; 1 постановка = 1 панель + 3 контроля) с 3 повторами для каждого образца панели при каждой постановке. Результаты оценки приведены в Табл. 29.

Табл. 29 Процентные доли общей дисперсии (%ОВ), стандартное отклонение (СО) общей воспроизводимости и логнормальный КВ (%) концентрации ДНК ВКВ ($\log_{10}$ МЕ/мл) положительного образца панели (стабилизированная моча)

Ожидаемая концентрация ДНК ВКВ	Наблюдаемая сред. ^a концентрация ДНК ВКВ	Количество тестов ^b	Лот %ОВ ^b (КВ, %) ^г	Лаборатория %ОВ ^b (КВ, %) ^г	День/оператор %ОВ ^b (КВ, %) ^г	Постановка %ОВ ^b (КВ, %) ^г	Внутри постановки %ОВ ^b (КВ, %) ^г	Общая воспроизводимость СО ^д	Общая воспроизводимость КВ (%) ^г
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

Примечание. В таблице представлены только результаты с детектируемым уровнем ДНК. СО — стандартное отклонение; КВ — коэффициент вариации в процентах; ВКВ — вирус ВК.

^a Рассчитано с использованием процедуры SAS MIXED.

^b Количество валидных тестов с детектируемым уровнем ДНК.

^в %ОВ = процентный вклад в общую дисперсию.

^г КВ % = логнормальный процентный коэффициент вариации = кор. кв. $(10^{[CO^2 \times \ln(10)]} - 1) \times 100$.

^д С учетом общей вариации, полученной в ходе процедуры SAS MIXED.

Тест **cobas®** ВКВ показал приемлемую клиническую воспроизводимость для концентраций на протяжении линейного диапазона. Кроме того, система обнаружила 100 % образцов с концентрацией $3 \times \text{LLoQ}$. Обе системы, **cobas®** 6800 и **cobas®** 8800, имеют модульную конструкцию и продемонстрировали эквивалентность при использовании теста **cobas®** ВКВ. Все оцениваемые значения 95%-го доверительного интервала (ДИ) различий между 2 измерениями образцов от одного и того же субъекта находились в диапазоне $\pm 0,20 \log_{10}$ МЕ/мл, и это указывает на то, что с помощью теста можно оценить изменения уровней ДНК ВКВ, которые считаются клинически значимыми. Система показала процент согласованности отрицательных результатов 99,26 % с ДИ 97,3–99,9 %. Из 270 валидных тестов для отрицательных образцов панели для 2 образцов (0,74 %) был обнаружен уровень ДНК при $< \text{LLoQ}$ положительности. Дальнейшее изучение этих результатов показало, что они не были связаны с конкретным прибором/лабораторией или лотом набора реагентов. Дополнительное секвенирование ДНК подтвердило наличие ВКВ. Обнаруженные последовательности ВКВ отличались от последовательностей положительного контроля и штамма ВКВ, использованного для подготовки панели, исключая контаминацию во время подготовки панели и принимая во внимание наличие следов вирурии в одном из 25 образцов мочи в составе пулированного образца, который использовался для подготовки панели с отрицательными образцами.

Испытание теста cobas® BKV для образцов стабилизированной мочи

Клиническое испытание теста cobas® BKV было дополнительно проведено в трех лабораториях путем измерения уровней ДНК BKV в клинических образцах мочи инфицированных и не инфицированных BKV пациентов, которые были стабилизированы в среде cobas® PCR Media, в сравнении с хорошо зарекомендовавшим себя тестом LDT (тест сравнения BKV LDT).

Из всех образцов, протестированных с использованием cobas® BKV и теста сравнения BKV, в общей сложности 308 неразведенных образцов мочи, стабилизированной в среде cobas® PCR Media, от 84 субъектов после трансплантации были признаны валидными в ходе обоих тестов и подходящими для клинического анализа согласованности (Табл. 30).

Табл. 30 Анализ согласованности теста cobas® BKV и теста сравнения LDT по результатам определения уровня ДНК BKV ($\log_{10}$ МЕ/мл) для всех образцов (стабилизированной мочи)

cobas® BKV ($\log_{10}$ МЕ/мл)	Тест сравнения BKV LDT Target Not Detected	Тест сравнения BKV LDT < LLoQ (< 3,0)	Тест сравнения BKV LDT От 3,0 до < 3,3	Тест сравнения BKV LDT От 3,3 до < 3,6	Тест сравнения BKV LDT От 3,6 до 3,9	Тест сравнения BKV LDT > 3,9	Всего
Target Not Detected	62	6	0	0	0	0	68
< LLoQ (< 3,0)	4	22	0	0	0	1	27
От 3,0 до < 3,3	0	2	0	0	0	0	2
От 3,3 до < 3,6	0	0	6	3	0	0	9
От 3,6 до 3,9	0	0	2	11	10	0	23
> 3,9	0	0	0	2	8	169	179
Всего	66	30	8	16	18	170	308
Согласованность в колонке (%)	(66/66) 100,0 %	(30/30) 100,0 %	(6/8) 75,0 %	(14/16) 87,5 %	(18/18) 100,0 %	(169/170) 99,4 %	-
(95 % ДИ) ^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 %)	-

Примечание. ДИ — доверительный интервал; LLoQ — нижний предел количественного определения теста сравнения BKV LDT ($1000 \text{ МЕ/мл} = 3,0 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$); LDT — лабораторный тест собственной разработки; BKV — вирус ВК.

Стандартное отклонение для теста сравнения BKV LDT оценивается как $0,15 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$ (валидационное исследование теста сравнения BKV LDT).

Концентрация анализируемого вещества $3,3 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$ соответствовала $\text{LLoQ} + 2\sigma$, $3,6 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$ соответствовала $\text{LLoQ} + 4\sigma$ и $3,9 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$ соответствовала $\text{LLoQ} + 6\sigma$ со значением интервала 2σ .

В эту таблицу были включены парные образцы, подходящие для клинического анализа согласованности.

^a Предполагаемая независимость между всеми образцами.

В ходе секвенирования ДНК на репрезентативных образцах субъектов, результаты которых последовательно покрывались уровнем ДНК более чем $1 \log_{10}$ МЕ/мл, не было выявлено несовпадений последовательностей для каких-либо праймеров или зондов к мишеням теста **cobas® BKV**. Противоречивые результаты определялись как те, которые отстоят от диагонали более чем на один квадрат (обозначены затенением). Для согласованности в колонке «Target Not Detected» (Мишень не выявлена) (TND) для теста LDT ячейки «Target Not Detected» (Мишень не выявлена) и «< LLoQ (< 3,0)» для теста **cobas® BKV** были объединены. Обоснование добавления смежных ячеек < LLoQ и TND для колонки TND заключается в том, что разница между TND и < LLoQ не имеет клинического значения и что с точки зрения аналитики они находятся в нижней части диапазона измерения, на который может повлиять случайная ошибка. Из 66 образцов, отрицательных по ДНК BKV, которые были собраны для оценки ПСО с тестом **cobas® BKV**, для 61 были получены валидные результаты, и все из этих 61 образца были отрицательными при тестировании с использованием **cobas® BKV**, таким образом, значение ПСО составило 100 % при точном 95 % ДИ от 94,1 % до 100 %.

Согласованность между тестом **cobas® BKV** и тестом сравнения BKV LDT также была оценена с использованием различных клинических пороговых значений (Табл. 31).

Табл. 31 Обобщенные результаты оценки согласованности теста **cobas® BKV** и теста сравнения BKV LDT с использованием различных пороговых значений для всех образцов (стабилизированной мочи)

Пороговое значение *	Процент согласованности < пороговое значение 95 % ДИ (n/N)	Процент согласованности ≥ пороговое значение 95 % ДИ (n/N)
Target Not Detected	93,9 % (62/66) (85,4 %, 97,6 %)	97,5 % (236/242) (94,7 %, 98,9 %)
LLoQ (3,0 $\log_{10}$ МЕ/мл)	97,9 % (94/96) (92,7 %, 99,4 %)	99,5 % (211/212) (97,4 %, 99,9 %)
4,0 $\log_{10}$ МЕ/мл	90,9 % (130/143) (85,1 %, 94,6 %)	99,4 % (164/165) (96,6 %, 99,9 %)
7,0 $\log_{10}$ МЕ/мл	97,2 % (242/249) (94,3 %, 98,6 %)	94,9 % (56/59) (86,1 %, 98,3 %)

Примечание. Образцы с результатами «Target Not Detected» (Мишень не выявлена) были отнесены в категорию «< порогового значения в МЕ/мл».

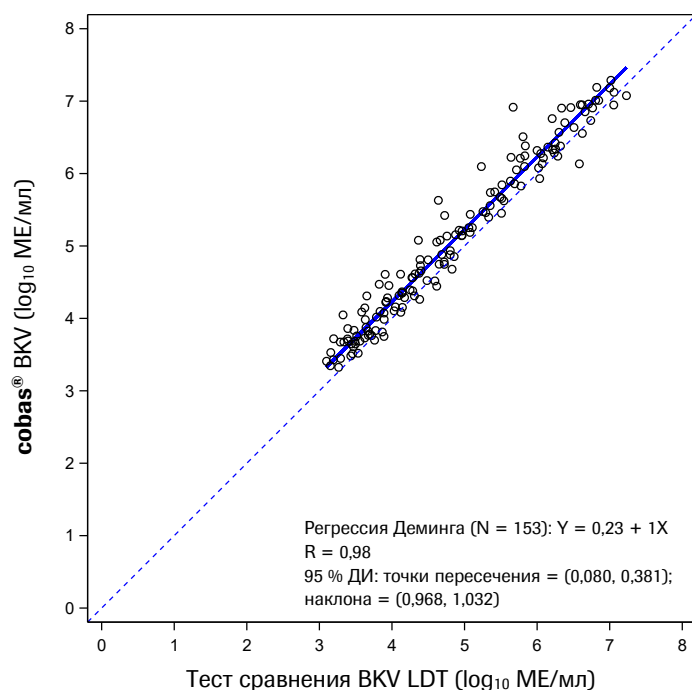
LLoQ — нижний предел количественного определения теста сравнения BKV LDT ($1000 \text{ МЕ/мл} = 3,0 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$).

95%-ный доверительный интервал (ДИ) рассчитан методом оценки, предполагающим независимость между образцами.

* Пороговые значения $10\,000 \text{ МЕ/мл} = 4,0 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$ и $10\,000\,000 \text{ МЕ/мл} = 7,0 \log_{10} \text{ МЕ/мл}$.

Из всех образцов, протестированных с использованием **cobas® BKV**, которые были положительными по BKV по результатам теста сравнения BKV, было обнаружено 153 неразведенных образца мочи, стабилизированной в среде **cobas® PCR Media**, от 55 субъектов после трансплантации, подходящих для корреляционного анализа в трех лабораториях (Рис. 10).

Рис. 10 Корреляция между тестом **cobas®** BKV и тестом сравнения BKV LDT для всех образцов: график линейной регрессии Деминга для уровней ДНК ($\log_{10}$ МЕ/мл) (образцы стабилизированной мочи)



Дополнительный анализ графика расхождений для уровней ДНК показал систематическое различие между обоими тестами, которое является постоянным в пределах перекрывающегося линейного диапазона. 95 % ДИ точки пересечения подогнанной линии на графике расхождений составил (от 0,168 до 0,488), что находится в пределах $\pm 0,5 \log_{10}$ МЕ/мл. Кроме того, среднее отклонение оценивалось как $0,231 \log_{10}$ МЕ/мл, с использованием уравнения рассчитанной линии на графиках расхождений систематическая разница между обоими тестами составила $0,248 \log_{10}$ МЕ/мл и $0,188 \log_{10}$ МЕ/мл для образцов с уровнями ДНК $4 \log_{10}$ МЕ/мл и $7 \log_{10}$ МЕ/мл соответственно.

Эквивалентность/сравнение систем

Эквивалентность систем **cobas®** 5800, **cobas®** 6800 и **cobas®** 8800 была подтверждена исследованиями рабочих характеристик. Результаты, приведенные в инструкциях по применению, подтверждают одинаковые рабочие характеристики для всех систем.

Дополнительная информация

Основные характеристики теста

Тип образцов	Плазма с ЭДТА	Моча, стабилизированная в cobas® PCR Media
Минимальный необходимый объем образца	350 мкл*	550 мкл*
Обрабатываемый объем образца	200 мкл	400 мкл
Аналитическая чувствительность	21,5 МЕ/мл (двусторонний 95%-ный доверительный интервал: 16,3–32,4 МЕ/мл)	12,2 МЕ/мл (двусторонний 95%-ный доверительный интервал: 9,2–18,3 МЕ/мл)
Линейный диапазон	21,5 МЕ/мл – 1E+08 МЕ/мл	200 МЕ/мл – 1E+08 МЕ/мл
Специфичность	100 %	100 %
Обнаруживаемые субтипы	Субтипы I (включая подгруппы Ia, Ib и Ic), II, III и IV BКV	

* Для вторичных пробирок **cobas® omni** определен мертвый объем 150 мкл. У других пробирок, используемых для тестирования, может быть иной мертвый объем, и требуемый минимальный объем может быть больше или меньше. Обратитесь к местному представителю сервисной службы Roche за дополнительной информацией.

Условные обозначения

Приведенные ниже символы применяются для маркировки продукции для ПЦР-диагностики компании Roche.

Табл. 32 Символы, применяемые для маркировки продукции для ПЦР-диагностики компании Roche

Age/DOB	Возраст или дата рождения		Устройство не для исследования по месту лечения	QS IU/PCR	МЕ КС на ПЦР-реакцию; при подсчете результатов значения представляйте в виде Международных единиц (МЕ) КС на ПЦР-реакцию.
	Вспомогательное программное обеспечение		Устройство не предназначено для самостоятельного тестирования	SN	Серийный номер
Assigned Range [copies/mL]	Заданный диапазон (копий/мл)		Дистрибьютер (Примечание. Соответствующая страна/регион могут быть указаны под символом.)	Site	Лаборатория
Assigned Range [IU/mL]	Заданный диапазон (МЕ/мл)		Не использовать повторно	Procedure Standard	Стандартная процедура
EC REP	Авторизованный представитель в Европейском сообществе		Женский	STERILE EO	Стерилизовано этиленоксидом
BARCODE	Список штрихкодов		Только для испытаний IVD		Хранить в темноте
LOT	Номер лота	GTIN	Глобальный номер товара		Температурный диапазон
	Биологическая опасность		Импортёр		Файл с описанием теста
REF	Номер по каталогу	IVD	Медицинское устройство для диагностики <i>in vitro</i>		Этой стороной вверх
	СЕ маркировка соответствия требованиям ЕС — это изделие соответствует применимым требованиям для выдачи сертификата в ЕС на медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>	LLR	Нижний предел заданного диапазона	Procedure UltraSensitive	Сверхчувствительная процедура
Collect Date	Дата сбора		Мужской	UDI	Уникальный идентификатор устройства
	Обратитесь к инструкции		Производитель	ULR	Верхний предел заданного диапазона
	Рассчитано на <n> тестов	CONTROL -	Отрицательный контроль	Urine Fill Line	Линия заполнения мочой
CONTENT	Состав набора		Нестерильно	Rx Only	Только для США. Федеральное законодательство ограничивает право продажи данного устройства терапевтом или по его рецепту.
CONTROL	Контроль		Ф. И. О. пациента		Использовать до
	Дата производства		Номер пациента		
	Устройство для исследования по месту лечения		Оторвите здесь		
	Устройство для самостоятельного тестирования	CONTROL +	Положительный контроль		
		QS copies / PCR	Копии количественного стандарта (КС) на ПЦР-реакцию; при подсчете результатов значения представляйте в виде копий КС на ПЦР-реакцию.		

Техническая поддержка

Для получения технической поддержки (помощи) обратитесь в местный филиал в вашем регионе:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Производитель и импортёр

Табл. 33 Производитель и импортёр



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

Сделано в США



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Товарные знаки и патенты

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

Авторское право

© Roche Molecular Systems, Inc., 2023.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Литература

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.

Редакция документа

Сведения о редакции документа	
Doc Rev. 2.0 09/2022	На титульный лист и в таблицы 2 и 3 добавлены новые P/N наборов контролей. Обновлен раздел Товарные знаки и патенты, в том числе ссылка. В случае возникновения вопросов свяжитесь с местным представительством компании Roche.
Doc Rev. 3.0 05/2023	Минимальный объем образца возвращен к исходному уровню в Инструкции по применению и в разделе Основные характеристики теста. Обновлена рекомендация по обращению в местный уполномоченный орган. В Табл. 20 добавлена недостающая сноска. Незначительные лексические правки. Обновлено фирменное оформление cobas®. В случае возникновения вопросов свяжитесь с местным представительством компании Roche.

С кратким отчетом по безопасности и эффективности можно ознакомиться по следующей ссылке:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.