

cobas[®] BKV

**Kvantitatívny test nukleových kyselín určený na použitie
v systémoch cobas[®] 6800/8800 System**

Určené na diagnostické použitie in vitro

cobas[®] BKV	P/N: 08688249190
cobas[®] EBV/BKV Control Kit	P/N: 08688214190
cobas[®] Buffer Negative Control Kit	P/N: 07002238190

Obsah

Účel použitia.....	4
Súhrn a vysvetlenie testu.....	4
Činidlá a materiály	7
cobas® BKV činidlá a kontroly	7
Činidlá cobas omni na prípravu vzoriek	10
Požiadavky na skladovanie činidiel a manipuláciu s nimi	11
Ďalšie vyžadované materiály	12
Vyžadované prístrojové vybavenie a softvér	13
Preventívne opatrenia a požiadavky na manipuláciu	13
Výstrahy a preventívne opatrenia	13
Manipulácia s činidlami.....	14
Vhodné laboratórne postupy	14
Odber, preprava a skladovanie vzoriek.....	15
Vzorky EDTA plazmy.....	15
Vzorky moču	16
Návod na použitie	17
Procedurálne poznámky	17
Prevádzka cobas® BKV.....	17
Výsledky	19
Kontrola kvality a platnosť výsledkov	19
Interpretácia výsledkov.....	20
Procedurálne obmedzenia	20

Hodnotenie neklinickej účinnosti 21

Kľúčové ukazovatele účinnosti pre typ vzorky s EDTA plazmou	21
Detekčný limit (LoD), medzinárodný štandard WHO	21
Lineárny rozsah	22
Presnosť – v laboratóriu	23
Overenie podtypu	23
Špecifickosť	23
Analytická špecifickosť	24
Interferujúce látky	25
Korelácia metódy	26
Zlyhanie celého systému	26
Křížová kontaminácia	26
Kľúčové ukazovatele účinnosti pre typ vzorky s močom	27
Detekčný limit (LoD), medzinárodný štandard WHO	27
Lineárny rozsah	28
Presnosť – v laboratóriu	29
Overenie podtypu	29
Špecifickosť	30
Analytická špecifickosť	30
Interferujúce látky	31
Korelácia metódy	32
Křížová kontaminácia	32

Ďalšie informácie 33

Kľúčové funkcie testu	33
Symboly	34
Výrobca a distribútori	35
Ochranné známky a patenty	35
Autorské práva	35
Referenčné materiály	36
Revízia dokumentu	37

Účel použitia

cobas® BKV je *in vitro* amplifikačný test nukleových kyselín na kvantifikáciu DNA BK vírusu (BKV) v ľudskej EDTA plazme a moči stabilizovanom v médiu **cobas® PCR Media**.

V EDTA plazme je test **cobas® BKV** určený na použitie ako pomoc pri diagnostike a manažmente BKV u pacientov s transplantátom. U pacientov, ktorí absolvujú monitorovanie BKV v EDTA plazme, sa môžu použiť sériové merania DNA, aby sa zistila potreba potenciálnej zmeny v liečbe a aby sa ohodnotila vírusová reakcia na liečbu.

V moči stabilizovanom v médiu **cobas® PCR Media** je test **cobas® BKV** určený na použitie ako pomoc pri diagnostike a manažmente BKV u pacientov s transplantátom.

Výsledky testu **cobas® BKV** sa musia interpretovať v rámci kontextu všetkých príslušných klinických testov a laboratórnych nálezov.

Test **cobas® BKV** nie je určený na testovanie v krvi ani krvných produktoch.

Súhrn a vysvetlenie testu

Základné informácie

Prijemcovia transplantátov podstupujú zvýšené riziko mnohých vírusových a bakteriálnych infekcií, u ktorých je väčšia pravdepodobnosť, že budú mať silné nepriaznivé účinky u populácie pacientov s transplantátom v porovnaní s bežnou zdravou populáciou. Toto zvýšené riziko sa dá čiastočne pripísať oslabenej funkčnosti imunitného systému spôsobenej imunosupresívnymi liekmi, ktoré dostávajú pacienti s transplantátom, aby sa znížila pravdepodobnosť odmietnutia transplantátu.^{1, 2}

Vírus BK (BKV) je malý (~5 kb) neobalený vírus s deoxyribonukleovou kyselinou (DNA), ktorý patrí do skupiny polyomavírusov. Existujú štyri hlavné podtypy BKV, z ktorých je podtyp I najbežnejšie detegovaný (80 %); za ním nasleduje podtyp IV (15 %).³ Séroprevalencia BKV v bežnej zdravej dospeléj populácii dosahuje hodnotu > 80 %.⁴ U imunokompetentných osôb sa BKV nespája s významnou patológiou. Avšak BKV infekcia môže spôsobiť nebezpečné klinické choroby u imunokompromitovaných osôb, a to vrátane príjemcov transplantátov.⁵

Infekcie BKV sa najčastejšie prejavujú v obličkách a močových cestách. Po primárnej infekcii vírus zostáva v latentnej podobe v renálnom tubulárnom epiteli a môže sa opätovne aktivovať u imunokompromitovaných jednotlivcov. Pacienti s transplantovanými obličkami majú väčšie riziko získania komplikácií pridružených k BKV v porovnaní s príjemcami iných transplantovaných orgánov, vrátane nefropatie spojenej s vírusom polyómu (PVN) a stenózou maternice. Do 10 % príjemcov transplantovaných obličiek postihne PVN a okolo 50 % pacientov postihnutých PVN trpí zlyhaním transplantátu. Navyše, približne 3 % príjemcov transplantátu obličiek získa stenózu maternice spojenú s BKV.⁵ Transplantácie hematopoietických kmeňových buniek (HSCT) takisto bývajú častejšie spojené s komplikáciami súvisiacimi s BKV, najbežnejšie vo forme hemoragickej cystitídy (HC). Od 5 do 15 % HSCT pacientov trpí HC.¹

Smernice odporúčajú pravidelné monitorovanie BKV u pacientov s transplantovanou obličkou do 5 rokov po transplantácii.⁶ Tento monitorovací prístup dokáže identifikovať 80 až 90 % pacientov, ktorých ohrozuje PVN. Testovanie plazmy na virémiu BKV sa odporúča ako súčasť stratégie na identifikáciu pacientov so zvýšeným rizikom PVN, buď ako potvrdzujúci test pre pacientov, u ktorých sa zistí virúria BKV, alebo ako primárny testovací spôsob pre rutinný skrining.⁶ V súčasnosti neexistujú žiadne odporúčania na rutinné monitorovanie BKV u pacientov s HSCT a testovanie sa odporúča predovšetkým na vyhodnotenie pacientov s hematúriou a klinickými symptómami cystitídy. Avšak úroveň BKV DNA väčšia ako 10 000 kópií/ml sa spája s vyšším rizikom HC u pacientov s transplantátom.⁷

U pacientov s transplantovanou obličkou, ktorí majú konštantne zvýšenú úroveň BKV DNA v plazme, bežne definovanú ako meranie nad 10 000 kópií/ml, sa testovanie BKV v plazme odporúča vykonať každé 1 až 2 týždne dovtedy, kým sa úroveň DNA nevráti na nezistiteľnú hladinu v rámci dvoch po sebe nasledujúcich meraní.

Mnohé laboratórne testy na kvantifikáciu BKV nie sú štandardizované, čo vedie k vysokej variabilite medzi laboratóriami a medzi testami.^{6, 7} Okrem toho môžu zložky moču spôsobiť agregáciu BKV, čo môže tiež ovplyvniť kvantitatívnu variabilitu.^{8, 9} Formálne hodnotenie reprodukovateľnosti a platnosti úrovne BKV DNA je rozhodujúce na zabezpečenie konzistentných výsledkov (bez ohľadu na to, v ktorom laboratóriu sa test vykonal) pre klinický manažment pacientov s chorobami súvisiacimi s BKV.

Zatiaľ čo presná, zdravotnícky relevantná hranica hladiny vírusov je stále predmetom diskusie v dôsledku interanalytickej variability, koncept kritickej hranice sa javí ako platný a uvádza sa v štúdiách prírodnej histórie a ukazuje, že vyššie hodnoty úrovne BKV DNA sú spojené so zvýšeným rizikom rozvoja PVN a HC.^{6, 7}

Odôvodnenie použitia NAT testovania

Sérológia vírusu polyómu sa bežne nepoužíva v klinickom prostredí. Jej hodnota spočíva len v určení, či už bol pacient infikovaný BKV a podstupuje riziko opätovnej aktivácie. Metódy kultivácie vírusov sú zdĺhavé, pretože sú semikvantitatívne, majú malé využitie u imunokompromitovaných pacientov, kde sú bežné nízke hladiny vírusu. Priame zachytenie BKV DNA pomocou metód PCR potenciálne ponúka širokú dynamickú škálu, presnosť a optimálnu citlivosť a špecifickosť pre použitie u transplantovaných pacientov s transplantátom.

Vysvetlenie testu

cobas® BKV je kvantitatívny test, ktorý sa aplikuje pomocou systémov **cobas®** 6800 System a **cobas®** 8800 System. Test **cobas®** BKV umožňuje zaznamenanie a stanovenie množstva BKV DNA v EDTA plazme a moči stabilizovanom v médiu **cobas®** PCR Media u infikovaných pacientov. Úroveň BKV DNA je kvantifikovaná oproti kvantifikačnému štandardu bez BKV DNA (DNA-QS), ktorý sa aplikuje do každej vzorky počas jej spracovania. DNA-QS slúži takisto na monitorovanie celkovej prípravy vzorky a procesu amplifikácie procesu PCR. Okrem toho test používa tri externé kontroly: vysokú titer pozitívnu, nízku titer pozitívnu a negatívnu kontrolu.

Princípy procedúry

Test **cobas®** BKV je založený na plne automatizovanej príprave vzoriek (extrakcia nukleových kyselín a vyčistenie), po ktorých nasleduje amplifikácia PCR a detekcia. Systémy **cobas®** 6800/8800 System pozostávajú z modulu na podávanie vzoriek, prenosového modulu, spracovacieho modulu a analytického modulu. Automatizovaný manažment údajov sa vykonáva pomocou softvéru **cobas®** 6800/8800, ktorý priradzuje výsledky testovania všetkých testov buď ako cieľ nezistený, zistený BKV DNA < LLoQ (dolný limit kvantifikácie), zistený BKV DNA > ULoQ (horný limit kvantifikácie), alebo hodnota v lineárnom rozsahu $LLoQ < x < ULoQ$. Výsledky sa dajú sledovať priamo na systémovej obrazovke, môžu byť exportované alebo vytlačené ako správa.

Nukleové kyseliny zo vzoriek pacientov a pridané DNA-QS lambda molekuly sa extrahujú simultánne. V skratke, vírusová nukleová kyselina sa uvoľňuje pridaním proteínázy a dezintegračného činidla do vzorky. Uvoľnená nukleová kyselina sa viaže na silikátový povrch pridaných magnetických guľôčok. Neviazané látky a nečistoty ako je denaturovaný proteín, bunkový odpad a potenciálne PCR inhibitory sa odstraňujú následnými krokmi premývacieho činidla a vyčistená nukleová kyselina sa vymýva zo sklenených guľôčok pomocou elučného pufru pri vysokej teplote.

Selektívna amplifikácia cieľovej nukleovej kyseliny zo vzorky sa dosahuje pomocou špecifického prístupu k dvom cieľom v rámci DNA vírusu vo vysoko konzervovaných oblastiach BKV umiestnených v malej t-antigénovej oblasti BKV a BKV VP2 oblasti. Selektívna amplifikácia DNA-QS sa dosahuje pomocou sekvenčne špecifických priamych a reverzných primerov, ktoré sú navrhnuté, aby neboli homologické s genómom BKV. Na amplifikáciu DNA sa používa termostabilný enzým polymerázy. Cieľové sekvencie DNA-QS sa amplifikujú simultánne s použitím univerzálneho PCR amplifikačného profilu s krokmi vopred určenej teploty a počtom cyklov. Hlavná zmes zahŕňa deoxyuridín trifosfát (dUTP) namiesto deoxytymidín trifosfátu (dTTP), ktorý je zapracovaný do čerstvo syntetizovanej DNA (amplikón).^{10–12} Každý kontaminujúci amplikón z predchádzajúcich cyklov PCR sa po zahriatí počas prvého kroku tepelného cyklu eliminuje enzýmom AmpErase, ktorý je súčasťou zmesi PCR. Avšak novosformovaný amplikón sa neeliminuje, nakoľko enzým AmpErase sa deaktivuje, keď sa vystaví teplotám nad 55 °C.

Hlavná zmes testu **cobas**® BKV obsahuje dve detekčné sondy špecifické pre cieľové sekvencie BKV a jednu pre DNA-QS. Sondy sú označené cieľovo špecifickými fluorescenčnými reportérovými (indikačnými) farbivami, ktoré umožňujú súčasnú detekciu cieľových BKV a DNA-QS vo dvoch rôznych cieľových kanáloch.^{13, 14} Fluorescenčný signál intaktných sond je potláčaný zhášačom (tlmiacim farbivom). Počas kroku PCR amplifikácie vedie hybridizácia sondy k špecifickým jednovláknovým úsekom DNA k jej štiepeniu vplyvom 5' – 3' nukleázovej aktivity DNA polymerázy, čo vedie k separácii reportérových a zhášacích farbív a vzniku fluorescenčného signálu. Pri každom cykle PCR vzniká rastúce množstvo rozštiepených sond, čím súčasne dochádza k zosilneniu kumulovaného signálu reportéra. Zaznamenanie a diskriminácia PCR produktov v reálnom čase sa zavŕši meraním fluorescence uvoľnených signalizačných farieb pre vírusové ciele a DNA-QS.

Činidlá a materiály

cobas® BKV činidlá a kontroly

Materiály poskytované na test **cobas® BKV** uvádza Tabuľka 1. Požadované, no neposkytované materiály uvádza Tabuľka 2 až Tabuľka 4 a Tabuľka 7 až Tabuľka 9.

Informácie o nebezpečnosti produktu nájdete v časti **Činidlá a materiály** a **Preventívne opatrenia a požiadavky na manipuláciu**.

Tabuľka 1 cobas® BKV

cobas® BKV Skladujte pri 2 – 8 °C 192 testovacích kaziet (P/N 08688249190)		
Súčasť súpravy	Zloženie reagensii	Množstvo v súprave 192 testov
Roztok proteinázy (PASE)	Pufor Tris, < 0,05 % EDTA, chlorid vápenatý, octan vápenatý, 8 % proteináza EUH210: Na požiadanie možno poskytnúť kartu bezpečnostných údajov. EUH208: Obsahuje subtilizín. Môže vyvolať alergickú reakciu.	22,3 ml
Štandard DNA kvantifikácie (DNA QS)	Pufor Tris, < 0,05 % EDTA, < 0,001 % látka bez BKV DNA obsahujúca väzbu priméru bez BKV a jedinečná oblasť pre sondu (neinfekčná DNA), < 0,002 % Poly rA RNA (syntetická), < 0,1 % azid sodný	21,2 ml
Elučný pufor (EB)	Pufor Tris, 0,2 % metyl-4-hydroxybenzoát	21,2 ml
Hlavná zmes činidlo 1 (MMX-R1)	Octan manganatý, hydroxid draselný, < 0,1 % azid sodný	7,5 ml
BKV hlavná zmes činidlo 2 (BKV MMX-R2)	Pufor Tricín, octan draselný, < 18 % dimetylsulfoxid, glycerol, < 0,1 % Tween 20, EDTA, < 0,12 % dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,01 % BKV priméry priame a reverzné, < 0,01 % kvantifikačné štandardy primérov priamych a reverzných, < 0,01 % fluorescenčne značené oligonukleotidové sondy špecifické pre BKV a BKV kvantifikačný štandard, < 0,01 % oligonukleotidový aptamér, < 0,1 % Z05D DNA polymeráza, < 0,10 % AmpErase (uracil-N-glykozyláza) (mikrobiálna), < 0,1 % azid sodný	9,7 ml

Tabuľka 2 cobas® EBV/BKV Control Kit

cobas® EBV/BKV Control Kit Skladujte pri 2 – 8 °C (P/N 08688214190)			
Súčasťi súpravy	Zloženie reagentov	Množstvo v súprave	Bezpečnostný symbol a varovanie*
EBV/BKV nízko pozitívna kontrola (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001 % syntetický (plazmid) BKV DNA zakapsulovaný v lambda bakteriofágovom obaľovacom proteíne, normálna ľudská plazma, BKV DNA nezistiteľné metódami PCR. 0,1 % konzervačná látka ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  POZOR H317: Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. P261: Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov. P272: Je zakázané vynieť kontaminovaný pracovný odev z pracoviska. P280: Používajte ochranné rukavice. P333 + P313: Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvoria vyrážky: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. P362 + P364: Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte. P501: Zneškodnite obsah/nádobu v zariadení schválenom na likvidáciu odpadov. 55965-84-9 Reakčná masa: 5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón [EC č. 247-500-7] a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ón [EC č. 220-239-6] (3:1)
EBV/BKV vysoko pozitívna kontrola (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001 % syntetický (plazmid) BKV DNA zakapsulovaný v lambda bakteriofágovom obaľovacom proteíne, normálna ľudská plazma, BKV DNA nezistiteľné metódami PCR. 0,1 % konzervačná látka ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  POZOR H317: Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. P261: Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov. P272: Je zakázané vynieť kontaminovaný pracovný odev z pracoviska. P280: Používajte ochranné rukavice. P333 + P313: Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvoria vyrážky: Vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. P362 + P364: Kontaminovaný odev vyzlečte a pred ďalším použitím vyperte. P501: Zneškodnite obsah/nádobu v zariadení schválenom na likvidáciu odpadov. 55965-84-9 Reakčná masa: 5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón [EC č. 247-500-7] a 2-metyl-2H-izotiazol-3-ón [EC č. 220-239-6] (3:1)

* Označovanie bezpečnosti produktu vyplýva hlavne z nariadenia EÚ o systéme GHS.

** Nebezpečná látka.

Tabuľka 3 cobas® Buffer Negative Control Kit

cobas® Buffer Negative Control Kit

Skladujte pri 2 – 8 °C

(P/N 07002238190)

Súčasťi súpravy	Zloženie reagencií	Množstvo v súprave
cobas® pufoer negatívna kontrola (BUF (-) C)	Pufoer Tris, < 0,1 % azid sodný, EDTA, < 0,002 % poly rA RNA (syntetická)	16 ml (16 × 1 ml)

Činidlá cobas omni na prípravu vzoriek

Tabuľka 4 cobas omni činidlá pre prípravu vzorky*

Činidlá	Zloženie reagensí	Množstvo v súprave	Bezpečnostný symbol a varovanie**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Skladujte pri 2 – 8 °C. (P/N 06997546190)	Magnetické sklenené častice, pufo Tris, 0,1% metyl-4 hydroxybenzoát, < 0,1% azid sodný	480 testov	Netýka sa
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Skladujte pri 2 – 8 °C. (P/N 06997511190)	Pufo Tris, 0,1 % metyl-4-hydroxybenzoát, < 0,1 % azid sodný	4 × 875 ml	Netýka sa
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Skladujte pri 2 – 8 °C. (P/N 06997538190)	43 % (w/w) guanidíntiokyanát***, 5 % (w/v) polidocanol***, 2 % (w/v) dithiothreitol***, dihydro citran sodný	4 × 875 ml	  NEBEZPEČENSTVO H302 + H332: Zdraviu škodlivý pri požití alebo vdýchnutí. H314: Spôsobuje vážne poleptanie a poškodenie očí. H412: Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami. EUH032: Pri kontakte s kyselinami uvoľňuje veľmi toxický plyn. P261: Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/aerosólov. P273: Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia. P280: Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. P303 + P361 + P353: PRI KONTAKTE S POKOŽKOU (alebo vlasmi): Vyzlečte všetky kontaminované časti odevu. Pokožku opláchnite vodou. P304 + P340 + P310: PO VDÝCHNUTÍ: Presuňte osobu na čerstvý vzduch a umožnite jej pohodlne dýchať. Okamžite volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/lekára. P305 + P351 + P338 + P310: PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. Okamžite volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ CENTRUM/lekára. 593-84-0 Guanidinium thiocyanate 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutane-2,3-diol
cobas omni Wash Reagent (WASH) Skladujte pri 15 – 30 °C. (P/N 06997503190)	Dihydrát citrónanu sodného, 0,1 % metyl-4-hydroxybenzoát	4,2 l	Netýka sa

* Tieto činidlá nie sú zahrnuté v testovacej súprave cobas® BKV. Pozrite si zoznam ďalších vyžadovaných materiálov (Tabuľka 7).

** Označovanie bezpečnosti produktu vyplýva hlavne z nariadenia EÚ o systéme GHS.

*** Nebezpečná látka.

Požiadavky na skladovanie činidiel a manipuláciu s nimi

Činidlá sa musia skladovať a musí sa s nimi zaobchádzať tak, ako to uvádza Tabuľka 5 a Tabuľka 6.

Keď činidlá nie sú vložené v systéme **cobas®** 6800/8800 System, skladujte ich za náležitej teploty, ako to uvádza Tabuľka 5.

Tabuľka 5 Skladovanie činidiel (keď činidlo nie je v systéme)

Činidlo	Teplota skladovania
cobas® BKV – 192	2 – 8 °C
cobas® EBV/BKV Control Kit	2 – 8 °C
cobas® Buffer Negative Control Kit	2 – 8 °C
cobas omni Lysis Reagent	2 – 8 °C
cobas omni MGP Reagent	2 – 8 °C
cobas omni Specimen Diluent	2 – 8 °C
cobas omni Wash Reagent	15 – 30 °C

Činidlá vložené do systémov **cobas®** 6800/8800 System sa uchovávajú pri správnej teplote a ich expiráciu monitoruje systém. Systémy **cobas®** 6800/8800 System umožňujú použiť činidlá, iba ak sú splnené všetky podmienky, ktoré uvádza Tabuľka 6. Systém automaticky zabráňuje použitiu exspirovaných činidiel. Tabuľka 6 umožňuje používateľovi oboznámiť sa s podmienkami manipulácie s činidlami, ktoré vyžadujú systémy **cobas®** 6800/8800 System.

Tabuľka 6 Podmienky týkajúce sa expirácie činidiel vyžadované systémami **cobas®** 6800/8800 System

Činidlo	Dátum expirácie súpravy	Stabilita otvorenej súpravy	Počet cyklov, pri ktorom sa môže táto súprava použiť	Stabilita v zariadení (súhrnný čas v zariadení mimo chladničky)
cobas® BKV – 192	Neexpirované	90 dní od prvého použitia	Max. 40 cyklov	Max. 40 hodín
cobas® EBV/BKV Control Kit	Neexpirované	Netýka sa ^a	Netýka sa	Max. 8 hodín
cobas® Buffer Negative Control Kit	Neexpirované	Netýka sa ^a	Netýka sa	Max. 10 hodín
cobas omni Lysis Reagent	Neexpirované	30 dní od vloženia*	Netýka sa	Netýka sa
cobas omni MGP Reagent	Neexpirované	30 dní od vloženia*	Netýka sa	Netýka sa
cobas omni Specimen Diluent	Neexpirované	30 dní od vloženia*	Netýka sa	Netýka sa
cobas omni Wash Reagent	Neexpirované	30 dní od vloženia*	Netýka sa	Netýka sa

^a Činidlá na jedno použitie.

* Čas sa meria od prvého vloženia činidla do systémov **cobas®** 6800/8800 System.

Ďalšie vyžadované materiály

Tabuľka 7 Materiály a spotrebný materiál pre použitie v systémoch **cobas® 6800/8800 System**

Materiál	P/N
Platnička na spracovanie cobas omni	05534917001
Platnička na amplifikáciu cobas omni	05534941001
Pipetové špičky cobas omni	05534925001
Nádoba na tekutý odpad cobas omni	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Vrece na tuhý odpad a nádoba na tuhý odpad alebo vrece na tuhý odpad s vložkou a zásuvkou na súpravu	07435967001 a 07094361001 alebo 08030073001 a 08387281001
Nádoba na tuhý odpad	07094361001
cobas omni sekundárne skúmavky 13 × 75 (voliteľné)	06438776001
Súprava so sekundárnymi skúmavkami s médiom cobas® PCR Media*	07958048190
Súprava náhradných viečok na skúmavky s médiom cobas® PCR Media	07958056190
Stojan na jednorazové skúmavky s médiom cobas® PCR Media (voliteľný)	07958064190

* Na používanie testu **cobas®** BKV sa požadujú stojany MPA 16 mm a/alebo RD5. Stojan MPA 16 mm sa požaduje na vkladanie sekundárnych skúmaviek s médiom **cobas®** PCR Media do systému **cobas® 6800/8800 System**. Ak potrebujete podrobný objednávací zoznam stojanov na vzorky, stojanov na špičky so zrazeninou a zásuvkových stojanov, ktoré možno použiť v týchto prístrojoch, obráťte sa na miestneho zástupcu spoločnosti Roche.

Tabuľka 8 Súpravy na odber vzoriek moču na použitie s testom **cobas®** BKV

Súprava na odber	P/N
Súprava na vzorky moču s médiom cobas® PCR Urine Sample Kit	05170486190
Súprava média cobas® PCR Media	06466281190

Poznámka: Súprava **cobas®** PCR Urine Sample Kit sa používa na odber a prepravu vzoriek moču. Každá súprava **cobas®** PCR Urine Sample Kit obsahuje 100 vreciek na vzorky moču **cobas®** PCR. Každé vrečko obsahuje 1 jednorazovú pipetu a 1 skúmavku s médiom **cobas®** PCR Media so 4,3 ml média **cobas®** PCR Media. Médium **cobas®** PCR Media slúži ako transportné a skladovacie médium na stabilizáciu nukleových kyselín pre vzorky moču. V prípade vzoriek moču zaslaných priamo do laboratória bez použitia súpravy na odber vzoriek moču **cobas®** PCR Urine Sample Kit na odber sa môže ako alternatíva použiť súprava média **cobas®** PCR Media, ktorá obsahuje 100 skúmaviek s médiom **cobas®** PCR Media (bez jednorazových pipiet), no moč sa musí preniesť do 24 hodín od odberu.

Vyžadované prístrojové vybavenie a softvér

Softvér systému **cobas**® 6800/8800 a analytický balík testu **cobas**® BKV sa musí nainštalovať do prístrojov. Server Instrument Gateway (IG) bude dodaný so systémom.

Tabuľka 9 Prístroje

Príslušenstvo	P/N
Systém cobas ® 6800 System (prenosná verzia)	05524245001 a 06379672001
Systém cobas ® 6800 System (neprenosná verzia)	05524245001 a 06379664001
cobas ® 8800 System	05412722001
Modul na podávanie vzoriek	06301037001

Poznámka: v rámci testu **cobas**® BKV je možné použiť primárnu skúmavku použitú na typy vzoriek moču odobratých do média **cobas**® PCR Media. Dodatočné informácie nájdete v používateľskej príručke a/alebo návode na obsluhu pre systémy **cobas**® 6800/8800 System.

Preventívne opatrenia a požiadavky na manipuláciu

Výstrahy a preventívne opatrenia

Ako pri každej testovacej procedúre, aj v tomto prípade platí, že základom správneho vykonania tejto analýzy je dodržanie osvedčených laboratórnych postupov. Vzhľadom na vysokú citlivosť tohto testu je potrebné zachovať najvyššiu opatrnosť pri uchovaní čistoty činidiel a amplifikačných zmesí.

- Iba na diagnostické použitie *in vitro*.
- Test **cobas**® BKV nebol validovaný na testovanie prítomnosti BKV v krvi alebo krvných produktoch.
- So všetkými vzorkami od pacientov sa musí zaobchádzať ako s infekčným materiálom a musia sa dodržiavať osvedčené laboratórne postupy uvedené v materiáli Biologická bezpečnosť v mikrobiologických a biomedických laboratóriách (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories) a v dokumente CLSI M29-A4.^{15, 16} Túto procedúru musia vykonávať len osoby so skúsenosťami s používaním systémov **cobas**® BKV a **cobas**® 6800/8800 System vyškolené v oblasti manipulácie s infekčnými materiálmi.
- Všetky produkty z ľudského tela musia byť považované za potenciálne infekčné a malo by sa s nimi nárábať v súlade s bežnými bezpečnostnými pokynmi. Ak dôjde k rozliatiu, zasiahnuté miesto okamžite dezinfikujte čerstvo pripraveným 0,6 % roztokom chlórnanu sodného alebo draselného v destilovanej alebo deionizovanej vode (rozriedené domáce bielidlo v pomere 1 : 10) alebo postupujte podľa príslušných smerníc daného pracoviska.
- Kontrolná súprava **cobas**® EBV/BKV Control Kit obsahuje plazmu odvodenú z ľudskej krvi. Zdrojový materiál testovali pomocou metód PCR a preukázal prijateľné stopy nízkych hodnôt BKV DNA. Žiadna známa testovacia metóda nemôže plne zaručiť, že nedôjde k prenosu infekčných činiteľov produktmi odvodenými z ľudskej krvi.
- Nezmrazujte plnú krv ani akékoľvek vzorky moču uložené v primárnych skúmavkách.**
- Ak chcete zabezpečiť optimálne vykonanie testu, používajte len dodaný alebo špecifikovaný vyžadovaný spotrebný materiál.
- Karty bezpečnostných údajov (SDS) sú k dispozícii na požiadanie od miestneho zástupcu spoločnosti Roche.
- Dôsledne dodržiavajte poskytnuté postupy a usmernenia, aby ste zabezpečili správne vykonanie testu. Akákoľvek odchýlka od postupov a usmernení môže mať vplyv na optimálny priebeh testu.
- Ak sa pri manipulácii so vzorkami a ich spracovaní primerane nekontroluje prenos vzoriek, môže dôjsť k chybným pozitívnym výsledkom.

- Médium **cobas®** PCR Media (z primárnej skúmavky na vzorku) obsahuje guanidín hydrochlorid. **Dbajte na to, aby nedošlo k priamemu kontaktu guanidín hydrochloridu a chlórnanu sodného (bieliaci roztok) alebo vysokoreaktívnych činidiel, akými sú napr. kyseliny alebo zásady. Tieto zmesi môžu uvoľňovať škodlivý plyn.** Ak dôjde k rozliatiu tekutiny, ktorá obsahuje guanidín hydrochlorid, vyčistite zasiahnuté miesto vhodným laboratórnym detergentom a vodou. Ak rozliata kvapalina obsahuje potenciálne infekčné látky, zasiahnuté miesto **NAJSKÔR** vyčistite laboratórnym detergentom a vodou a potom 0,6 % roztokom chlórnanu sodného alebo draselného.

Manipulácia s činidlami

- So všetkými činidlami, kontrolnými vzorkami a vzorkami zaobchádzajte v súlade s osvedčenými laboratórnymi postupmi tak, aby sa predišlo prenosu vzoriek alebo kontrolných vzoriek.
- Pred použitím skontrolujte všetky kazety s činidlami, rozpúšťadlá, dezintegračné činidlá a premývacie činidlá, či nevykazujú znaky unikania. Ak činidlo uniká, tento materiál na testovanie nepoužívajte.
- Dezintegračné činidlo **cobas omni** Lysis Reagent obsahuje guanidín tiokyanát, čo je potenciálne nebezpečná chemikália. Dbajte na to, aby nedošlo ku kontaktu týchto činidiel s pokožkou, očami alebo sliznicami. Ak dôjde ku kontaktu, zasiahnuté miesto okamžite opláchnite veľkým množstvom vody. V opačnom prípade hrozí riziko popálenín.
- Testovacie súpravy **cobas®** BKV, **cobas omni** MGP Reagent a **cobas omni** Specimen Diluent obsahujú azid sodíka ako konzervačný prípravok. Dbajte na to, aby nedošlo ku kontaktu týchto činidiel s pokožkou, očami alebo sliznicami. Ak dôjde ku kontaktu, zasiahnuté miesto okamžite opláchnite veľkým množstvom vody. V opačnom prípade hrozí riziko popálenín. Ak dôjde k rozliatiu týchto činidiel, pred ich vysušením rozliate činidlá zriedte vodou.
- Dbajte, aby nedošlo ku kontaktu dezintegračného činidla **cobas omni** Lysis Reagent, ktoré obsahuje guanidíntiokyanát, s chlórnanovým (bieliacim) roztokom. V opačnom prípade môže dôjsť k tvorbe vysokotoxického plynu.
- Všetky materiály, ktoré prišli do styku so vzorkami a činidlami, zlikvidujte v súlade so štátnymi a miestnymi predpismi.

Vhodné laboratórne postupy

- Pipetu nenapĺňajte pomocou úst.
- V pracovných priestoroch nejedzte, nepite a nefajčite.
- Pri manipulácii so vzorkami a činidlami používajte laboratórne rukavice, laboratórne plášte a ochranné prostriedky na oči. Aby sa zabránilo kontaminácii, medzi jednotlivými manipuláciami so vzorkami a súpravami **cobas®** BKV, kontrolou EBV/BKV Low Positive Control (EBV/BKV L(+))C), kontrolou EBV/BKV High Positive Control (EBV/BKV H(+))C), súpravami **cobas®** Buffer Negative Control Kit a činidlami **cobas omni** je potrebné, aby si operátor vymenil rukavice. Pri manipulácii so vzorkami a kontrolnými vzorkami dbajte na to, aby nedošlo ku kontaminácii rukavíc.
- Po ukončení práce so vzorkami a činidlami súpravy a po sňatí rukavíc si dôkladne umyte ruky.
- Všetky pracovné povrchy v laboratóriu dôkladne vyčistite a vydezinfikujte pomocou čerstvo pripraveného 0,6 % roztoku chlórnanu sodného alebo draselného v deionizovanej alebo destilovanej vode (bežné domáce bielidlo zriedené v pomere 1 : 10). Následne pracovné povrchy utrite utierkou namočenou do 70 % etanolu.
- Ak dôjde k rozliatiu na prístroji **cobas®** 6800/8800, postupujte podľa pokynov v používateľskej príručke a/alebo návode na obsluhu systémov **cobas®** 6800/8800 System, aby sa povrch materiálu poriadne vyčistil a dekontaminoval.

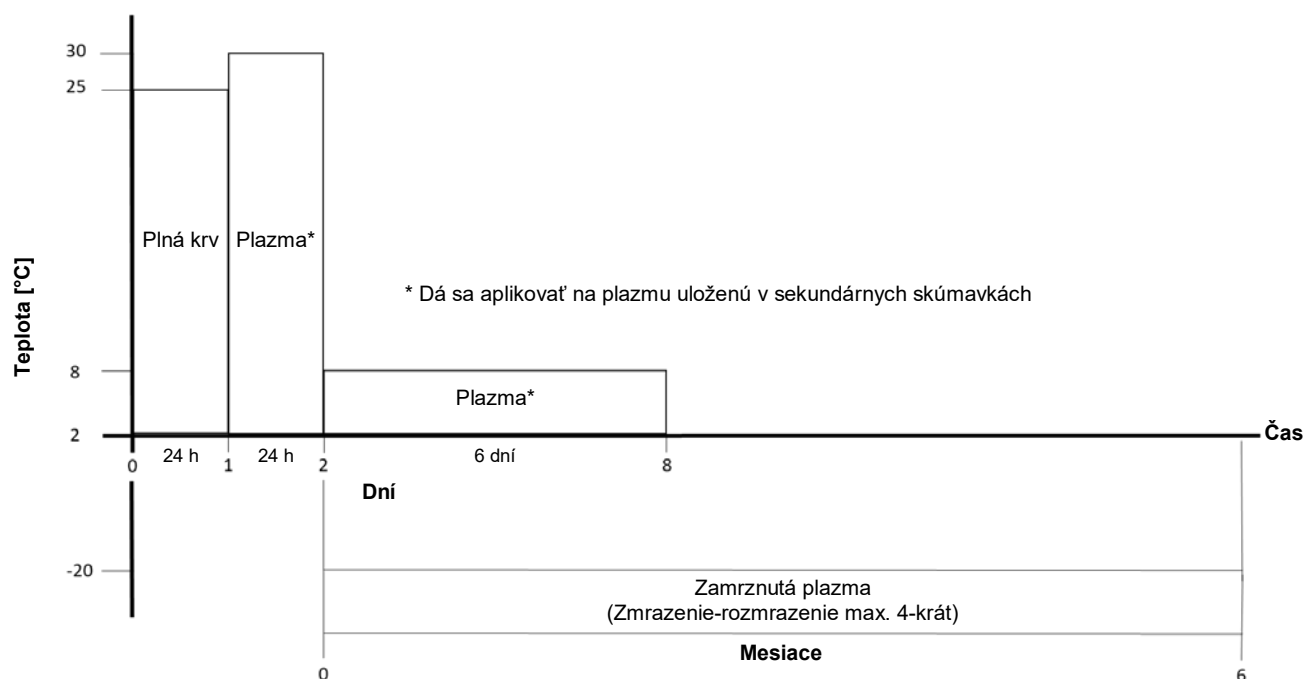
Odber, preprava a skladovanie vzoriek

Poznámka: So všetkými vzorkami a kontrolnými vzorkami zaobchádzajte tak, ako keby boli schopné prenosu infekčných činiteľov.

Vzorky EDTA plazmy

- Všetky vzorky skladujte pri určených teplotách. Zvýšenie teploty má vplyv na stabilitu vzoriek.
- Ak používate zmrazené vzorky v sekundárnych skúmavkách, nechajte vzorky temperovať pri izbovej teplote (15 až 30 °C), až kým sa úplne nerozpustia, potom ich zľahka premiešajte (napr. vortexovaním po dobu 3 – 5 sekúnd) a odstred'ite, aby sa celý obsah vzorky zhromaždil na dne skúmavky.
- Plná krv sa musí odberať do skúmaviek BD Vacutainer® PPT™ na prípravu plazmy pre molekulárne diagnostické testovacie metódy alebo do sterilných skúmaviek za použitia EDTA ako antikoagulantu. Postupujte podľa pokynov výrobcu pre odber vzoriek. Pozrite si Obr. 1.
- Celá krv odobratá do skúmaviek na prípravu plazmy BD Vacutainer® PPT™ na molekulárne diagnostické testovacie metódy alebo do sterilných skúmaviek pomocou antikoagulantu EDTA sa môže skladovať alebo prepravovať do 24 hodín pri teplote 2 – 25 °C pred prípravou plazmy. Odstred'ovanie sa musí vykonať podľa pokynov výrobcu.
- Po oddelení sa vzorky plazmy môžu skladovať 24 hodín pri 2 až 30 °C v primárnych alebo sekundárnych skúmavkách, a následne:
 - Skladujte v primárnych alebo sekundárnych skúmavkách max. 6 dní pri teplote 2 až 8 °C.
 - Skladujte s sekundárnych skúmavkách max. 6 mesiacov pri teplote ≤ –20 °C.
- Vzorky plazmy sú stabilné počas max. 4 cyklov zmrazenia/rozmrazenia, keď sú zamrazené na ≤ –20 °C.
- Ak chcete vzorky prepravovať, je potrebné ich zabaliť a označiť v súlade s platnými štátnymi alebo medzinárodnými predpismi zahŕňajúcimi prepravu vzoriek a etiologických látok.

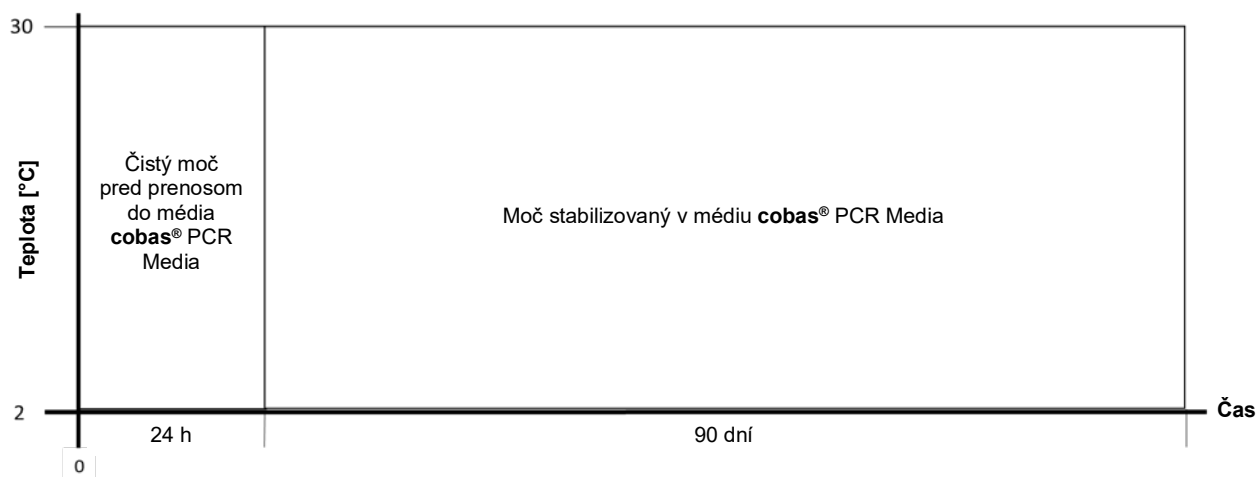
Obr. 1 Podmienky skladovania vzoriek EDTA plazmy



Vzorky moču

- Na odber a stabilizáciu vzoriek moču pre test **cobas®** BKV používajte len súpravu na vzorky moču **cobas®** PCR Urine Sample Kit. Test **cobas®** BKV nebol schválený na použitie s inými pomôckami na odber moču ani inými typmi médií. Používanie testu **cobas®** BKV s inými pomôckami na odber moču alebo inými typmi médií môže viesť k nepravdivým negatívnym, nepravdivým pozitívnym alebo neplatným výsledkom.
- Vzorky moču musia byť do skúmavky (stabilizovanej) s médiom **cobas®** PCR Media prenesené okamžite. Ak vzorky nemožno preniesť okamžite, môžu sa skladovať maximálne 24 hodín pri teplote 2 °C až 30 °C. Po stabilizácii vzoriek moču v médiu **cobas®** PCR Media sa dajú vzorky skladovať maximálne 90 dní pri teplote 2 až 30 °C. Pozrite si Obr. 2.
- Netestované vzorky moču musia mať vrch hladiny kvapaliny medzi dvoma čiernymi čiarami na okienku štítiku na skúmavke s médiom **cobas®** PCR Media. Ak je hladina kvapaliny nižšie alebo vyššie ako tieto čiary, vzorka nebola správne odobratá a nemôže sa použiť na testovanie.
- Ak nemáte dostatočný objem moču (4,3 ml) na zriedenie v skúmavke na vzorku moču **cobas®** PCR Urine Sample tube, moč možno zriediť manuálne pomocou média **cobas®** PCR Media. Pred testovaním pomocou testu **cobas®** BKV treba v médiu **cobas®** PCR Media zriediť aspoň 0,5 ml čistého moču (pomer 1 : 1).
- Ak chcete zabrániť krížovej kontaminácii spracovaných vzoriek, používajte na skúmavky s médiom **cobas®** PCR Media ďalšie uzávery s alternatívnymi farbami (bezfarebné, pozrite časť **Ďalšie vyžadované materiály**), ktorými môžete uzavrieť vzorky po ich spracovaní.
- Ak sa vyžaduje ďalšie testovanie, v skúmavke s médiom **cobas®** PCR Media musí zostať aspoň 1,2 ml vzorky.
- Ak chcete vzorky prepravovať, je potrebné ich zabaliť a označiť v súlade s platnými štátnymi alebo medzinárodnými predpismi zahŕňajúcimi prepravu vzoriek a etiologických látok.

Obr. 2 Podmienky skladovania vzoriek moču



Návod na použitie

Procedurálne poznámky

- Nepoužívajte činidlá **cobas®** BKV, **cobas®** EBV/BKV Control Kit, **cobas®** Buffer Negative Control Kit alebo činidlá **cobas omni** po dátumoch ich expirácie.
- Spotrebný materiál nepoužívajte opakovane. Je určený len na jedno použitie.
- Dbajte na to, aby boli štítky s čiarovými kódmi vzoriek na skúmavkách so vzorkami viditeľné cez otvory na bočnej strane stojanov na vzorky RD5 alebo MPA. Správne špecifikácie čiarových kódov a ďalšie informácie o vkladaní skúmaviek so vzorkami nájdete v návode na obsluhu systémov **cobas®** 6800/8800 System.
- Informácie o správnej údržbe nástrojov nájdete v používateľskej príručke a/alebo návode na obsluhu systému **cobas®** 6800/8800 System.

Prevádzka cobas® BKV

Test **cobas®** BKV možno spustiť s minimálnym požadovaným objemom vzorky 350 µl pre EDTA plazmu a 550 µl pre vzorky stabilizovaného moču. Postup testu prístroja je podrobne opísaný v používateľskej príručke a/alebo návode na obsluhu systému **cobas®** 6800/8800 System. Obrázok 3 uvedený nižšie obsahuje súhrnné informácie o procedúre.

- Vzorky sa musia otvoriť a vložiť priamo do stojanov na spracovanie v systémoch **cobas®** 6800/8800 System.
- Jeden cyklus môže obsahovať kombináciu vzoriek (plazma, stabilizovaný moč).
- Vzorky v EDTA plazme a vzorky stabilizovaného moču treba spracovať pomocou výberu typu vzorky v používateľskom rozhraní (UI) testu **cobas®** BKV, ako uvádza Obr. 3, krok 1.

Obr. 3 **cobas® BKV – postup**

1	Prihláste sa do systému. Stlačením tlačidla „Start“ (Štart) pripravte systém. Vyžadajte vykonanie testov. • Vyberte možnosť „Plasma“ (Plazma) na vyžiadanie vzoriek EDTA plazmy. • Vyberte možnosť „Urine“ (Moč) na vyžiadanie vzoriek moču odobratých do média cobas® PCR Media.
2	Doplňte činidlá a spotrebný materiál podľa pokynov systému. • Vložte kazetu so špecifickými testovacími reagensiami. • Vložte kazety s kontrolnými vzorkami. • Vložte špičky pipiet. • Vložte platničky na spracovanie. • Vložte činidlo MGP. • Vložte platničky na amplifikáciu. • Doplňte riedidlo na vzorky. • Doplňte dezintegračné činidlo. • Doplňte výplachové činidlo.
3	Vloženie vzoriek do systému • Pre primárne vzorky moču odobraté do média cobas® PCR Media. ◦ Otvorte skúmavku. ◦ Preneste skúmavku priamo do stojana. • Vložte stojan na vzorky a stojany na špičky so zrazeninou do modulu na podávanie vzoriek. • Skontrolujte, či prenosový modul akceptoval vzorky.
4	Uvedte do prevádzky pomocou tlačidla „Start manually“ (Štart manuálne) na používateľskom rozhraní alebo nechajte, nech sa spustí automaticky po 120 minútach alebo keď je testovací cyklus plný.
5	Skontrolujte a exportujte výsledky.
6	V prípade potreby vyberte a uzavrite na budúce použitie skúmavky so vzorkami, ktoré vyhovujú minimálnym požiadavkám na objem. Vyčistite prístroj. • Vyberte prázdne kazety na kontrolné vzorky. • Vyprázdňte zásuvku s doštičkou na amplifikáciu. • Odstráňte tekutý odpad. • Odstráňte tuhý odpad.

Výsledky

Systémy **cobas**® 6800/8800 System automaticky určia koncentráciu BKV DNA a kontroly. Koncentrácia BKV DNA je vyjadrená v medzinárodných jednotkách na milimeter (IU/ml).

Kontrola kvality a platnosť výsledkov

- Pri každom testovacom cykle sa vykonáva jedna negatívna kontrola [(-) C] a dve pozitívne kontroly, nízko-pozitívna kontrola [EBV/BKV L(+)C] a vysokopozitívna kontrola [EBV/BKV H(+)C].
- Skontrolujte, či sa v softvéri **cobas**® 6800/8800 a/alebo správe nevyskytujú upozornenia a pozrite si súvisiace výsledky, aby ste sa uistili, že je spracovanie platné.
- Testovací cyklus je platný, ak sa žiadny príznak neobjavuje pri žiadnej z troch kontrol, ktoré zahŕňajú jednu negatívnu kontrolu a dve pozitívne kontroly: EBV/BKV L(+)C, EBV/BKV H(+)C. Výsledok negatívnej kontroly sa zobrazuje ako (-) C a nízka a vysoká pozitívna kontrola sa zobrazujú ako EBV/BKV L(+)C a EBV/BKV H(+)C.

Zneplatnenie výsledkov vykoná automaticky softvér **cobas**® 6800/8800 na základe zlyhania negatívnej a pozitívnej kontroly vzorky.

Príznaky kontrolných vzoriek

Tabuľka 10 Príznaky kontrolných vzoriek pre negatívne a pozitívne kontrolné vzorky

Negatívna kontrola	Príznak	Výsledok	Interpretácia
(-) C	Q02 (Kontrola testovacieho cyklu zlyhala)	Invalid	Neplatný výsledok alebo výsledok vypočítanej titrácie pre negatívnej kontroly nie je negatívny.
Pozitívna kontrola	Príznak	Výsledok	Interpretácia
EBV/BKV L(+)C	Q02 (Kontrola testovacieho cyklu zlyhala)	Invalid	Neplatný výsledok alebo vypočítaný výsledok titrácie pre nízko-pozitívnu kontrolnú látku je mimo priradeného rozsahu.
EBV/BKV H(+)C	Q02 (Kontrola testovacieho cyklu zlyhala)	Invalid	Neplatný výsledok alebo vypočítaný výsledok titrácie pre vysokopozitívnu kontrolnú látku je mimo priradeného rozsahu.

Ak je kontrola testovacieho cyklu neplatná, skontrolujte testovanie všetkých vzoriek predmetného testovacieho cyklu.

Interpretácia výsledkov

Pri platných výsledkoch skontrolujte v softvéri **cobas®** 6800/8800 a/alebo správe, či sa pri jednotlivých vzorkách nevyskytli príznaky. Výsledky interpretácie majú byť nasledovné:

- Platný testovací cyklus môže zahŕňať platné aj neplatné výsledky vzoriek.

Tabuľka 11 Cieľové výsledky na interpretáciu individuálneho cieľového výsledku

Výsledky	Interpretácia
Target Not Detected	BKV DNA nebol zistený. Výsledky interpretujte ako „BKV nezistený“.
< Titer Min	Vypočítaná titrácia je nižšia ako spodný limit kvantifikácie (LLOQ) tejto analýzy. Výsledky interpretujte ako „BKV zistený, menej ako (Titer Min)“. Minimálna titrácia v EDTA plazme = 21,5 IU/ml Minimálna titrácia v moči = 200 IU/ml
Titer	Vypočítaná titrácia je v rámci lineárneho rozsahu analýzy – väčšia ako alebo rovná Titer Min a menšia ako alebo rovná Titer Max. Výsledky interpretujte ako „(Titer) BKV zistený“.
> Titer Max ^a	Vypočítaná titrácia je vyššia ako vrchný limit kvantifikácie (LLOQ) tejto analýzy. Výsledky interpretujte ako „BKV zistený, väčší ako (Titer Max)“. Maximálna titrácia v EDTA plazme a moči = 1,0E+08 IU/ml

^a Výsledok vzorky > Titer Max odkazuje na BKV pozitívne vzorky zistené s titráciami nad vrchným limitom kvantifikácie (ULOQ). Ak sa vyžadujú kvantitatívne výsledky, pôvodnú vzorku treba zriediť s BKV – negatívnou ľudskou EDTA plazmou a test sa musí opakovať. Hlásený výsledok vynásobte zriedovacím faktorom.

Procedurálne obmedzenia

- Test **cobas®** BKV bol hodnotený len na použitie v kombinácii s **cobas®** EBV/BKV Control Kit, **cobas®** Buffer Negative Control Kit, **cobas omni** MGP Reagent, **cobas omni** Lysis Reagent, **cobas omni** Specimen Diluent a **cobas omni** Wash Reagent pre použitie v systémoch **cobas®** 6800/8800 System.
- Spoľahlivosť výsledkov závisí od správneho postupu odberu, uchovávaní a spracovania vzoriek.
- Tento test bol schválený iba na použitie s EDTA plazmou a stabilizovaným močom. Testovanie iných typov vzoriek pomocou testu **cobas®** BKV môže spôsobiť nepresné výsledky. Merania úrovne DNA z plazmy a stabilizovaného moču nie sú priamo navzájom ani s inými typmi vzoriek porovnateľné.
- Kvantifikáciu BKV DNA môže ovplyvniť metóda odberu vzorky, faktory pacienta (napr. vek, prítomnosť symptómov) a/alebo stav infekcie.
- Degradácia BKV DNA v čistom moči môže ovplyvniť kvantifikáciu.¹⁷ Na dosiahnutie stability vzorky sa vyžaduje prenos moču do média **cobas®** PCR Media.
- Kvantitatívna variabilita BKV DNA inherentnej pre moč sa pozorovala pri pokusoch o stabilitu vzoriek v rôznych časových bodoch odberu vzoriek (čistý moč) alebo v rôznych alikvotných častiach tej istej vzorky (čistý moč a moč stabilizovaný v médiu **cobas®** PCR Media).
- Vzhľadom na tieto obmedzenia sa majú výsledky BKV DNA v moči interpretovať uvažlivo v súvislosti s klinickými a inými laboratórnymi nálezmi a nesmú byť jediným základom rozhodnutí o liečbe.
- Moč môže obsahovať vysoké úrovne BKV DNA s rizikom prenosu kontaminácie.¹⁸
- Ako pri každom molekulárnom teste, mutácie v rámci cieľových oblastí testu **cobas®** BKV by mohli ovplyvniť viazanie priméru a/alebo sondy, čo má za následok podhodnotenie množstva vírusu alebo zlyhanie zaznamenania prítomnosti vírusu.
- V dôsledku príslušných odlišností medzi technológiami sa odporúča, aby používateľ pred zmenou technológie v laboratóriu vykonal štúdie korelácie metódy na účely kvalifikácie technologických rozdielov. Používatelia sa musia riadiť svojimi špecifickými zásadami alebo postupmi.

- Test **cobas®** BKV nie je určený na testovanie prítomnosti BKV v krvi alebo krvných produktoch.

Hodnotenie neklinickej účinnosti

Kľúčové ukazovatele účinnosti pre typ vzorky s EDTA plazmou

Detekčný limit (LoD), medzinárodný štandard WHO

Detekčný limit testu **cobas®** BKV pre medzinárodný štandard WHO bol určený analýzou sériových riedení 1. medzinárodného štandardu WHO BKV získaného z NIBSC (NIBSC 14/212) v BKV negatívnej ľudskej EDTA plazmy. Skupina šiestich úrovní koncentrácie plus slepá sa testovali na troch šaržach činidiel **cobas®** BKV, viacnásobnými cyklami, počas viacerých dní, rôznymi operátormi a na viacerých prístrojoch.

Výsledky pre EDTA plazmu uvádza Tabuľka 12 a Tabuľka 14. Štúdia ukazuje, že pri najmenej citlivej šarži je koncentrácia, pre ktorú PROBIT predpokladá 95-percentnú mieru úspešnosti, 21,5 IU/ml s 95-percentným rozsahom spoľahlivosti od 16,3 do 32,4 IU/ml v EDTA plazme. Najnižšia koncentrácia s mierou úspešnosti $\geq 95\%$ je 19,0 IU/ml v EDTA plazme.

Tabuľka 12 Detekčný limit v EDTA plazme, šarža 1

Vstupná titrácia koncentrácie (BKV DNA IU/ml)	Počet platných replikátov	Počet pozitívnych	Pomerná úspešnosť v %
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
Det. limit podľa PROBIT pri 95 % pomernej úspešnosti	21,5 IU/ml Interval spoľahlivosti 95 %: 16,3 – 32,4 IU/ml		

Tabuľka 13 Detekčný limit v EDTA plazme, šarža 2

Vstupná titrácia koncentrácie (BKV DNA IU/ml)	Počet platných replikátov	Počet pozitívnych	Pomerná úspešnosť v %
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
Det. limit podľa PROBIT pri 95 % pomernej úspešnosti	19,7 IU/ml Interval spoľahlivosti 95 %: 15,0 – 29,2 IU/ml		

Tabuľka 14 Detekčný limit v EDTA plazme, šarža 3

Vstupná titrácia koncentrácie (BKV DNA IU/ml)	Počet platných replikátov	Počet pozitívnych	Pomerná úspešnosť v %
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
Det. limit podľa PROBIT pri 95 % pomerné úspešnosti	19,3 IU/ml Interval spoľahlivosti 95 %: 14,8 – 28,5 IU/ml		

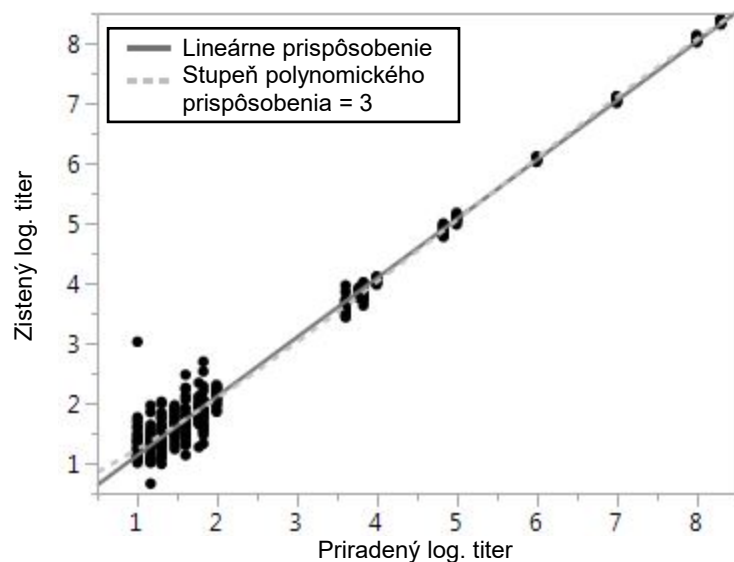
Lineárny rozsah

Linearita testu **cobas®** BKV bola hodnotená s použitím sérií riedení pozostávajúcich z 18 členov skupiny s BKV podskupiny lb DNA v rozsahu lineárneho rozpätia analýzy. Vysoký titer zásobnej lambda DNA sa použil na prípravu 11 členov panelu v rozsahu celého lineárneho rozpätia. Klinická vzorka sa použila na prípravu 7 členov skupiny na pokrytie stredných a nižších úrovní lineárneho rozsahu.

Každého člena skupiny testovali v 36 replikátoch troma šaržami činidiel **cobas®** BKV a výsledky štúdie sú uvedené na Obr. 4.

cobas® BKV sa ukázal ako lineárny od $1,01\text{E}+01$ do $1,97\text{E}+08$ IU/ml a ukazuje absolútnu odchýlku od lepšie sa hodiacej nelineárnej regresie menšiu alebo rovnú $\pm 0,1 \log_{10}$ v ľudskej EDTA plazme (pozri Obr. 4). V lineárnom rozsahu je presnosť testu v rozmedzí $\pm 0,2 \log_{10}$.

Obr. 4 Určenie lineárneho rozsahu v EDTA plazme



Presnosť – v laboratóriu

Presnosť testu **cobas®** BKV bola určená analýzou série riedení s vysokým titrom BKV DNA (podskupina Ib) v BKV-negatívnej EDTA plazme. Päť úrovní riedenia sa testovalo na 72 replikátoch pre každú úroveň v rámci troch šarží činidiel **cobas®** BKV s použitím štyroch prístrojov a dvoch operátorov počas 12 dní. S každou vzorkou sa vykonala celá procedúra testu **cobas®** BKV na plne automatizovaných systémoch **cobas®** 6800/8800 System. Tu uvedená presnosť preto predstavuje všetky aspekty testovacieho postupu. Výsledky uvádza Tabuľka 15.

Test **cobas®** BKV preukázal vysokú presnosť pre tri šarže činidiel analyzovaných v rámci rozsahu koncentrácie 9,83E+01 IU/ml až 9,83E+05 IU/ml.

Tabuľka 15 Presnosť testu **cobas®** BKV v rámci laboratória*

Menovitá koncentrácia [IU/ml]	Pridelená koncentrácia [IU/ml]	EDTA plazma			
		Šarža 1	Šarža 2	Šarža 3	Všetky šarže
		SD	SD	SD	Spoločná SD
1,00E+06	9,83E+05	0,02	0,02	0,04	0,03
1,00E+05	9,83E+04	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+04	9,83E+03	0,04	0,05	0,03	0,04
6,00E+03	5,90E+03	0,03	0,05	0,03	0,04
1,00E+02	9,83E+01	0,09	0,11	0,11	0,11

* Titrčné údaje sa považujú za logaritmicke normálne rozdelené a sú analyzované následne po $\log_{10}$ transformácii. Stĺpce so štandardnými odchýlkami (SD) predstavujú celkový logaritmicke transformovaný titer pre každú z troch šarží činidiel.

Overenie podtypu

Účinnosť testu **cobas®** BKV na BKV podtypy I (s podskupinami Ia a Ic), II, III a IV bola hodnotená nasledovne:

- Overením detekčného limitu
- Overením lineárneho rozsahu

Overenie detekčného limitu podtypov I (s podskupinami Ia a Ic), II, III a IV

BKV DNA pre päť rozličných podtypov/podskupín (Ia, Ic, II, III a IV) bol zriedený do troch rozličných úrovní koncentrácie v BKV-negatívnej EDTA plazme. Určovanie miery úspešnosti bolo vykonané na 63 replikátoch pre každú úroveň. Testovanie bolo vykonané s tromi šaržami činidiel **cobas®** BKV, viacnásobnými cyklami, počas viacerých dní, viacerými operátormi a prístrojmi. Tieto výsledky dokazujú, že test **cobas®** BKV zistil BKV DNA u piatich rozličných podtypov/podskupín pri koncentrácii 21,5 IU/ml pri miere úspešnosti $\geq 95\%$.

Overenie lineárneho rozsahu podtypov I (s podskupinami Ia a Ic), II, III a IV

Série riedení použité pri overení štúdie linearít podtypu/podskupiny testu **cobas®** BKV pozostávali z ôsmich členov skupiny pokrývajúcich lineárne rozpätie analýzy. Testovanie bolo vykonané s tromi šaržami činidla **cobas®** BKV, 12 replikátov na úroveň sa testovalo v EDTA plazme.

Lineárny rozsah testu **cobas®** BKV sa overil pre všetkých päť podtypov/podskupín (Ia, Ic, II, III a IV).

Špecifickosť

Špecifickosť testu **cobas®** BKV sa určila analýzou BKV-negatívnych vzoriek EDTA plazmy od jednotlivých darcov. 104 individuálnych vzoriek EDTA plazmy sa testovalo s tromi šaržami činidiel **cobas®** BKV. Všetky vzorky boli negatívne na BKV DNA. V analýze testu bola špecifickosť testu **cobas®** BKV 100 % (nižší jednostranný 95-percentný interval spoľahlivosti: 97,16 %).

Analytická špecifickosť

Analytická špecifickosť testu **cobas®** BKV sa hodnotila testovaním skupiny mikroorganizmov pri koncentrácii 1,00E+06 jednotiek/ml (CFU/ml, bunky/ml, CCU/ml, IFU/ml) pre baktérie a kvasinky a od 1,00E+05 jednotiek/ml a 1,00E+06 jednotiek/ml (kópie/ml, TCID₅₀/ml, IU/ml, bunky/ml) pre vírusy. Mikroorganizmy sa zriedili do BKV DNA negatívnej ľudskej EDTA plazmy, ako aj do ľudskej EDTA plazmy obsahujúcej (100 IU/ml) BKV DNA. Tieto špecifické analyzované organizmy uvádza Tabuľka 16. Každá vzorka sa testovala v troch replikátoch. Žiadny z iných patogénov než BKV pri testovaných koncentráciách nerušil výkonnosť testu. Negatívne výsledky sa získali s testom **cobas®** BKV pre všetky vzorky mikroorganizmov bez cieľa BKV a pozitívne výsledky sa získali pre všetky vzorky mikroorganizmov s cieľom BKV. Okrem toho priemerný log₁₀ titer každej z pozitívnych vzoriek BKV obsahujúcich potenciálne krížovo reagujúce organizmy spadal do rozsahu ±0,5 log₁₀ priemerného log₁₀ titra príslušnej pozitívnej injekčne aplikovanej kontroly.

Tabuľka 16 Mikroorganizmy testované pre krížovú reaktivitu

Vírus	Baktérie	Kvasinky
Adenovírus typ 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Cytomegalovírus	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Vírus Epstein-Barrovej	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Vírus hepatitídy B	<i>Clostridium perfringens</i>	
Vírus hepatitídy C	<i>Enterococcus faecalis</i>	
Vírus Herpes simplex typu 1	<i>Escherichia coli</i>	
Vírus Herpes simplex typu 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Ľudský herpesvírus typu 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Ľudský herpesvírus typu 7	<i>Mycobacterium avium</i>	
Ľudský herpesvírus typu 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Ľudský papillomavírus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
JC Vírus	<i>Salmonella enterica</i>	
Parvovírus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Opičí vírus 40		
Vírus Varicella-zoster		

Interferujúce látky

Vysoká hladina triglyceridov (33 g/l), konjugovaného bilirubínu (0,2 g/l), nekonjugovaného bilirubínu (0,2 g/l), bielkovín (60 g/l), hemoglobínu (2 g/l) a ľudskej DNA (2 mg/l) vo vzorkách sa testovali v prítomnosti (100 IU/ml) a neprítomnosti BKV DNA. Testované endogénne interferencie sa ukázali ako nerušivé voči efektívnosti testu **cobas®** BKV.

Navyše, zložky liekov, ktoré uvádza Tabuľka 17, sa testovali trikrát C_{max} na prítomnosť a neprítomnosť BKV DNA.

Všetky potenciálne rušivé látky sa ukázali ako nerušivé voči účinnosti analýzy. Negatívne výsledky sa získali s testom **cobas®** BKV pre všetky vzorky bez cieľa BKV a pozitívne výsledky sa získali pre všetky vzorky s cieľom BKV. Okrem toho priemerný $\log_{10}$ titer každej z pozitívnych vzoriek BKV obsahujúcich potenciálne rušivé látky spadol do rozsahu $\pm 0,5 \log_{10}$ priemerného $\log_{10}$ titra príslušnej pozitívnej injekčne aplikovanej kontroly.

Tabuľka 17 Zložky liekov testované na rušivosť voči kvantifikácii BKV DNA testom **cobas®** BKV

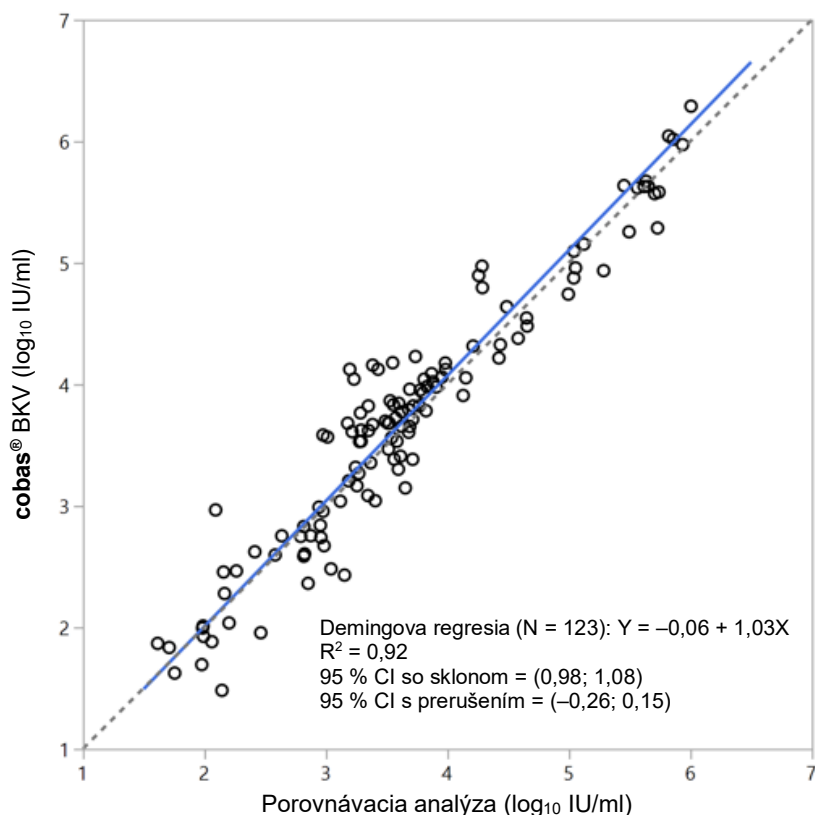
Trieda lieku	Generický názov lieku	
Antimikrobiálny	Cefotetan	Sulfametoxazol
	Klavulanát draselný	Tikarcilín dvojsodný
	Fluconazole	Trimetoprim
	Piperacillin	Vancomycin
	Tazobactam sodný	Mikafungín
Liečivá na liečbu herpesvírusov	Ganciklovir	Cidofovir
	Valganciklovir	Foscarnet
	Acyklovir	Letermovír
Imunosupresívum	Azatioprín	Prednizón
	Cyklosporín	Sirolimus
	Everolimus	Tacrolimus
	Mykofenolát mofetilu	Kyselina mykofenolová

Korelácia metódy

Účinnosť testu **cobas®** BKV sa hodnotila voči porovnávacej analýze testovaním vzoriek EDTA plazmy od BKV infikovaných pacientov. Vzorky EDTA plazmy v rámci kvantifikačného rozsahu oboch analýz sa analyzovali ako jednotlivé replikáty. Bola vykonaná Demingova regresná analýza.

Výsledky Demingovej regresie uvádza Obr. 5.

Obr. 5 Regresná analýza testu **cobas®** BKV verzus porovnávacia analýza



Zlyhanie celého systému

Stupeň zlyhania celého systému pre test **cobas®** BKV sa určil testovaním 100 opakovaní EDTA plazmy zameraným na BKV pozitívnu klinickú vzorku. Tieto vzorky sa testovali pri koncentrácii $3 \times \text{LoD}$.

Výsledky tejto štúdie určili, že všetky replikáty boli platné a pozitívne pre cieľ BKV, dôsledkom čoho bol stupeň zlyhania celého systému 0 % (vrchný jednostranný 95 % interval spoľahlivosti 2,95 %).

Krížová kontaminácia

Stupeň krížovej kontaminácie pre test **cobas®** BKV sa určil testovaním 240 replikátov BKV-negatívnej matice vzoriek a 225 replikátov s vysokou titráciou BKV DNA vo vzorke pri približne $2,00\text{E}+07$ IU/ml. Celkovo sa uskutočnilo 5 analýz s pozitívnymi a negatívnymi vzorkami pri šachovnicovej konfigurácii.

Všetkých 240 replikátov negatívnej vzorky bolo negatívnych, takže pomer krížovej kontaminácie bol 0 % (vrchný jednostranný 95 % interval spoľahlivosti 1,24 %).

Kľúčové ukazovatele účinnosti pre typ vzorky s močom

Detekčný limit (LoD), medzinárodný štandard WHO

Detekčný limit testu **cobas®** BKV pre medzinárodný štandard WHO bol určený analýzou sériových riedení 1. medzinárodného štandardu WHO BKV získaného z NIBSC (NIBSC 14/212) v BKV negatívnych vzorkách moču stabilizovaného v médiu **cobas®** PCR Media. Skupina šiestich úrovní koncentrácie plus slepá sa testovali na troch šaržach činidiel **cobas®** BKV, viacnásobnými cyklami, počas viacerých dní, rôznymi operátormi a na viacerých prístrojoch.

Výsledky pre vzorky moču stabilizovaného v médiu **cobas®** PCR Media uvádza Tabuľka 18 až Tabuľka 20. Štúdia ukazuje, že pri najmenej citlivej šarži je koncentrácia, pre ktorú PROBIT predpokladá 95-percentnú mieru úspešnosti, 12,2 IU/ml s 95-percentným rozsahom spoľahlivosti od 9,2 do 18,3 IU/ml v čistom moči. Najnižšia koncentrácia s mierou úspešnosti $\geq 95\%$ je 10,0 IU/ml v čistom moči.

Tabuľka 18 Detekčný limit v moči, šarža 1

Vstupná titrácia koncentrácie* (BKV DNA IU/ml)	Počet platných replikátov	Počet pozitívnych	Pomerná úspešnosť v %
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
Det. limit podľa PROBIT pri 95 % pomernej úspešnosti	12,2 IU/ml Interval spoľahlivosti 95 %: 9,2 – 18,3 IU/ml		

* Testované vzorky moču stabilizovaného v médiu **cobas®** PCR Media. Vstupná titrácia koncentrácie použitá na výpočet na základe čistého moču.

Tabuľka 19 Detekčný limit v moči, šarža 2

Vstupná titrácia koncentrácie* (BKV DNA IU/ml)	Počet platných replikátov	Počet pozitívnych	Pomerná úspešnosť v %
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
Det. limit podľa PROBIT pri 95 % pomernej úspešnosti	11,9 IU/ml Interval spoľahlivosti 95 %: 9,2 – 17,3 IU/ml		

* Testované vzorky moču stabilizovaného v médiu **cobas®** PCR Media. Vstupná titrácia koncentrácie použitá na výpočet na základe čistého moču.

Tabuľka 20 Detekčný limit v moči, šarža 3

Vstupná titrácia koncentrácie* (BKV DNA IU/ml)	Počet platných replikátov	Počet pozitívnych	Pomerná úspešnosť v %
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
Det. limit podľa PROBIT pri 95 % pomerné úspešnosti	10,1 IU/ml Interval spoľahlivosti 95 %: 7,8 – 14,7 IU/ml		

* Testované vzorky moču stabilizovaného v médiu **cobas®** PCR Media. Vstupná titrácia koncentrácie použitá na výpočet na základe čistého moču.

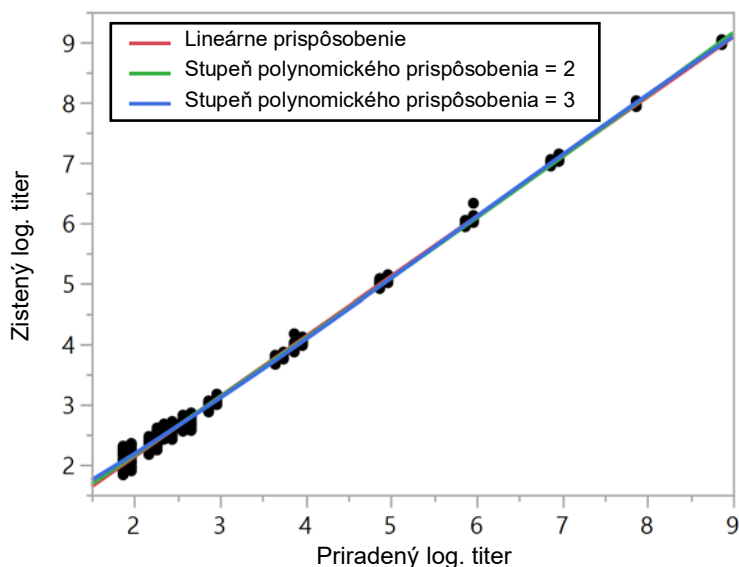
Lineárny rozsah

Linearita testu **cobas®** BKV bola hodnotená s použitím sérií riedení pozostávajúcich z 10 členov s použitím klinickej vzorky (BKV podskupiny lb) v rozsahu lineárneho rozpätia testu. Vysoký titer zásobnej lambda DNA sa použil na prípravu 12 členov panelu v rozsahu celého lineárneho rozpätia

Každého člena skupiny testovali v 36 replikátoch troma šaržami činidiel **cobas®** BKV a výsledky štúdie sú uvedené na Obr. 6.

Bolo preukázané, že test **cobas®** BKV je lineárny od $7,41\text{E}+01$ IU/ml do $7,41\text{E}+08$ IU/ml a vykazuje absolútnu odchýlku od vhodnejšej nelineárnej regresie menšiu alebo rovnajúcu sa $\pm 0,1 \log_{10}$ vo vzorkách moču stabilizovaného v médiu **cobas®** PCR Media (pozrite si Obr. 6). V lineárnom rozsahu je presnosť testu v rozmedzí $\pm 0,2 \log_{10}$.

Obr. 6 Určenie lineárneho rozsahu v moči



Presnosť – v laboratóriu

Presnosť testu **cobas**® BKV bola určená analýzou sériových riedení s vysokou titráciou BKV DNA (podskupina Ib) v BKV-negatívnych vzorkách moču stabilizovaného v médiu **cobas**® PCR Media. Päť úrovní riedení sa testovalo v 72 replikátoch pre každú úroveň v rámci troch šarží činidiel **cobas**® BKV s použitím dvoch prístrojov a dvoch operátorov počas 12 dní. S každou vzorkou sa vykonala celá procedúra testu **cobas**® BKV na plne automatizovaných systémoch **cobas**® 6800/8800 System. Tu uvedená presnosť preto predstavuje všetky aspekty testovacieho postupu. Výsledky uvádza Tabuľka 21.

Test **cobas**® BKV preukázal vysokú presnosť pre tri šarže činidiel analyzovaných v rámci rozsahu koncentrácie 7,41E+02 IU/ml až 7,41E+05 IU/ml.

Tabuľka 21 Presnosť testu **cobas**® BKV v rámci laboratória*

Menovitá koncentrácia [IU/ml]	Pridelená koncentrácia [IU/ml]	Moč stabilizovaný v médiu cobas ® PCR Media			
		Šarža 1	Šarža 2	Šarža 3	Všetky šarže
		SD	SD	SD	Spoločná SD
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

* Titrčné údaje sa považujú za logaritmicke normálne rozdelené a sú analyzované následne po log₁₀ transformácii. Stĺpce so štandardnými odchýlkami (SD) predstavujú celkový logaritmicke transformovaný titer pre každú z troch šarží činidiel.

Overenie podtypu

Účinnosť testu **cobas**® BKV na BKV podtypy I (s podskupinami Ia a Ic), II, III a IV bola hodnotená nasledovne:

- Overením detekčného limitu
- Overením lineárneho rozsahu

Overenie detekčného limitu podtypov I (s podskupinami Ia a Ic), II, III a IV

BKV DNA pre päť rozličných podtypov/podskupín (Ia, Ic, II, III a IV) bol zriedený do troch rozličných úrovní koncentrácie v BKV-negatívnych vzorkách moču stabilizovaného v médiu **cobas**® PCR Media. Určovanie miery úspešnosti bolo vykonané na 63 replikátoch pre každú úroveň. Testovanie bolo vykonané s tromi šaržami činidiel **cobas**® BKV, viacnásobnými cyklami, počas viacerých dní, viacerými operátormi a prístrojmi. Tieto výsledky dokazujú, že test **cobas**® BKV zistil BKV DNA u piatich rozličných podtypov/podskupín pri koncentrácii 12,2 IU/ml pri miere úspešnosti ≥ 95 %.

Overenie lineárneho rozsahu podtypov I (s podskupinami Ia a Ic), II, III a IV

Série riedení použité pri overení štúdie linearity podtypu/podskupiny testu **cobas**® BKV pozostávali z ôsmich členov skupiny pokrývajúcich lineárne rozpätie analýzy. Testovanie bolo vykonané s tromi šaržami činidla **cobas**® BKV, testovalo sa 12 replikátov na každú úroveň v moči stabilizovanom v médiu **cobas**® PCR Media.

Lineárny rozsah testu **cobas**® BKV sa overil pre všetkých päť podtypov/podskupín (Ia, Ic, II, III a IV).

Špecifickosť

Špecifickosť testu **cobas®** BKV sa určila analýzou BKV-negatívnych vzoriek moču stabilizovaného v médiu **cobas®** PCR Media od jednotlivých darcov. Sto individuálnych vzoriek moču sa testovalo s tromi šaržami činidiel **cobas®** BKV. Všetky vzorky boli negatívne na BKV DNA. V analýze testu bola špecifickosť testu **cobas®** BKV 100 % (nižší jednostranný 95-percentný interval spoľahlivosti: 97,05 %).

Analytická špecifickosť

Analytická špecifickosť testu **cobas®** BKV sa hodnotila testovaním skupiny mikroorganizmov pri koncentrácii 1,00E+06 jednotiek/ml až 2,00E+06 jednotiek/ml (CFU/ml, bunky/ml, CCU/ml, IFU/ml) pre baktérie a kvasinky a pri 1,00E+05 jednotiek/ml (kópie/ml, TCID₅₀/ml, IU/ml, bunky/ml) pre vírusy. Mikroorganizmy sa zriedili do BKV DNA negatívneho moču ako aj moču obsahujúceho (600 IU/ml) BKV DNA. Tieto špecifické analyzované organizmy uvádza Tabuľka 22. Každá vzorka sa testovala v troch replikátoch. Žiadny z iných patogénov než BKV pri testovaných koncentráciách nerušil výkonnosť testu. Negatívne výsledky sa získali s testom **cobas®** BKV pre všetky vzorky mikroorganizmov bez cieľa BKV a pozitívne výsledky sa získali pre všetky vzorky mikroorganizmov s cieľom BKV. Okrem toho priemerný log₁₀ titer každej z pozitívnych vzoriek BKV obsahujúcich potenciálne krížovo reagujúce organizmy spadal do rozsahu $\pm 0,5$ log₁₀ priemerného log₁₀ titra príslušnej pozitívnej injekčne aplikovanej kontroly.

Tabuľka 22 Mikroorganizmy testované pre krížovú reaktivitu

Vírusy	Baktérie	Kvasinky
<i>Vírus herpes simplex 2</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Ludský papillomavírus 16</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Candida glabrata</i>
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida tropicalis</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>	

Interferujúce látky

Zvýšené hladiny albumínu (0,5 % obj. hm.), konjugovaného bilirubínu (1 % obj. hm.), glukózy (1 % obj. hm.), mononukleárných buniek periférnej krvi (1,00E+06 buniek/ml), hlienu (1 hlienový výter na 4,3 ml vzorky), kyslé pH (pH 4), zásadité pH (pH 9), sperma (1 výter ponorený do spermy na 4,3 ml vzorky), sodík (300 mEq/l) a celá krv (10 % v/v) vo vzorkách boli testované na prítomnosť (600 IU/ml) a neprítomnosť BKV DNA. Testované endogénne interferencie sa ukázali ako nerušivé voči efektívnosti testu **cobas®** BKV.

Zložky liekov, ktoré uvádza Tabuľka 23, boli okrem toho testované na prítomnosť a neprítomnosť BKV DNA.

Všetky potenciálne rušivé látky s výnimkou mastencového prášku sa ukázali ako látky, ktoré účinnosť testu nenarúšajú. Mastencový prášok pri $\leq 0,05$ % nepreukázal žiadne rušenie testu pri teste **cobas®** BKV. Negatívne výsledky sa získali s testom **cobas®** BKV pre všetky vzorky bez cieľa BKV a pozitívne výsledky sa získali pre všetky vzorky s cieľom BKV. Okrem toho priemerný $\log_{10}$ titer každej z pozitívnych vzoriek BKV obsahujúcich potenciálne rušivé látky spadol do rozsahu $\pm 0,5 \log_{10}$ priemerného $\log_{10}$ titra príslušnej pozitívnej injekčne aplikovanej kontroly.

Tabuľka 23 Zložky liekov testované na rušivosť voči kvantifikácii BKV DNA testom **cobas®** BKV

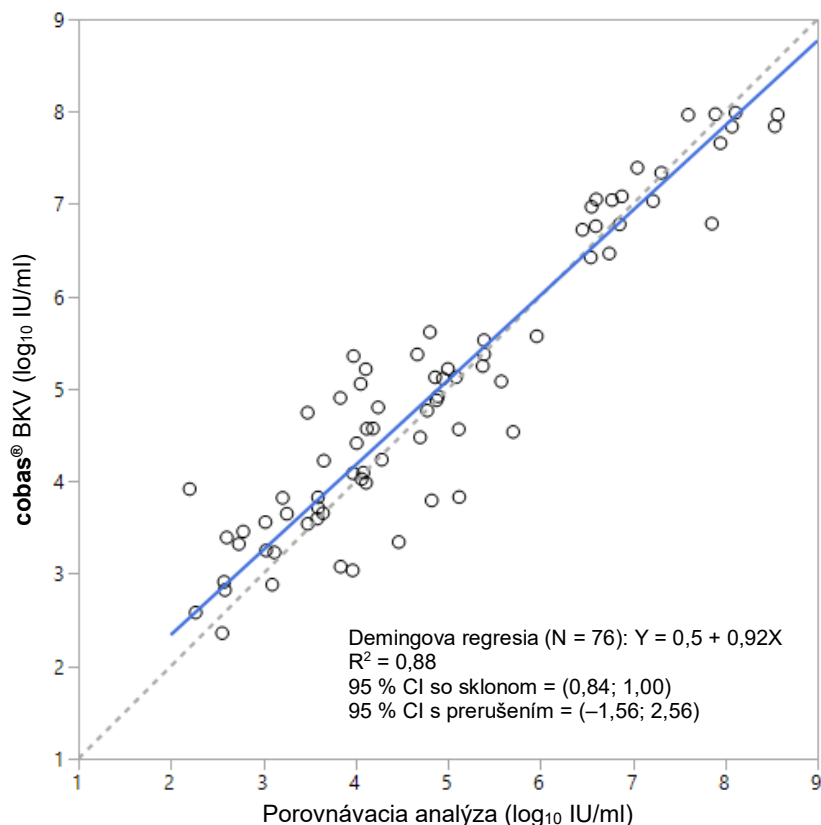
Trieda lieku	Aktívna látka	Koncentrácia	Generický názov lieku
Antimikrobiálny	Clotrimazole	100 µg/ml	Gyne-Lotrimin 7
	Metronidazole	701 µmol/l	Arilin rapid Vaginálne čapíky Vagi Metro Cream Nidazea Gel
Estrogénový steroidný hormón	Estradiol	4,41 nmol/l	Estrace
Analgetiká	Phenazopyridine Hydrochloride	200 µg/ml	Azo Standard
	Acetaminofen	1 324 µmol/l	Acetaminofen
Lubrikant	Propylénglykol	1 000 µg/ml	K-Y UltraGel
Nesteroidný protizápalový liek	Kyselina acetylsalicylová	3,62 mmol/l	Kyselina acetylsalicylová
	Naproxen	2 170 µmol/l	Naproxen
	Ibuprofen	2 425 µmol/L	Ibuprofen
Netýka sa	Mastenec	0,05 % (w/v)	Mastencový prášok

Korelácia metódy

Účinnosť testu **cobas®** BKV sa hodnotila voči porovnávacej analýze testovaním vzoriek moču od BKV infikovaných pacientov. Vzorky moču v rámci kvantifikačného rozsahu oboch analýz sa analyzovali ako jednotlivé replikáty. Bola vykonaná Demingova regresná analýza.

Výsledky Demingovej regresie uvádza Obr. 7.

Obr. 7 Regresná analýza testu **cobas®** BKV verzus porovnávacia analýza



Krížová kontaminácia

Stupeň krížovej kontaminácie pre test **cobas®** BKV sa určil testovaním 240 replikátov BKV-negatívnej matice vzoriek a 225 replikátov s vysokou titráciou BKV DNA vo vzorke pri približne $1,00E+09$ IU/ml. Celkovo sa uskutočnilo 5 analýz s pozitívnymi a negatívnymi vzorkami pri šachovnicovej konfigurácii.

Všetkých 240 replikátov negatívnej vzorky bolo negatívnych, takže pomer krížovej kontaminácie bol 0,0 % (vrchný jednostranný 95 % interval spoľahlivosti 1,24 %).

Ďalšie informácie

Kľúčové funkcie testu

Typ vzorky	EDTA plazma	Moč stabilizovaný v médiu cobas® PCR Media
Minimálne požadované množstvo vzorky	350 µl*	550 µl*
Vstupný objem vzorky	200 µl	400 µl
Analytická citlivosť	21,5 IU/ml (obojsmerný interval spoľahlivosti 95 %: 16,3 – 32,4 IU/ml)	12,2 IU/ml (obojsmerný interval spoľahlivosti 95 %: 9,2 – 18,3 IU/ml)
Lineárny rozsah	21,5 IU/ml až 1E+08 IU/ml	200 IU/ml až 1E+08 IU/ml
Špecifickosť	100 %	100 %
Zistené subtypy	BKV subtypy I (s podskupinami Ia, Ib a Ic), II, III, IV	

* Mŕtvy objem 150 µl identifikovaný pre sekundárne skúmavky **cobas omni**. Iné skúmavky použité pre testovanie môžu mať odlišný mŕtvy objem a môžu vyžadovať väčší či menší minimálny objem.

Symbols

Na označenie diagnostických produktov Roche PCR sa používajú nasledujúce symboly.

Tabuľka 24 Symboly používané na označenie diagnostických produktov Roche PCR

	Prídavný softvér		Spodný limit stanoveného rozsahu		Negatívna kontrola
	Autorizované zastúpenie v Európskom spoločenstve		Horný limit stanoveného rozsahu		Pozitívna kontrola
	Dátový list s čiarovým kódom		Skladovať v tmavom prostredí		Kontrola
	Číslo šarže		Obsah postačuje na <n> testov		Priradený rozsah (kópie/ml)
	Biologické riziká		Teplotné rozmedzie od do		Priradený rozsah (IU/ml)
	Katalógové číslo		Testovací definičný súbor		Štandardná procedúra
	Vid' návod na použitie		Výrobca		Ultracitlivá procedúra
	Obsah súpravy		Dátum spotreby		Počet QS kópií na PCR reakciu, použite počet QS kópií na PCR reakciu na výpočet výsledkov.
	Distribútor		Globálne číslo obchodnej jednotky		Počet medzinárodných jednotiek QS na PCR; na výpočet výsledkov použite počet medzinárodných jednotiek QS na PCR.
	Určené len na hodnotenie výkonnosti IVD		Sériové číslo	Tento produkt spĺňa požiadavky Európskej smernice 98/79/ES pre diagnostickú zdravotnícku pomôcku <i>in vitro</i> .	
Rx Only	Len pre USA: Federálny zákon obmedzuje predaj tejto pomôcky lekárom alebo na základe jeho predpisu.		Dátum výroby		
	Diagnostické zdravotnícke zariadenie <i>in vitro</i>		Opakovane nepoužívať		

Technická podpora pre zákazníkov z USA 1-800-526-1247

Výrobca a distribútori

Tabuľka 25 Výrobca a distribútori



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



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Ochranné známky a patenty

Navštívte stránku <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Autorské práva

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Referenčné materiály

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. Nicleleit 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 Preventions, 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.

Revízia dokumentu

Informácie o revízii dokumentu	
Doc Rev. 1.0 07/2019	Prvé vydanie.
Doc Rev. 2.0 04/2020	Aktualizácie s cieľom zahrnúť informácie získané o moči. Aktualizované alebo pridané časti s cieľom podporiť obsah týkajúci sa moču. Skladovanie sekundárnych skúmaviek ($\leq -20\text{ °C}$) sa predĺžilo na 6 mesiacov. V prípade akýchkoľvek otázok sa obráťte na miestneho zástupcu spoločnosti Roche.