

cobas[®] **EBV**

Test quantitativo degli acidi nucleici per l'uso sui cobas[®] 5800/6800/8800 Systems

Per uso diagnostico *in vitro*

cobas[®] **EBV**

P/N: 09040943190

Per l'utilizzo sul sistema cobas[®] 5800

cobas[®] **EBV/BKV Control Kit**

P/N: 09040951190

cobas[®] **Buffer Negative Control Kit**

P/N: 09051953190

Per l'utilizzo sui sistemi cobas[®] 6800/8800

cobas[®] **EBV/BKV Control Kit**

P/N: 08688214190 oppure
P/N: 09040951190

cobas[®] **Buffer Negative Control Kit**

P/N: 07002238190 oppure
P/N: 09051953190

Indice generale

Uso previsto	4
Riassunto e spiegazione del test.....	4
Reagenti e materiali	7
Reagenti e controlli cobas® EBV	7
Reagenti cobas® omni per la preparazione dei campioni	10
Requisiti per la conservazione dei reagenti.....	11
Requisiti per la manipolazione dei reagenti per il cobas® 5800 System	12
Requisiti per la manipolazione dei reagenti per i cobas® 6800/8800 Systems	12
Altri materiali necessari per il cobas® 5800 System	13
Altri materiali necessari per i cobas® 6800/8800 Systems	13
Strumentazione e software necessari.....	14
Precauzioni e requisiti per l'uso.....	15
Avvertimenti e precauzioni.....	15
Manipolazione dei reagenti.....	16
Buone pratiche di laboratorio.....	16
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni	17
Campioni.....	17
Istruzioni per l'uso.....	18
Note sulla procedura.....	18
Esecuzione del test cobas® EBV sul cobas® 5800 System	19
Esecuzione del test cobas® EBV sui cobas® 6800/8800 Systems	20
Risultati	21
Controllo di qualità e validità dei risultati sul cobas® 5800 System	21
Risultati dei controlli sul cobas® 5800 System	21
Controllo di qualità e validità dei risultati sui cobas® 6800/8800 Systems	21
Flag dei controlli sui cobas® 6800/8800 Systems	22

Interpretazione dei risultati	22
Interpretazione dei risultati sul cobas ® 5800 System.....	23
Interpretazione dei risultati sui cobas ® 6800/8800 Systems	23
Limiti della procedura	23
Valutazione delle prestazioni non cliniche	24
Caratteristiche delle prestazioni chiave sui cobas ® 6800/8800 Systems	24
Limite di sensibilità (LoD).....	24
Intervallo lineare	25
Precisione intra-laboratorio	26
Verifica del genotipo	27
Specificità	27
Specificità analitica	28
Specificità analitica e sostanze interferenti.....	28
Correlazione tra i metodi.....	30
Tasso globale d'errore del sistema	30
Contaminazione crociata.....	30
Valutazione delle prestazioni cliniche eseguita sui cobas® 6800/8800 Systems	31
Riproducibilità del test cobas ® EBV	31
Prestazioni del test cobas ® EBV	32
Equivalenza dei sistemi / confronto tra sistemi.....	34
Informazioni supplementari.....	35
Caratteristiche del test	35
Simboli.....	36
Assistenza tecnica.....	37
Produttore e importatore	37
Marchi e brevetti	37
Copyright.....	37
Bibliografia	38
Revisione del documento	39

Uso previsto

Il test **cobas**® EBV consente l'amplificazione *in vitro* degli acidi nucleici per la quantificazione del DNA del virus di Epstein-Barr (EBV) nel plasma EDTA umano sui **cobas**® 5800/6800/8800 Systems.

Il test **cobas**® EBV è destinato all'uso per la diagnosi e la gestione del virus EBV nei pazienti trapiantati. Nei pazienti sottoposti a monitoraggio dell'EBV, le misurazioni seriali del DNA possono servire a indicare la necessità di potenziali variazioni della terapia e a valutare la risposta virale alla terapia in atto.

I risultati generati dal test **cobas**® EBV devono essere interpretati contestualmente a tutti i dati clinici rilevanti e ai riscontri di laboratorio.

Riassunto e spiegazione del test

Premessa

I pazienti trapiantati sono esposti a un maggiore rischio di contrarre molte infezioni virali e batteriche che possono avere effetti negativi sulla salute più gravi per la popolazione di pazienti trapiantati rispetto alla popolazione sana. Il maggiore rischio è parzialmente imputabile al ridotto funzionamento del sistema immunitario, causato dai farmaci immunosoppressori che i pazienti trapiantati devono assumere per ridurre le probabilità di rigetto del trapianto.^{1,2}

L'EBV appartiene alla famiglia degli herpesvirus. È un virus a DNA (acido desossiribonucleico) con pericapside, a doppio filamento (circa 172 kilobasi). Il virus EBV ha due genotipi (tipo 1 e tipo 2) che sono definiti dalle differenze nel gene EBNA-2. Le infezioni da EBV sono piuttosto comuni negli essere umani. Oltre il 90% degli adulti è infetto e l'infezione latente persiste per tutta la vita. L'EBV causa la mononucleosi infettiva in un sottoinsieme di adolescenti e adulti che contraggono l'infezione per la prima volta ed è associato a diversi tipi di cancro, tra cui il carcinoma nasofaringeo, il linfoma di Burkitt e il linfoma di Hodgkin. L'EBV può essere all'origine dei disordini linfoproliferativi nei pazienti con immunodeficienza congenita o acquisita, inclusi i riceventi di trapianto e i pazienti con infezione da virus dell'immunodeficienza umana/sindrome da immunodeficienza acquisita (HIV/AIDS).³

Nei riceventi di trapianto, l'EBV può causare la malattia tramite la riattivazione di virus latente dai linfociti B di memoria o tramite una nuova infezione primaria, specialmente nei riceventi EBV-negativi che ricevono il trapianto/innesto da donatori EBV-positivi.³ Per questi pazienti, la forma più grave di patologia associata all'EBV è la malattia linfoproliferativa post-trapianto (post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLD), che causa una proliferazione incontrollata dei linfociti, generalmente del tipo B.⁴ Nel complesso, l'infezione da EBV è collegata a oltre il 70% dei casi di PTLD. Il rischio più alto di contrarre la PTLD si registra nel primo anno successivo al trapianto, infatti è in questo periodo che si registrano oltre il 90% dei casi di PTLD collegati all'EBV. Dopo il primo anno post-trapianto, fino al 20% dei casi di PTLD è EBV-negativo.^{4,5}

Per quanto riguarda la PTLD a esordio precoce, i fattori di rischio sono il sierostato EBV-negativo del ricevente al momento del trapianto; la giovane età; l'esposizione ad anticorpi linfocitotossici; il tipo di organo trapiantato.^{5,6}

La diagnosi precoce delle infezioni primarie da EBV e il monitoraggio del livello del DNA possono favorire un intervento terapeutico tempestivo per prevenire la progressione in malattia correlata al virus EBV. Le linee guida suggeriscono di monitorare l'EBV con regolarità eseguendo i test quantitativi degli acidi nucleici (test NAT), specialmente nei riceventi che sono EBV-negativi in pazienti ad alto rischio.^{4,5} A causa della variabilità tra i saggi, è ancora oggetto di dibattito quale sia la soglia virale significativa dal punto di vista medico. Ciononostante, il concetto di soglia critica è valido ed è riportato

negli studi di storia naturale per mostrare una correlazione tra livelli più alti di DNA di EBV e maggiore rischio di sviluppare l'infezione da EBV e la PTLD.^{4,5,7} Per eseguire i test dell'EBV sono stati utilizzati sia il plasma che il sangue intero, ma in base ai dati il plasma sembra essere il tipo di campione più specifico per individuare la PTLD.^{4,5,7,8}

Tra gli interventi terapeutici che riducono i livelli del DNA di EBV e prevengono l'esordio della PTLD, i più comuni sono la riduzione delle dosi dei farmaci immunosoppressivi e della terapia con anticorpi linfocitotossici che agiscono sui linfociti B.⁷ La terapia preventiva per ridurre i livelli del DNA di EBV funziona nella maggior parte dei casi, anche se il 20% dei pazienti potrebbe ancora sviluppare la PTLD, in particolare se è trascorso più di un anno dal trapianto.⁷

Molti test di laboratorio per la quantificazione dell'EBV non sono standardizzati e questo fatto comporta una certa variabilità dei risultati relativi ai livelli di DNA tra i laboratori e tra i saggi. Ciò impedisce di confrontare i livelli di DNA generati da laboratori e test diversi.⁷ Per rimediare a questo problema, l'OMS ha creato uno Standard Internazionale per la quantificazione del virus EBV, che consente la standardizzazione dei test e la refertazione in UI/ml.⁹ La valutazione formale della riproducibilità e della validità dei livelli del DNA di EBV è fondamentale per poter garantire la coerenza tra i risultati dei diversi laboratori e di conseguenza per migliorare la gestione clinica dei pazienti a maggiore rischio di sviluppare le patologie correlate all'EBV e la PTLD.

Perché utilizzare i test degli acidi nucleici

Prima del trapianto vengono rilevate le sierologie EBV del donatore e del ricevente, così da determinare il rischio di complicazioni correlate all'EBV a cui va incontro il paziente trapiantato. Tuttavia la sensibilità e la precisione della sierologia non è sufficiente per il monitoraggio post-trapianto dei pazienti. I metodi basati sulle colture di EBV sono lenti e hanno un basso valore predittivo in questo contesto. La rilevazione diretta del DNA di EBV mediante PCR real-time è potenzialmente il metodo che garantisce un ampio intervallo dinamico, precisione ed elevate sensibilità e specificità.

Spiegazione del test

Il test quantitativo cobas® EBV può essere eseguito sui cobas® 5800/6800/8800 Systems. Il test cobas® EBV consente di rilevare e quantificare il DNA di EBV nei campioni di plasma EDTA di pazienti infetti. La carica virale viene quantificata rispetto ad uno standard di quantificazione costituito da DNA non EBV (DNA-QS), che viene introdotto in ogni campione nella fase di preparazione. Il DNA-QS svolge inoltre un ruolo di controllo dell'intero processo di preparazione dei campioni e amplificazione PCR. Il test utilizza inoltre tre controlli esterni: un titolo positivo alto, un titolo positivo basso e un controllo negativo. I controlli esterni positivo alto e positivo basso vengono prodotti mediante diluizione da materiale stock con un titolo tracciabile rispetto allo Standard Internazionale dell'OMS per il EBV. Ogni lotto del kit di amplificazione/rilevazione è calibrato in modo tracciabile rispetto allo Standard Internazionale dell'OMS per il EBV.

Principi della procedura

Il test cobas® EBV si basa su una procedura completamente automatizzata per la preparazione dei campioni (estrazione e purificazione degli acidi nucleici) e sulla successiva amplificazione e rilevazione mediante PCR. Il cobas® 5800 System è progettato come strumento unico integrato. I cobas® 6800/8800 Systems sono costituiti dal modulo di inserimento dei campioni, dal modulo di trasferimento, dal modulo di preparazione e dal modulo analitico. La gestione automatizzata dei dati viene eseguita dal Software cobas® 5800 o cobas® 6800/8800 System, che assegna i risultati dei test come “Target not detected” (target non rilevato), “EBV DNA detected < LLoQ” (rilevato DNA di EBV al di sotto del limite inferiore di quantificazione), “EBV DNA detected > ULoQ” (rilevato DNA di EBV al di sopra del limite superiore di quantificazione)

o un valore compreso nell'intervallo lineare "LLOQ < x < ULOQ". I risultati possono essere visualizzati direttamente sullo schermo del sistema, esportati o stampati in un report.

Gli acidi nucleici ottenuti dai campioni dei pazienti e le molecole aggiunte di DNA-QS del lambda vengono estratti simultaneamente. In sintesi, l'acido nucleico virale viene liberato aggiungendo nel campione la proteinasi e il reagente di lisi. L'acido nucleico liberato si lega quindi alla superficie di silice delle biglie di vetro magnetiche aggiunte. Le sostanze che non formano legami e le impurità (ad esempio le proteine denaturate, i detriti cellulari e i potenziali inibitori della PCR) vengono rimosse con il reagente di lavaggio nei passaggi successivi e l'acido nucleico purificato viene eluito dalle biglie di vetro con il tampone di eluizione a temperature elevate.

È possibile ottenere l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target dal campione utilizzando un approccio virus-specifico a doppio target dalle regioni altamente conservate dell'EBV, localizzate nel gene EBV EBNA-1 e nel gene EBV BMRF. È possibile ottenere l'amplificazione selettiva dello standard di quantificazione DNA-QS utilizzando dei primer forward e reverse sequenza-specifici, che vengono selezionati in modo tale da non presentare nessuna omologia con il genoma dell'EBV. Un enzima DNA polimerasi termostabile viene utilizzato per l'amplificazione. Le sequenze del target virale e dello standard DNA-QS vengono amplificate simultaneamente, utilizzando un profilo di amplificazione PCR universale con valori predefiniti per temperatura e numero di cicli. La soluzione Master Mix contiene trifosfato di deossiridina (dUTP) anziché trifosfato di deossitimidina (dTTP), che è incorporato nel DNA appena sintetizzato (amplicone).¹⁰⁻¹² L'eventuale amplicone contaminante prodotto da sessioni di PCR precedenti viene distrutto dall'enzima AmpErase, contenuto nella miscela per PCR, quando viene riscaldato nel primo passaggio del ciclo termico. Gli ampliconi che si sono appena formati non vengono invece eliminati perché l'enzima AmpErase si inattiva dopo l'esposizione a temperature superiori a 55°C.

La soluzione Master Mix **cobas**® EBV contiene due sonde di rilevazione specifiche per le sequenze target di EBV e una sonda per il DNA-QS. Le sonde sono marcate con fluorocromi reporter specifici per i target, in modo da consentire la rilevazione simultanea del target EBV e del DNA-QS in due diversi canali.^{13,14} Il segnale fluorescente delle sonde intatte è soppresso dal fluorocromo quencher. Nella fase di amplificazione mediante PCR, la sonda ibridizza con gli stampi specifici di DNA a filamento unico e viene scissa dall'attività nucleasica in direzione 5'→3' della DNA polimerasi, con la conseguente separazione dei fluorocromi reporter e quencher e la produzione di un segnale fluorescente. Con ogni ciclo di PCR viene generata una quantità crescente di sonde scisse e, parallelamente, si assiste all'aumento del segnale cumulativo del fluorocromo reporter. È possibile ottenere la rilevazione real-time e la discriminazione dei prodotti della PCR misurando la fluorescenza dei fluorocromi reporter liberati, che rappresentano rispettivamente i target virali e il DNA-QS.

Reagenti e materiali

Reagenti e controlli cobas® EBV

I materiali forniti per il test cobas® EBV sono elencati nella Tabella 1. I materiali necessari ma non forniti sono elencati dalla Tabella 2 alla Tabella 4 e dalla Tabella 8 alla Tabella 9.

Per informazioni sui pericoli relativi al prodotto, consultare i paragrafi **Reagenti e materiali** e **Precauzioni e requisiti per l'uso**.

Tabella 1 cobas® EBV

cobas® EBV

Conservare a 2-8°C

Cassetta per 192 test (P/N 09040943190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit 192 test
Soluzione proteinasi (PASE)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, cloruro di calcio, acetato di calcio, 8% proteinasi, glicerolo EUH210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. EUH208: Contiene subtilisina da <i>Bacillus subtilis</i> . Può provocare una reazione allergica.	22,3 ml
Standard di quantificazione DNA (DNA QS)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% Costrutto di DNA non EBV contenente una regione di legame per il primer non EBV e una regione di legame univoca per la sonda (DNA non infettivo), < 0,002% Poly rA RNA (sintetico), < 0,1% sodio azide	21,2 ml
Tampone di eluizione (EB)	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	21,2 ml
Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	7,5 ml
EBV Master Mix Reagente 2 (EBV MMX-R2)	Tampone tricina, acetato di potassio, < 18% dimetilsolfossido, glicerolo, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% primer upstream e downstream EBV, < 0,01% primer forward e reverse QS, < 0,01% sonde oligonucleotidiche fluorescenti specifiche per EBV e per QS di EBV, < 0,01% aptamero oligonucleotidico, < 0,01% DNA polimerasi Z05D, < 0,10% enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), < 0,1% sodio azide	9,7 ml

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

Conservare a 2-8°C

Per l'utilizzo sul sistema **cobas®** 5800 (P/N 09040951190)Per l'utilizzo sui sistemi **cobas®** 6800/8800 (P/N 08688214190 o P/N 09040951190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo positivo basso EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001% DNA sintetico (plasmide) di EBV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago Lambda, plasma umano normale, DNA di EBV non rilevabile con le metodiche PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  <p>AVVERTIMENTO</p> <p>H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/ gli aerosol. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 Massa di reazione di: metilcloroisotiazolinone 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one e metilisotiazolinone 2-metil-2H-isotiazol-3-one (3:1).</p>
Controllo positivo alto EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001% DNA sintetico (plasmide) di EBV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofago Lambda, plasma umano normale, DNA di EBV non rilevabile con le metodiche PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  <p>AVVERTIMENTO</p> <p>H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/ gli aerosol. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 Massa di reazione di: metilcloroisotiazolinone 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one e metilisotiazolinone 2-metil-2H-isotiazol-3-one (3:1).</p>

* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

** Sostanza o miscela pericolosa.

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

Conservare a 2-8°C

Per l'utilizzo sul sistema cobas® 5800 (P/N 09051953190)

Per l'utilizzo sui sistemi cobas® 6800/8800 (P/N 07002238190 o P/N 09051953190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit
cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)	Tampone Tris, < 0,1% sodio azide, EDTA, 0,002% Poly rA RNA (sintetico)	16 ml (16 × 1 ml)

Reagenti cobas® omni per la preparazione dei campioni

Tabella 4 Reagenti cobas® omni per la preparazione dei campioni

Reagenti	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Conservare a 2-8°C (P/N 06997546190)	Biglie di vetro magnetiche, tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	480 test	Non applicabile
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservare a 2-8°C (P/N 06997511190)	Tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	4 × 875 ml	Non applicabile
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Conservare a 2-8°C (P/N 06997538190)	43% (p/p) guanidina tiocianato**, 5% (p/v) polidocanolo**, 2% (p/v) ditiotreitolo**, citrato di sodio diidrato	4 × 875 ml	 <p>PERICOLO</p> <p>H302 + H332: Nocivo se ingerito o inalato. H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito. P303 + P361 + P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle. P304 + P340 + P310: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P305 + P351 + P338 + P310: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito. 593-84-0 Guanidina tiocianato 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo</p>
cobas® omni Wash Reagent (WASH) Conservare a 15-30°C (P/N 06997503190)	Citrato di sodio diidrato, 0,1% metil-4 idrossibenzoato	4,2 l	Non applicabile

* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

** Sostanza o miscela pericolosa.

Requisiti per la conservazione dei reagenti

I reagenti devono essere conservati e manipolati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 5, Tabella 6 alla Tabella 7.

I reagenti che non sono ancora stati caricati sul **cobas**® 5800 System o sui **cobas**® 6800/8800 Systems devono essere conservati alla temperatura indicata nella Tabella 5.

Tabella 5 Conservazione dei reagenti (non ancora caricati sul sistema)

Reagente	Temperatura di conservazione
cobas ® EBV	2-8°C
cobas ® EBV/BKV Control Kit	2-8°C
cobas ® Buffer Negative Control Kit	2-8°C
cobas ® omni Lysis Reagent	2-8°C
cobas ® omni MGP Reagent	2-8°C
cobas ® omni Specimen Diluent	2-8°C
cobas ® omni Wash Reagent	15-30°C

Requisiti per la manipolazione dei reagenti per il cobas® 5800 System

Dopo il caricamento sul cobas® 5800 System, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. Il sistema consente l'utilizzo dei reagenti soltanto se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 6. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. Nella Tabella 6 vengono fornite all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per il cobas® 5800 System.

Tabella 6 Scadenza dei reagenti sul cobas® 5800 System

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo
cobas® EBV	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 36 giorni**
cobas® EBV/BKV Control Kit	Data non superata	Non applicabile*	Non applicabile	Max 36 giorni**
cobas® Buffer Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile*	Non applicabile	Max 36 giorni**
cobas® omni Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile
cobas® omni MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile
cobas® omni Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile
cobas® omni Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile

* Reagenti monouso.

** Il calcolo inizia dalla prima volta che il reagente viene caricato sul cobas® 5800 System.

Requisiti per la manipolazione dei reagenti per i cobas® 6800/8800 Systems

Dopo il caricamento sui cobas® 6800/8800 Systems, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. I cobas® 6800/8800 Systems consentono l'uso dei reagenti solo se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 7. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. La Tabella 7 fornisce all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per i cobas® 6800/8800 Systems.

Tabella 7 Scadenza dei reagenti sui cobas® 6800/8800 Systems

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo (tempo cumulativo a bordo fuori dal frigorifero)
cobas® EBV	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 40 ore
cobas® EBV/BKV Control Kit	Data non superata	Non applicabile*	Non applicabile	Max 8 ore
cobas® Buffer Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile*	Non applicabile	Max 10 ore
cobas® omni Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile
cobas® omni MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile
cobas® omni Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile
cobas® omni Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento**	Non applicabile	Non applicabile

* Reagenti monouso.

** Il calcolo inizia dalla prima volta che il reagente viene caricato sui cobas® 6800/8800 Systems.

Altri materiali necessari per il cobas® 5800 System

Tabella 8 Materiali e consumabili per l'utilizzo sul cobas® 5800 System

Materiale	P/N
cobas® omni Processing Plate 24	08413975001
cobas® omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas® omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Puntale CORE TIPS con filtro, 1 ml	04639642001
Puntale CORE TIPS con filtro, 300 µl	07345607001
cobas® omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto	07435967001 oppure 08030073001
Provette secondarie cobas® omni 13 × 75 (opzionali)*	06438776001

* Contattare il rappresentante Roche locale per richiedere un listino dettagliato dei rack per campioni.

Altri materiali necessari per i cobas® 6800/8800 Systems

Tabella 9 Materiali e consumabili per l'uso sui cobas® 6800/8800 Systems

Materiale	P/N
cobas® omni Processing Plate	05534917001
cobas® omni Amplification Plate	05534941001
cobas® omni Pipette Tips	05534925001
cobas® omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi e Contenitore per rifiuti solidi oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto e Kit di aggiornamento del cassetto per rifiuti solidi	07435967001 e 07094361001 oppure 08030073001 e 08387281001

Strumentazione e software necessari

Il software del **cobas**® 5800 System e il pacchetto di analisi **cobas**® EBV per il **cobas**® 5800 System devono essere installati sugli strumenti **cobas**® 5800. Il software Data Manager e il PC per il **cobas**® 5800 System verranno forniti con il sistema.

Il software **cobas**® 6800/8800 e il pacchetto di analisi **cobas**® EBV devono essere installati sugli strumenti. Il server IG (Instrument Gateway) verrà fornito con il sistema.

Tabella 10 Strumentazione

Apparecchiatura	P/N
cobas ® 5800 System	08707464001
cobas ® 6800 System (opzione mobile)	06379672001
cobas ® 6800 System (fisso)	05524245001
cobas ® 8800 System	05412722001
Modulo di inserimento dei campioni	06301037001

Per ulteriori informazioni, consultare l'Assistenza Utente o le Guide per l'utente del **cobas**® 5800 System o dei **cobas**® 6800/8800 Systems.

Nota: contattare il rappresentante Roche locale per richiedere un listino dettagliato delle provette campione primarie e secondarie, dei rack per campioni, dei rack per puntali otturati e dei vassoi portarack accettati sugli strumenti.

Precauzioni e requisiti per l'uso

Avvertimenti e precauzioni

Come richiesto per qualsiasi procedura di analisi, per lo svolgimento di questo test è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio. Data l'elevata sensibilità di questo test, fare attenzione ad evitare la contaminazione dei reagenti e delle miscele di amplificazione.

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Il test **cobas**® EBV non è approvato per l'uso come test di screening per la presenza di EBV in sangue ed emoderivati.
- Tutti i campioni dei pazienti devono essere manipolati come materiale a rischio biologico, seguendo le buone procedure di laboratorio descritte in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e nel documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).^{15,16} Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test **cobas**® EBV e dei **cobas**® 5800/6800/8800 Systems.
- Tutti i materiali di origine umana devono essere considerati a rischio biologico e quindi manipolati adottando precauzioni universalmente valide. In caso di fuoriuscita accidentale, disinfettare immediatamente l'area con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio o di potassio allo 0,6% in acqua distillata o deionizzata oppure seguire le procedure previste dal proprio laboratorio.
- Il prodotto **cobas**® EBV/BKV Control Kit contiene plasma derivato da sangue umano. Il materiale di origine è stato analizzato con metodiche PCR e non conteneva tracce apprezzabili di bassi livelli di DNA di EBV. Allo stato attuale, tuttavia, nessun metodo di analisi garantisce con assoluta certezza che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano agenti infettivi.
- **Non congelare il sangue intero o i campioni conservati in tubi primari.**
- Per garantire prestazioni ottimali del test, utilizzare soltanto i consumabili forniti o consigliati.
- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) possono essere richieste al rappresentante Roche locale.
- Per un corretto svolgimento del test, attenersi scrupolosamente alle procedure e alle linee guida approvate. Qualunque deviazione dalle procedure e dalle linee guida approvate potrebbe compromettere le prestazioni del test.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione dell'effetto carryover durante la manipolazione e la preparazione dei campioni.
- Dato che > 90% degli adulti sono portatori cronici di EBV, nella cui saliva potrebbero annidarsi fino a 10⁸ copie/mL di EBV, e data l'elevata sensibilità del test, è importante adottare misure adeguate per il controllo della contaminazione nei laboratori.¹⁷
- In caso di un grave incidente verificatosi durante l'uso di questo test, segnalarlo alla propria autorità competente locale e al produttore.

Manipolazione dei reagenti

- Manipolare tutti i reagenti, i controlli e i campioni seguendo le buone pratiche di laboratorio, al fine di prevenire il carryover dei campioni e dei controlli.
- Prima dell'uso ispezionare visivamente ogni cassetta dei reagenti, del diluente, del reagente di lisi e del reagente di lavaggio per confermare l'assenza di perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.
- Il **cobas® omni** Lysis Reagent contiene guanidina tiocianato, una sostanza chimica potenzialmente pericolosa. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni.
- I kit **cobas® EBV** Test, **cobas® omni** MGP Reagent e **cobas® omni** Specimen Diluent contengono sodio azide come conservante. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita dei reagenti, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- Evitare che il **cobas® omni** Lysis Reagent, contenente guanidina tiocianato, entri in contatto con la soluzione tiocianato di guanidinio di ipoclorito di sodio (candeggina). L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.
- Smaltire tutti i materiali entrati in contatto con i campioni e i reagenti nel rispetto dei regolamenti previsti a livello locale, nazionale e internazionale.

Buone pratiche di laboratorio

- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro designate.
- Indossare guanti, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit. Per prevenire eventuali contaminazioni, è necessario sostituire i guanti quando si manipolano i campioni, i kit del test **cobas® EBV**, i controlli EBV/BKV Low Positive Control (EBV/BKV L(+))C) ed EBV/BKV High Positive Control (EBV/BKV H(+))C), il controllo negativo **cobas®** Buffer Negative Control (BUF (-) C) e i reagenti **cobas® omni**. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli.
- Lavare accuratamente le mani dopo avere manipolato i reagenti dei kit e dopo aver rimosso i guanti.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio o di potassio allo 0,6% in acqua deionizzata o distillata. Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.
- In caso di versamenti di liquidi sullo strumento **cobas® 5800** o **cobas® 6800/8800**, attenersi alle istruzioni contenute nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente dei **cobas® 5800** o **cobas® 6800/8800** Systems per pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento (o degli strumenti).

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

Nota: manipolare tutti i campioni e i controlli come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.

Conservare tutti i campioni alle temperature indicate.

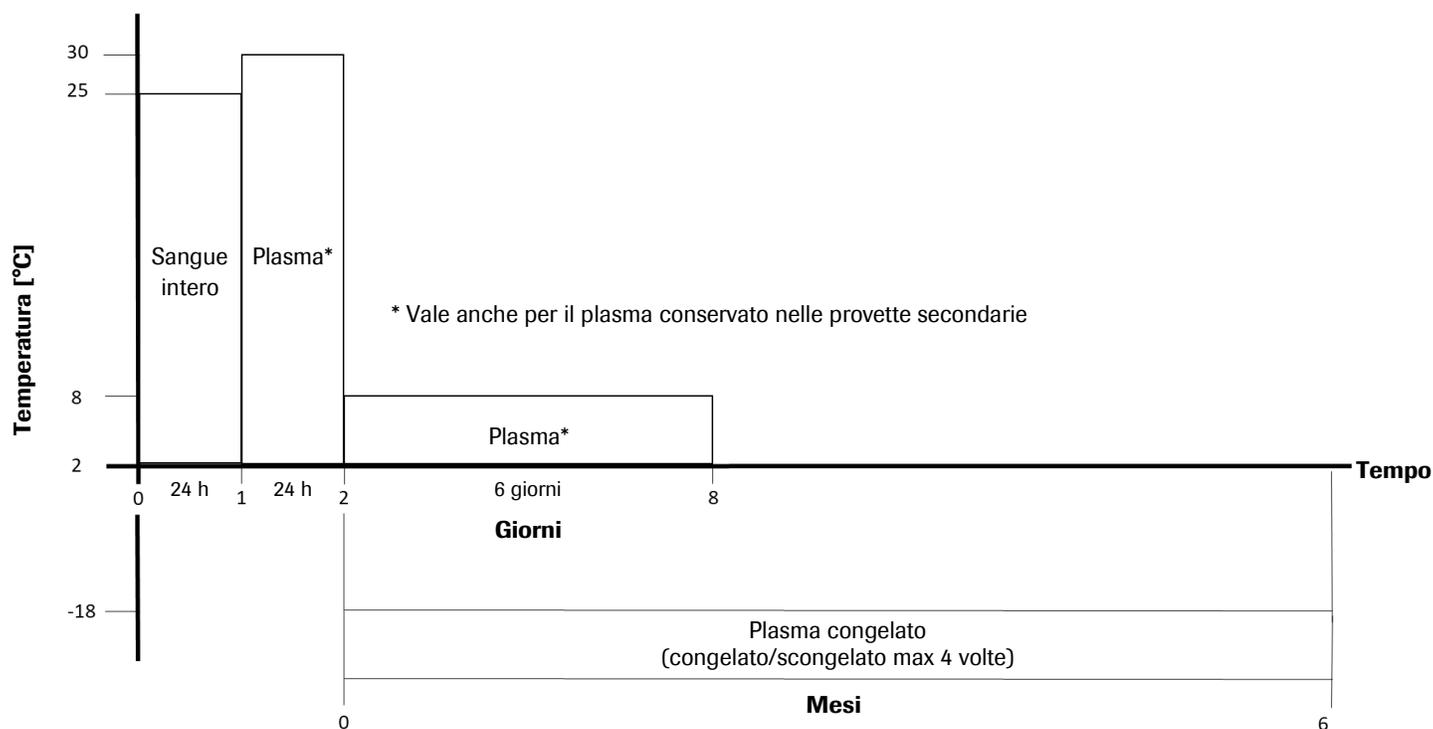
La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.

Se si utilizzano campioni congelati nelle provette secondarie, mantenere i campioni a temperatura ambiente (15-30°C) finché non si saranno scongelati completamente, quindi miscelare brevemente (ad esempio, in vortex per 3-5 secondi) e centrifugare in modo da raccogliere tutto il volume del campione sul fondo della provetta.

Dopo la centrifugazione, qualora possa essersi verificata la risospensione delle cellule nel plasma, potrebbe essere il caso di ripetere la centrifugazione prima dell'analisi sullo strumento.

Campioni

- Raccogliere il sangue intero nelle provette BD Vacutainer® PPT™ destinate alla preparazione di plasma per i metodi di analisi di diagnostica molecolare, oppure in provette sterili con l'anticoagulante EDTA. Attenersi alle istruzioni fornite dal produttore delle provette. Vedere la Figura 1.
- Il sangue intero raccolto nelle provette BD Vacutainer® PPT™ destinate alla preparazione di plasma per i metodi di analisi di diagnostica molecolare oppure nelle provette sterili con l'anticoagulante EDTA può essere conservato e/o trasportato fino a 24 ore a 2-25°C prima della preparazione del plasma. Per la centrifugazione, seguire le istruzioni fornite dal produttore.
- Dopo la separazione, i campioni di plasma possono essere conservati nei contenitori per campioni primari o secondari a 2-30°C per 24 ore e successivamente:
 - Conservazione nei contenitori per campioni primari o secondari a 2-8°C per un massimo di 6 giorni.
 - Conservazione nelle provette secondarie a ≤ -18°C per un massimo di 6 mesi.
- I campioni di plasma sono stabili per un massimo di quattro cicli di congelamento/scongelamento quando sono congelati a ≤ -18°C.

Figura 1 Condizioni di conservazione dei campioni

- Per l'eventuale spedizione, imballare ed etichettare i campioni come previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni e agenti eziologici.

Istruzioni per l'uso

Note sulla procedura

- Non utilizzare i reagenti **cobas® EBV**, il **cobas® EBV/BKV Control Kit**, il **cobas® Buffer Negative Control Kit** o i reagenti **cobas® omni** dopo la data di scadenza.
- Non riutilizzare i consumabili. Sono esclusivamente monouso.
- Per informazioni sulla corretta manutenzione degli strumenti, consultare l'Assistenza Utente e/o la Guida Utente del **cobas® 5800 System** o dei **cobas® 6800/8800 Systems**.

Esecuzione del test cobas® EBV sul cobas® 5800 System

Il test cobas® EBV può essere eseguito con un volume di campione minimo di 350 µl, di cui 200 µl vengono analizzati. La procedura del test è descritta dettagliatamente nella Guida Utente e/o nell'Assistenza Utente del cobas® 5800 System. La procedura è riassunta nella Figura 2.

Figura 2 Procedura del test cobas® EBV sul cobas® 5800 System

1	Eeguire la procedura di accesso al sistema
2	Caricare i campioni sul sistema: <ul style="list-style-type: none">• Caricare i rack per campioni sul sistema• Il sistema si prepara automaticamente• Ordinare i test
3	Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema: <ul style="list-style-type: none">• Caricare le cassette dei reagenti specifici per il test• Caricare i minirack per i controlli• Caricare i puntali di estrazione• Caricare i puntali di eluizione• Caricare le piastre di estrazione• Caricare le piastre per rifiuti liquidi• Caricare le piastre di amplificazione• Caricare la cassetta MGP• Ricaricare il diluente per campioni• Ricaricare il reagente di lisi• Ricaricare il reagente di lavaggio
4	Avviare la seduta selezionando il pulsante Start processing nell'interfaccia utente; tutte le sedute successive si avvieranno automaticamente, a meno che non vengano posticipate manualmente
5	Rivedere ed esportare i risultati
6	Rimuovere eappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro Pulire lo strumento: <ul style="list-style-type: none">• Scaricare i minirack per i controlli vuoti• Scaricare le cassette dei reagenti specifici per il test• Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione• Svuotare i rifiuti liquidi• Svuotare i rifiuti solidi

Esecuzione del test cobas® EBV sui cobas® 6800/8800 Systems

Il test cobas® EBV può essere eseguito con un volume di campione minimo di 350 µl, di cui 200 µl vengono analizzati. La procedura del test è descritta dettagliatamente nella Guida Utente e/o nell'Assistenza Utente dei cobas® 6800/8800 Systems. La procedura è riassunta nella Figura 3.

Figura 3 Procedura del test cobas® EBV sui cobas® 6800/8800 Systems

1	Eeguire la procedura di accesso al sistema Premere Avvio per preparare il sistema Ordinare i test
2	Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema: <ul style="list-style-type: none">• Caricare la cassetta dei reagenti specifici per il test• Caricare le cassette dei controlli• Caricare i puntali di pipettamento• Caricare le piastre di estrazione• Caricare il reagente MGP• Caricare le piastre di amplificazione• Ricaricare il diluente per campioni• Ricaricare il reagente di lisi• Ricaricare il reagente di lavaggio
3	Caricare i campioni sul sistema: <ul style="list-style-type: none">• Caricare i rack per campioni e i rack per puntali otturati sullo stesso modulo di inserimento dei campioni• Confermare che i campioni sono stati accettati dal modulo di trasferimento
4	Per avviare la seduta, scegliere il pulsante Avvio manuale nell'interfaccia utente o attendere l'avvio automatico dopo 120 minuti o se il batch è al completo
5	Rivedere ed esportare i risultati
6	Rimuovere e tappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro Pulire lo strumento: <ul style="list-style-type: none">• Scaricare le cassette dei controlli vuote• Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione• Svuotare i rifiuti liquidi• Svuotare i rifiuti solidi

Risultati

I **cobas**® 5800/6800/8800 Systems rilevano automaticamente la concentrazione del DNA di EBV per i campioni e i controlli. La concentrazione del DNA di EBV si esprime in unità internazionali per millilitro (UI/ml).

Controllo di qualità e validità dei risultati sul **cobas**® 5800 System

- In ogni batch vengono eseguiti un controllo negativo [(-) Ctrl] e due controlli positivi: un controllo positivo basso [EBV/BKV L(+)C] e un controllo positivo alto [EBV/BKV H(+)C]. Ciò avviene almeno ogni 72 ore e per ogni nuovo lotto del kit. È possibile aumentare la frequenza con cui sono programmati i controlli positivi e/o negativi in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali.
- Per verificare la validità dei risultati, controllare se nel **cobas**® 5800 software e/o nel report sono presenti flag con risultati associati.

Il **cobas**® 5800 software considera automaticamente non validi i risultati in caso di fallimento del controllo negativo o dei controlli positivi.

NOTA: il **cobas**® 5800 System è preimpostato in modo che venga eseguita una serie di controlli (positivi e negativi) con ogni seduta; tuttavia è possibile configurare una frequenza inferiore, fino a 72 ore, in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali. Per maggiori informazioni, rivolgersi ad un tecnico Roche e/o all'assistenza clienti Roche.

Risultati dei controlli sul **cobas**® 5800 System

I risultati dei controlli sono visualizzati nell'app "Controls" del software **cobas**® 5800.

- I controlli sono contrassegnati come "validi" nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono validi. I controlli sono contrassegnati come "non validi" nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono non validi.
- Ai controlli "non validi" viene associato un avviso nella colonna degli avvisi. Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui il controllo è contrassegnato come non valido e vengono mostrati gli eventuali avvisi.
- Se uno dei controlli non è valido, è necessario analizzare di nuovo tutti i controlli e tutti i campioni associati.

Controllo di qualità e validità dei risultati sui **cobas**® 6800/8800 Systems

- In ogni batch vengono inclusi un controllo negativo [(-) Ctrl] e due controlli positivi: un controllo positivo basso [EBV/BKV L(+)C] e un controllo positivo alto [EBV/BKV H(+)C].
- Nel software **cobas**® 6800/8800 e/o nel report verificare se sono presenti flag e risultati ad essi associati per confermare la validità del batch.
- Il batch è valido se non viene generato nessun flag per i tre controlli, che includono un controllo negativo e due controlli positivi: EBV/BKV L(+)C, EBV/BKV H(+)C. Il risultato del controllo negativo è visualizzato come (-) Ctrl e i controlli positivi alto e basso sono visualizzati come EBV/BKV L(+)C e EBV/BKV H(+)C.

Il software **cobas**® 6800/8800 considera automaticamente non validi i risultati in caso di fallimento dei controlli negativo e positivo.

Flag dei controlli sui cobas® 6800/8800 Systems

Tabella 11 Flag per i controlli positivi e negativi

Controllo negativo	Flag	Risultato	Interpretazione
(-) Ctrl	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo negativo non è negativo.
Controllo positivo	Flag	Risultato	Interpretazione
EBV/BKV L(+)C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo basso non rientra nell'intervallo assegnato.
EBV/BKV H(+)C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo alto non rientra nell'intervallo assegnato.

Se il batch di controllo non è valido, ripetere il test su tutti i campioni del batch interessato.

Interpretazione dei risultati

Nel caso di un batch valido, verificare nel software **cobas® 5800 System** e **cobas® 6800/8800 Systems** e/o nei report se sono presenti eventuali avvisi per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- Un batch valido può includere risultati dei campioni validi e non validi.

Tabella 12 Risultati per i singoli target e relativa interpretazione

Risultati	Interpretazione
Target Not Detected	DNA di EBV non rilevato. Segnalare i risultati nel report come "EBV non rilevato".
< Titer Min ^a	Il titolo calcolato è al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLOQ) del saggio. Segnalare i risultati nel report come "EBV rilevato, minore di (Titer Min)". Titer min = 35,0 UI/ml
Titer	Il titolo calcolato rientra nell'Intervallo lineare del saggio: maggiore o uguale al valore "Titer Min" e minore o uguale al valore "Titer Max". Segnalare i risultati nel report come "(Titolo) di EBV rilevato".
> Titer Max ^b	Il titolo calcolato è al di sopra del limite superiore di quantificazione (ULOQ) del saggio. Segnalare i risultati nel report come "EBV rilevato, maggiore di (Titer Max)". Titer max = 1,0E+08 UI/ml

^a I risultati dei campioni "< Titer Min" (Target rilevato < LLOQ) devono essere interpretati nel contesto di altri dati clinici e non dovrebbero essere l'unico elemento su cui basare decisioni terapeutiche.

^b Se il risultato del campione è "> Titer Max", si riferisce ai campioni EBV-positivi con titoli al di sopra del limite di quantificazione superiore (ULOQ). Se si desidera ottenere un risultato quantitativo, è necessario diluire il campione originale con plasma EDTA umano EBV-negativo e ripetere il test. Moltiplicare il risultato ottenuto per il fattore di diluizione.

Interpretazione dei risultati sul cobas® 5800 System

I risultati dei campioni sono visualizzati nell'app "Risultati" del software **cobas**® 5800.

Nel caso di un batch di controllo valido, verificare nel software **cobas**® 5800 e/o nel report se sono presenti eventuali avvisi per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- I campioni associati a un batch di controllo valido sono mostrati come "Validi" nella colonna "Risultato di controllo" se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come validi nel report. I campioni associati a un batch di controllo non valido sono mostrati come "Non validi" nella colonna "Risultato di controllo" se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come non validi nel report.
- Se i controlli associati di un risultato campione sono non validi, verrà aggiunto un flag specifico al risultato campione nel modo seguente:
 - Q05D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo positivo non valido
 - Q06D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo negativo non valido
- I valori nella colonna "Risultati" relativi ai singoli risultati dei target dei campioni devono essere interpretati nel modo indicato nella Tabella 11.

Se uno o più target dei campioni sono contrassegnati con "Non valido", il software **cobas**® 5800 mostra un flag nella colonna "Flag". Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui i target dei campioni sono contrassegnati come non validi e vengono mostrati gli eventuali avvisi.

Interpretazione dei risultati sui cobas® 6800/8800 Systems

Se un batch è valido, verificare nel software dei **cobas**® 6800/8800 Systems e/o nel report se sono presenti flag per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- I campioni sono contrassegnati con "Yes" nella colonna "Valido" se tutti i target richiesti hanno generato risultati validi. I campioni contrassegnati con "No" nella colonna "Valido" potrebbero necessitare di ulteriore interpretazione e altri interventi.
- I valori per ogni risultato target del campione dovrebbero essere interpretati secondo le informazioni riportate nella precedente Tabella 12.

Limiti della procedura

- Il test **cobas**® EBV è stato valutato soltanto in associazione con i prodotti **cobas**® EBV/BKV Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit, **cobas**® **omni** MGP Reagent, **cobas**® **omni** Lysis Reagent, **cobas**® **omni** Specimen Diluent e **cobas**® **omni** Wash Reagent per l'uso sui **cobas**® 5800/6800/8800 Systems.
- L'affidabilità dei risultati è influenzata dal metodo di raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.
- Questo test è stato approvato esclusivamente per l'uso con campioni di plasma EDTA. L'uso di altri tipi di campioni con il test **cobas**® EBV può generare risultati non accurati. Le misurazioni della carica virale nel plasma non sono raffrontabili direttamente con quelle di altri tipi di campioni.
- La quantificazione del DNA di EBV può essere influenzata dai metodi di raccolta dei campioni, da fattori legati al paziente (ad esempio età, presenza di sintomi) e/o dallo stadio dell'infezione.
- Come accade con tutti i test molecolari, le mutazioni comprese nelle regioni target del test **cobas**® EBV potrebbero alterare il legame del primer e/o della sonda, causando una quantificazione per difetto del virus o la mancata rilevazione della presenza del virus.

- A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, si consiglia agli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, di svolgere uno studio sulla correlazione tra i metodi nel proprio laboratorio, così da qualificare tali differenze. Si consiglia agli utenti di elaborare norme/procedure specifiche.
- Il test cobas® EBV non è destinato all'uso per lo screening per la presenza di EBV nel sangue e negli emoderivati.

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Caratteristiche delle prestazioni chiave sui cobas® 6800/8800 Systems

Limite di sensibilità (LoD)

Standard Internazionale OMS

Il limite di sensibilità del test cobas® EBV per il 1° Standard Internazionale OMS è stato determinato analizzando le diluizioni seriali del 1° Standard Internazionale OMS per il virus di Epstein-Barr per le tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (codice NIBSC: 09/260) in plasma EDTA umano EBV-negativo. I pannelli, costituiti da sei livelli di concentrazione più un bianco, sono stati analizzati utilizzando tre lotti di reagenti cobas® EBV in più sedute, su più giorni, da più operatori e su più strumenti.

I risultati ottenuti con il plasma EDTA sono illustrati dalla Tabella 13 fino alla Tabella 15. Lo studio dimostra che, con il lotto meno sensibile, la concentrazione alla quale è atteso un tasso di successo del 95% in base all'analisi PROBIT è di 18,8 UI/ml, con un intervallo di confidenza al 95% tra 14,5 e 27,5 UI/ml, in plasma EDTA. La concentrazione più bassa con un tasso di successo $\geq 95\%$ è di 20,0 UI/ml in plasma EDTA.

Tabella 13 Limite di sensibilità per il plasma EDTA, lotto 1

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di EBV)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	62	98,4
20,0	63	61	96,8
10,0	63	53	84,1
5,0	63	37	58,7
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	18,8 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 14,5-27,5 UI/ml		

Tabella 14 Limite di sensibilità per il plasma EDTA, lotto 2

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di EBV)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	58	92,1
5,0	63	35	55,6
2,5	63	20	31,8
0,0	63	0	0,0
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	12,4 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 10,0-17,0 UI/ml		

Tabella 15 Limite di sensibilità per il plasma EDTA, lotto 3

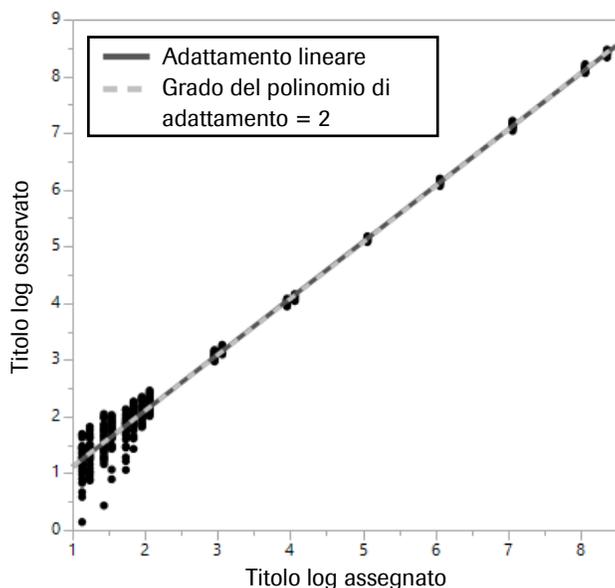
Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di EBV)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	62	98,4
10,0	63	48	76,2
5,0	63	38	60,3
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	18,6 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 14,4-27,1 UI/ml		

Intervallo lineare

La linearità del test **cobas**® EBV è stata valutata utilizzando una serie di diluizioni costituita da un pannello di 17 componenti, con DNA di EBV del genotipo 1, distribuiti lungo l'intero intervallo lineare del test. Per preparare 11 componenti del pannello distribuiti lungo l'intero intervallo lineare è stato utilizzato uno stock di DNA lambda con titolo alto. Per preparare 6 componenti del pannello distribuiti nei livelli intermedi e bassi dell'intervallo lineare è stato utilizzato un campione clinico.

Ogni componente del pannello è stato analizzato in 36 ripetizioni con tre lotti di reagenti **cobas**® EBV e i risultati dello studio sono illustrati nella Figura 4.

I dati dimostrano che il test **cobas**® EBV è lineare nell'intervallo tra 1,40E+01 UI/ml e 2,30E+08 UI/ml, con una deviazione assoluta dalla regressione non lineare di migliore adattamento minore o uguale a $\pm 0,1 \log_{10}$ in plasma EDTA umano (vedere la Figura 4). Lungo l'intervallo lineare, l'accuratezza del test è compresa entro $\pm 0,2 \log_{10}$.

Figura 4 Determinazione dell'intervallo lineare per il plasma EDTA

Precisione intra-laboratorio

La precisione del test **cobas**® EBV è stata determinata analizzando le diluizioni seriali del DNA di EBV (genotipo 1) con titolo alto in plasma EDTA EBV-negativo. Sono stati analizzati 6 livelli di diluizione in 72 ripetizioni per ogni livello, utilizzando tre lotti di reagenti **cobas**® EBV, tre strumenti e tre operatori nell'arco di 12 giorni. Ogni campione è stato sottoposto all'intera procedura prevista per il test **cobas**® EBV, che è completamente automatizzata sui **cobas**® 6800/8800 Systems. La precisione riferita in questa sede è dunque rappresentativa di tutti gli aspetti della procedura del test. I risultati sono illustrati nella Tabella 16.

Il test **cobas**® EBV ha dimostrato un'elevata precisione per i tre lotti di reagenti utilizzati su un intervallo di concentrazioni compreso tra 1,08E+02 UI/ml e 5,40+07 UI/ml.

Tabella 16 Precisione intra-laboratorio del test **cobas**® EBV

Concentrazione nominale [UI/ml]	Concentrazione assegnata [UI/ml]	Plasma EDTA			
		Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
		DS	DS	DS	DS in pool
5,00E+07	5,40E+07	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+06	1,08E+06	0,02	0,03	0,02	0,02
1,00E+05	1,08E+05	0,02	0,02	0,03	0,02
1,00E+04	1,08E+04	0,04	0,02	0,03	0,03
1,00E+03	1,08E+03	0,05	0,05	0,05	0,05
1,00E+02	1,08E+02	0,17	0,18	0,15	0,17

Verifica del genotipo

Le prestazioni del test **cobas**® EBV con il genotipo 2 del virus EBV sono state valutate con i seguenti metodi:

- Verifica del limite di sensibilità
- Verifica dell'intervallo lineare

Verifica del limite di sensibilità per il genotipo 2

Il DNA di EBV, genotipo 2, è stato diluito fino a tre livelli di concentrazione diversi in plasma EDTA EBV-negativo. Il calcolo del tasso di successo è stato effettuato con 63 ripetizioni per ogni livello. I test sono stati eseguiti con tre lotti di reagenti **cobas**® EBV in più sedute e giorni, da più operatori e strumenti. I risultati indicano che il test **cobas**® EBV ha rilevato il DNA di EBV, genotipo 2, a una concentrazione di 18,8 UI/ml con un tasso di successo $\geq 95\%$.

Verifica dell'intervallo lineare per il genotipo 2

La serie di diluizioni utilizzata per verificare lo studio di linearità sui genotipi per il test **cobas**® EBV è costituita da un pannello di otto componenti, distribuiti lungo l'intervallo lineare del saggio. I test sono stati eseguiti con tre lotti di reagenti **cobas**® EBV e 12 ripetizioni per ogni livello in plasma EDTA.

È stato verificato l'intervallo lineare del test **cobas**® EBV per il genotipo 2.

Specificità

La specificità del test **cobas**® EBV è stata determinata analizzando campioni di plasma EDTA EBV-negativo appartenenti a singoli donatori. Sono stati analizzati 101 campioni individuali di plasma EDTA con tre lotti di reagenti **cobas**® EBV. Tutti i campioni sono risultati negativi per il DNA di EBV. Nel pannello di analisi, la specificità del test **cobas**® EBV è stata del 100% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale inferiore: 97,08%).

Specificità analitica

La specificità analitica del test **cobas**® EBV è stata valutata diluendo un pannello di microorganismi fino a una concentrazione pari a 1,00E+06 unità/ml (cellule/ml, CFU/ml, IFU/ml, CCU/ml) per i batteri e i lieviti e tra 3,00E+05 e 1,00E+06 unità/ml (UI/ml, copie/ml, cellule/ml, TCID₅₀/ml) per i virus, con plasma EDTA positivo per il DNA di EBV e negativo per il DNA di EBV. Gli organismi analizzati sono elencati in modo dettagliato nella Tabella 17. Ogni campione del pannello è stato valutato con il test **cobas**® EBV. Nessuno dei patogeni non EBV ha interferito con le prestazioni del test.

Tabella 17 Microrganismi analizzati ai fini della reattività crociata

Virus	Batteri	Lieviti
Adenovirus tipo 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Polyomavirus BK	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Citomegalovirus	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus dell'epatite B	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Virus dell'epatite C	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
Virus dell'herpes simplex tipo 1	<i>Escherichia coli</i>	-
Virus dell'herpes simplex tipo 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Virus dell'herpes umano tipo 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Virus dell'herpes umano tipo 7	<i>Mycobacterium avium</i>	-
Virus dell'herpes umano tipo 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
Virus dell'immunodeficienza umana 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Virus dell'immunodeficienza umana 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Papillomavirus umano	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Virus di JC	<i>Salmonella enterica</i>	-
Parvovirus B19 Simian virus 40	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virus Varicella-Zoster	-	-

Specificità analitica e sostanze interferenti

Sono stati analizzati campioni con livelli elevati di trigliceridi (33,0 g/l), bilirubina coniugata (0,2 g/l), bilirubina non coniugata (0,2 g/l), albumina (60,0 g/l), emoglobina (2,0 g/l) e DNA umano (2 mg/l), sia con DNA di EBV che senza. Le sostanze interferenti endogene che sono state analizzate non hanno interferito con le prestazioni del test **cobas**® EBV.

Inoltre sono stati analizzati i composti farmacologici elencati nella Tabella 18, ad una concentrazione pari a tre volte il valore C_{max} sia con DNA di EBV che senza.

Nessuna delle potenziali sostanze interferenti ha alterato in alcun modo le prestazioni del test.

Tabella 18 Composti farmacologici analizzati per verificare l'interferenza con il test **cobas®** EBV ai fini della quantificazione del DNA di EBV

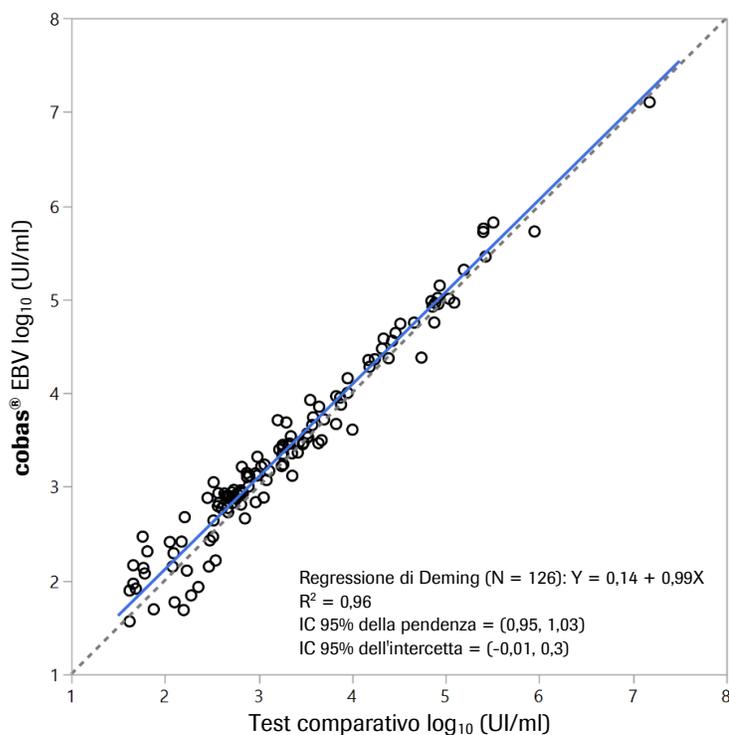
Categoria farmacologica	Nome generico del farmaco	
Antibatterico	Cefotetan	Sulfametossazole
	Clavulanato di potassio	Ticarcillina disodica
	Fluconazolo	Trimetoprima
	Piperacillina	Vancomicina
	Tazobactam sodico	Micafungin
Composti per il trattamento dei virus dell'herpes	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Aciclovir	Letermovir
Immunosoppressori	Azatioprina	Prednisone
	Ciclosporina	Sirolimus
	Everolimus	Tacrolimus
	Micofenolato mofetile	Acido micofenolico

Correlazione tra i metodi

Le prestazioni del test **cobas**® EBV sono state valutate rispetto a un test comparativo, analizzando alcuni campioni di plasma EDTA ottenuti da pazienti infetti da EBV. I campioni di plasma EDTA i cui valori rientravano nell'intervallo di quantificazione di entrambi i test sono stati analizzati con un'unica ripetizione. È stata applicata l'analisi di regressione di Deming.

I risultati della regressione di Deming sono riportati nella Figura 5.

Figura 5 Analisi di regressione del test **cobas**® EBV rispetto al test comparativo



Tasso globale d'errore del sistema

Il tasso globale d'errore del sistema per il test **cobas**® EBV è stato calcolato eseguendo 100 ripetizioni del test su campioni di plasma EDTA arricchiti con un campione clinico EBV-positivo. Questi campioni sono stati analizzati a una concentrazione tripla rispetto al limite di sensibilità ($3 \times \text{LoD}$).

Questo studio dimostra che tutte le ripetizioni sono risultate valide e positive per il target EBV e hanno prodotto un tasso globale d'errore del sistema dello 0% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale superiore: 2,95%).

Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata del test **cobas**® EBV è stato determinato analizzando 240 ripetizioni di una matrice EBV-negativa e 225 ripetizioni di un campione con titolo alto di EBV, a una concentrazione di circa $2,00E+07$ UI/ml. Complessivamente sono state eseguite cinque sedute con campioni positivi e negativi in una configurazione a scacchiera.

Tutte le 240 ripetizioni del campione negativo hanno generato risultati negativi, pertanto il tasso di contaminazione crociata è dello 0% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale superiore: 1,24%).

Valutazione delle prestazioni cliniche eseguita sui cobas® 6800/8800 Systems

Riproducibilità del test cobas® EBV

La riproducibilità del test cobas® EBV è stata valutata rispetto a più fattori (lotto di reagenti, laboratorio, batch e giorni in cui vengono eseguiti i test) che potrebbero influenzare i risultati ottenuti nei test clinici di routine. La valutazione è avvenuta presso 3 laboratori, utilizzando 3 lotti di reagenti con un pannello costituito da campioni positivi e un altro pannello costituito da campioni negativi, per un totale di 270 test (esclusi i controlli). I pannelli erano costituiti da campioni di plasma EDTA negativi per gli anticorpi VCA IgG anti-EBV, testati per la presenza del virus EBV secondo un protocollo di rilascio NAT per il plasma e arricchiti con uno standard internazionale dell'OMS per EBV, un sopranatante da coltura cellulare EBV o un fagemide lambda con DNA di EBV. Due operatori in ogni laboratorio hanno testato ogni lotto di reagente per 5 giorni. Ogni giorno sono state eseguite due sedute per operatore (1 seduta = 1 batch; 1 batch = 1 pannello + 3 controlli), con 3 replicati di ciascun componente del pannello per ogni seduta. Per un riepilogo dei risultati della valutazione, vedere nella Tabella 19.

Tabella 19 Percentuali attribuibili della varianza totale (%TV), deviazione standard (DS) della precisione totale e CV (%) log-normale della concentrazione di DNA di EBV (\log_{10} UI/ml) per componente del pannello positivo

Concentrazione del DNA di EBV attesa (\log_{10} UI/ml)	Concentrazione del DNA di EBV media ^a osservata (\log_{10} UI/ml)	Numero di test ^b	Lotto %TV ^c (CV%) ^d	Laboratorio %TV ^c (CV%) ^d	Giorno/Operatore %TV ^c (CV%) ^d	Batch %TV ^c (CV%) ^d	Stesso-batch %TV ^c (CV%) ^d	Precisione totale DS ^e	Precisione totale CV (%) ^d
2,02	2,09	270	11% (11,97)	2% (5,30)	0% (0,00)	3% (6,34)	84% (34,25)	0,158	37,56
3,70	3,68	270	43% (10,07)	15% (5,92)	0% (0,00)	16% (6,23)	26% (7,81)	0,067	15,43
4,70	4,68	270	39% (8,54)	10% (4,24)	0% (0,00)	24% (6,63)	28% (7,18)	0,059	13,70
5,70	5,50	268	7% (11,39)	58% (34,36)	0% (0,00)	21% (20,18)	15% (17,08)	0,191	46,16
7,70	7,76	270	27% (8,63)	15% (6,52)	0% (0,88)	13% (6,01)	45% (11,26)	0,073	16,83

^a Calcolata mediante la procedura SAS MIXED.

^b Numero di test validi con livello di DNA rilevabile.

^c %TV = Contributo alla varianza totale (%).

^d CV% = coefficiente di variazione percentuale log-normale = $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Calcolata a partire dalla variabilità totale ottenuta con la procedura SAS MIXED.

Nota: la tabella include soltanto i risultati con DNA rilevabile. DS = deviazione standard. CV = coefficiente di variazione; EBV = virus di Epstein-Barr.

La riproducibilità clinica del test cobas® EBV è risultata accettabile al livello di concentrazione comparativa corrispondente. Inoltre il sistema ha rilevato il 100% dei campioni $3 \times$ LLoQ. I cobas® 6800 e cobas® 8800 Systems hanno lo stesso design modulare e offrono prestazioni equivalenti durante l'esecuzione del test cobas® EBV. Tutti i limiti di confidenza al 95% stimati per la differenza tra 2 misurazioni ottenute dallo stesso soggetto erano compresi entro $\pm 0,53 \log_{10}$ UI/ml, ciò indica che il test può rilevare i cambiamenti nei livelli di DNA di EBV che sono considerati significativi dal punto di vista clinico.

Su 270 test validi per i componenti del pannello negativo, eseguiti sui **cobas**® 6800/8800 Systems, 14 campioni (5,19%) presentavano una positività con un livello di concentrazione < LLoQ. I risultati non erano associati a nessun particolare strumento/laboratorio o lotto di reagente. L'hnPCR (*Heminested PCR*) e il sequenziamento del DNA hanno confermato la presenza del DNA di EBV nei campioni.

Prestazioni del test **cobas**® EBV

Le prestazioni cliniche del test **cobas**® EBV sono state ulteriormente valutate presso tre laboratori, attraverso la misurazione dei livelli di DNA di EBV nei campioni clinici (diluiti e non diluiti) di pazienti con e senza infezione da EBV e nei campioni di plasma EDTA preparati artificialmente e arricchiti con virus EBV coltivato. Questi risultati sono stati confrontati con quelli di un consolidato test comparativo per EBV sviluppato in laboratorio (*Laboratory Developed Test*, LDT). Tra tutti i campioni analizzati con il test **cobas**® EBV e con il test EBV comparativo, in totale 464 campioni (439 campioni clinici diluiti e non diluiti, appartenenti a 72 soggetti trapiantati, più 25 campioni preparati artificialmente) sono risultati validi con entrambi i test e sono stati ritenuti idonei all'analisi della concordanza clinica.

Tabella 20 Analisi della concordanza tra i risultati del livello di DNA di EBV ottenuti con il test **cobas**® EBV e con il test comparativo LDT per tutti i campioni

cobas ® EBV (log ₁₀ UI/ml)	Test comparativo EBV LDT (log ₁₀ UI/ml) Target Not Detected	Test comparativo EBV LDT (log ₁₀ UI/ml) < LLoQ (< 2)	Test comparativo EBV LDT (log ₁₀ UI/ml) Da 2 a < 2,6	Test comparativo EBV LDT (log ₁₀ UI/ml) Da 2,6 a < 3,2	Test comparativo EBV LDT (log ₁₀ UI/ml) Da 3,2 a 3,8	Test comparativo EBV LDT (log ₁₀ UI/ml) > 3,8	Totale
Target Not Detected	95	17	17	0	0	0	129
< LLoQ (< 2)	39	46	75	11	0	0	171
Da 2 a < 2,6	1	2	16	37	6	0	62
Da 2,6 a < 3,2	1	0	5	15	30	1	52
Da 3,2 a 3,8	0	0	0	0	9	11	20
> 3,8	0	0	0	0	1	29	30
Totale	136	65	113	63	46	41	464
Concordanza colonna (%)	(134/136) 98,5%	(65/65) 100%	(96/113) 85,0%	(52/63) 82,5%	(40/46) 87,0%	(40/41) 97,6%	-
(Punteggio IC 95%) ^a	(94,8%, 99,6%)	(94,4%, 100%)	(77,2%, 90,4%)	(71,4%, 90,0%)	(74,3%, 93,9%)	(87,4%, 99,6%)	-

Nota: LLoQ = limite inferiore di quantificazione del test comparativo EBV LDT (100 UI/ml).

Deviazione standard del test comparativo EBV LDT stimata a 0,3 log₁₀ UI/ml (studio sulla precisione analitica del test EBV LDT).

Nella tabella sono stati inclusi i campioni appaiati idonei all'analisi della concordanza clinica.

^a Indipendenza presunta tra tutti i campioni.

IC = intervallo di confidenza.

Il sequenziamento del DNA su campioni rappresentativi, ottenuti da soggetti con risultati in cui il livello di DNA si discostava costantemente di più di 1 log₁₀ UI/ml, non ha evidenziato nessun disallineamento delle sequenze per nessuno dei target primer o sonda per il test **cobas**® EBV.

Sono stati considerati discordanti i risultati che si collocavano a una distanza di più di una casella dalla diagonale (indicata dall'ombreggiatura). Nella cella Colonna concordanza, sotto la colonna Target Not Detected relativa al test LDT, le celle

Target Not Detected e < LLoQ (< 2) relative al test **cobas**® EBV sono state unite. La logica dell'unione tra le celle adiacenti < LLoQ e TND per la colonna TND è la seguente: la differenza tra un risultato TND e un risultato < LLoQ non è clinicamente rilevante, inoltre dal punto di vista analitico questi risultati sono al limite inferiore dell'intervallo di misurazione e potrebbero risentire di un errore random.

Su 43 campioni negativi al test comparativo EBV LDT per la stima della concordanza percentuale negativa (CPN) rispetto al test **cobas**® EBV, 41 campioni sono risultati negativi al test **cobas**® EBV, pertanto la CPN era del 95,4% con un IC esatto al 95% compreso fra 84,2% e 99,4%. I due campioni negativi al test comparativo EBV LDT sono risultati positivi (< LLoQ) al test **cobas**® EBV e sieropositivi per gli anticorpi VCA IgG anti-EBV e IgG anti-EBNA-1 sulla base di ulteriori test sierologici.

La concordanza tra il test **cobas**® EBV e il test comparativo EBV LDT è stata valutata anche utilizzando soglie cliniche diverse.

Tabella 21 Riepilogo della concordanza tra il test **cobas**® EBV e il test comparativo EBV LDT utilizzando soglie diverse per tutti i campioni

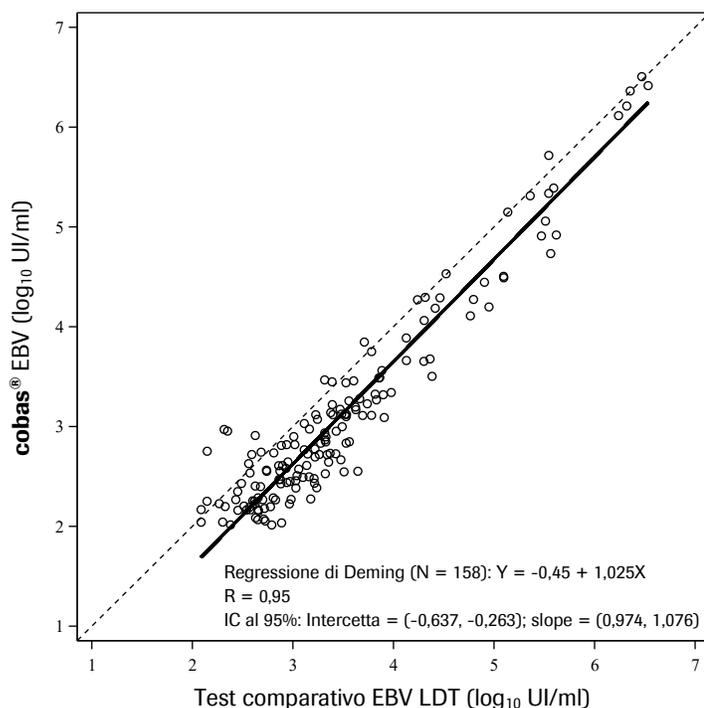
	Percentuale di concordanza < soglia IC 95% ^b (n/N)	Percentuale di concordanza ≥ soglia IC 95% ^b (n/N)
Target Not Detected	98,5% (134/136) (94,8%, 99,6%)	89,6% (294/328) (85,9%, 92,5%)
LLoQ ^a (2,0 log ₁₀ UI/ml)	98,0% (197/201) (95,0%, 99,2%)	60,8% (160/263) (54,8%, 66,5%)
3,0 log ₁₀ UI/ml	100,0% (363/363)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

^a LLoQ = limite inferiore di quantificazione del test comparativo EBV LDT (100 UI/ml).

^b IC = intervallo di confidenza.

Tra tutti i campioni analizzati con il test **cobas**® EBV che avevano generato risultati positivi per EBV con il test comparativo EBV, in totale 158 campioni (139 campioni clinici diluiti o non diluiti, appartenenti a 28 soggetti trapiantati, più 19 campioni preparati artificialmente) sono stati ritenuti idonei all'analisi della correlazione presso tre laboratori.

Figura 6 Correlazione tra il test **cobas**® EBV e il test comparativo EBV LDT per tutti i campioni: diagramma di regressione lineare di Deming dei livelli di DNA (\log_{10} UI/ml)



Dall'ulteriore analisi del grafico della distorsione riguardante le differenze nel livello di DNA è emersa una differenza sistematica fra i due test che è costante lungo tutto l'intervallo lineare sovrapponibile. L'IC al 95% dell'intercetta della linea adattata nei grafici della distorsione era compreso fra -0,456 e 0,104, cioè valori entro $\pm 0,6 \log_{10}$ UI/ml (± 2 volte la deviazione standard dalla precisione analitica del test comparativo EBV LDT).

Inoltre, l'errore statistico era stimato a $-0,364 \log_{10}$ UI/ml e la differenza sistematica tra i due test era di $-0,352 \log_{10}$ UI/ml e di $-0,376 \log_{10}$ UI/ml per i campioni con livelli di DNA rispettivamente di 3 e 4 \log_{10} UI/ml.

Equivalenza dei sistemi / confronto tra sistemi

L'equivalenza tra i **cobas**® 5800, **cobas**® 6800 e **cobas**® 8800 Systems è stata dimostrata attraverso alcuni studi sulle prestazioni. I risultati presentati nelle Istruzioni per l'uso dimostrano l'equivalenza delle prestazioni tra tutti i sistemi.

Informazioni supplementari

Caratteristiche del test

Tipo di campione	Plasma EDTA
Quantità minima di campione richiesta	350 µl*
Volume di analisi del campione	200 µl
Sensibilità analitica	18,8 UI/ml
Intervallo lineare	35,0 UI/ml - 1E+08 UI/ml
Specificità	100%
Genotipi identificati	EBV genotipi 1 e 2

* Volume morto di 150 µl identificato per le provette secondarie **cobas® omni**. Eventuali altre provette utilizzate per il test potrebbero avere un volume morto diverso o richiedere un volume minimo più basso o più alto. Per ulteriori informazioni, contattare un rappresentante dell'assistenza tecnica Roche.

Simboli

I seguenti simboli appaiono su tutte le confezioni dei prodotti diagnostici PCR di Roche.

Tabella 22 Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

 Age/DOB Età o data di nascita	 Dispositivo non idoneo ai test POC	 QS IU/PCR UI QS per reazione PCR; utilizzare le unità internazionali (UI) QS per la reazione PCR nel calcolo dei risultati.
 SW Software ausiliario	 Dispositivo non idoneo all'autodiagnosi	 SN Numero di serie
 Assigned Range [copies/mL] Intervallo assegnato (copie/ml)	 Distributore (Nota: il paese e/o la regione applicabili potrebbero essere indicati sotto il simbolo.)	 Site Laboratorio
 Assigned Range [IU/mL] Intervallo assegnato (UI/ml)	 Non riutilizzare	 Procedure Standard Procedura standard
 EC REP Mandatario nella Comunità Europea	 Femmina	 STERILE EO Sterilizzazione con ossido di etilene
 BARCODE Foglio di dati del barcode	 Solo per valutazione delle prestazioni IVD	 Conservare al buio
 LOT Codice del batch	 GTIN Global Trade Item Number	 Limiti di temperatura
 Rischio biologico	 Importatore	 TDF File di definizione del test
 REF Numero di catalogo	 IVD Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	 Alto
 CE Contrassegno di conformità CE: questo dispositivo è conforme ai requisiti pertinenti del marchio CE relativamente ai dispositivi medico-diagnostici <i>in vitro</i>	 LLR Limite inferiore dell'intervallo assegnato	 Procedure UltraSensitive Procedura ultrasensibile
 Collect Date Data di raccolta	 Maschio	 UDI Identificazione univoca del dispositivo
 Consultare le istruzioni per l'uso	 Fabbricante	 ULR Limite superiore dell'intervallo assegnato
 Σ Contenuto sufficiente per <n> test	 CONTROL - Controllo negativo	 Urine Fill Line Riga di riempimento urina
 CONTENT Contenuto del kit	 NON STERILE Non sterile	 Rx Only Solo USA: la legge federale statunitense limita la vendita di questo dispositivo ai medici o su presentazione di prescrizione medica.
 CONTROL Controllo	 ? Nome del paziente	 Utilizzare entro la data
 Data di produzione	 # Numero del paziente	
 Dispositivo idoneo ai test POC	 Staccare qui	
 Dispositivo idoneo all'autodiagnosi	 CONTROL + Controllo positivo	
	 QS copies / PCR Copie QS per reazione PCR; usare le copie QS per reazione PCR nel calcolo dei risultati.	

Assistenza tecnica

Per richiedere assistenza tecnica, contattare la nostra filiale locale:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Produttore e importatore

Tabella 23 Produttore e importatore



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

Prodotto in USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marchi e brevetti

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

Copyright

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliografia

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:453-5. PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. PMID: 23464993.
3. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343:481-92. PMID: 10944566.
4. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al. Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica*. 2016;101:803-11. PMID: 27365460.
5. Allen UD, Preiksaitis JK. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:107-20. PMID: 23465004.
6. San-Juan R, Comoli P, Caillard S, et al. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 7:109-18. PMID: 24475976.
7. Nijland ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, Ten Berge IJ. Epstein-Barr virus-positive posttransplant lymphoproliferative disease after solid organ transplantation: Pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Transplant Direct*. 2016;2:e48. PMID: 27500242.
8. Tsai DE, Douglas L, Andreadis C, et al. EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: Results of a two-arm prospective trial. *Am J Transplant*. 2008;8:1016-24. PMID: 18312608.
9. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, Minor PD. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals*. 2016;44:423-33. PMID: 27461128.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
11. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PMID: 7845459.
12. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: Structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78. PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline, 4th ed. CLSI Document M29-A4. Wayne, PA: CLSI, 2014.
17. Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000496. PMID: 19578433.

Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev. 2.0 09/2022	<p>Aggiornamento della prima pagina, della Tabella 2 e della Tabella 3 con inserimento dei numeri di parte (P/N) dei kit di controllo.</p> <p>Aggiornamento della sezione Marchi e brevetti, collegamento incluso.</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</p>
Doc Rev. 3.0 05/2023	<p>Ripristino del volume minimo di campione al livello originale nelle Istruzioni per l'uso e nella sezione Caratteristiche del test.</p> <p>Aggiornamento della dichiarazione sull'autorità competente.</p> <p>Aggiornamento dei marchi cobas®.</p> <p>Correzioni testuali minori.</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</p>

Per prendere visione del report sintetico sulla sicurezza e sulle prestazioni, utilizzare il seguente collegamento:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.