

cobas[®] EBV

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

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

cobas[®] EBV

P/N: 09040943190

Do użytku z systemem cobas[®] 5800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Do użytku z systemami cobas[®] 6800/8800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 08688214190 lub

P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 lub

P/N: 09051953190

Spis treści

Przeznaczenie.....	4
Podsumowanie oraz opis testu.....	4
Odczynniki i materiały.....	7
Odczynniki i kontrole do testu cobas® EBV	7
Odczynniki cobas omni do przygotowywania próbek.....	10
Wymagania dotyczące przechowywania odczynników.....	11
Wymagania dotyczące użytkowania systemu cobas® 5800	11
Wymagania dotyczące użytkowania systemów cobas® 6800/8800	12
Materiały dodatkowe wymagane dla systemu cobas® 5800	13
Materiały dodatkowe wymagane dla systemów cobas® 6800/8800	13
Wymagane urządzenia i oprogramowanie.....	14
Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania	15
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	15
Użytkowanie odczynników.....	15
Dobra praktyka laboratoryjna.....	16
Pobieranie, transport i przechowywanie próbek	17
Próbki	17
Instrukcja użytkowania	18
Uwagi proceduralne	18
Wykonanie testu cobas® EBV w systemie cobas® 5800	19
Wykonanie testu cobas® EBV w systemach cobas® 6800/8800	20
Wyniki.....	21
Kontrola jakości i ważność wyników w systemie cobas® 5800	21
Wyniki kontroli w systemie cobas® 5800	21
Kontrola jakości i ważność wyników w systemach cobas® 6800/8800	21
Interpretacja wyników	22

Interpretacja wyników w systemie cobas® 5800	23
Interpretacja wyników w systemach cobas® 6800/8800	23
Ograniczenia metody.....	23
Niekliniczna ocena wiarygodności.....	24
Najważniejsze parametry działania wykonywanego w systemach cobas® 6800/8800	24
Granica wykrywalności (LoD)	24
Zakres liniowości	25
Precyzja wewnątrz laboratorium.....	26
Weryfikacja genotypu.....	27
Swoistość.....	27
Swoistość analityczna.....	28
Swoistość analityczna – substancje interferujące.....	28
Korelacja metody.....	29
Błąd całego systemu	30
Kontaminacja między próbkami.....	30
Ocena skuteczności w badaniach klinicznych przeprowadzona w systemach cobas® 6800/8800	30
Powtarzalność testu cobas® EBV	30
Wiarygodność testu cobas® EBV	31
Równoważność/porównanie systemu	34
Dodatkowe informacje	35
Najważniejsze cechy testu	35
Oznaczenia	36
Pomoc techniczna.....	37
Wytwórca i importer.....	37
Znaki towarowe i patenty.....	37
Prawo autorskie.....	37
Piśmiennictwo	38
Wersja dokumentu	39

Przeznaczenie

cobas® EBV to test do amplifikacji kwasu nukleinowego w warunkach *in vitro* do ilościowego oznaczania DNA wirusa Epsteina-Barra (EBV) w ludzkim osoczu krwi pobranej na EDTA w systemach **cobas® 5800/6800/8800**.

Test **cobas® EBV** jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w diagnostyce i leczeniu zakażeń EBV u pacjentów po przeszczepach. U pacjentów monitorowanych pod kątem EBV można użyć seryjnych pomiarów poziomu DNA do wskazania potrzeby potencjalnych zmian leczenia i do oceny odpowiedzi wirusa na leczenie.

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

Podsumowanie oraz opis testu

Informacje podstawowe

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

EBV należy do grupy wirusów opryszczki. Jest to wirus z dwuniciowego kwasu rybonukleinowego (DNA) o długości około 172 kb w otoczce. Na podstawie różnic w genie EBNA-2 zidentyfikowano dwa główne genotypy EBV, typ 1 i typ 2. Zakażenia EBV są dość powszechne u ludzi, zakażonych jest ponad 90% dorosłych, a uśpione zakażenie utrzymuje się przez cały czas życia. Wirus EBV wywołuje zakaźną mononukleozę u podgrupy nowo zakażonych nastolatków i dorosłych, wiąże się go też z kilkoma typami nowotworów, włącznie z rakiem nosogardła, chłoniakiem Burkitta i chłoniakiem Hodgkina. EBV może wywoływać zaburzenia limfoproliferacyjne u osób z wrodzonym lub nabytym upośledzeniem odporności, włącznie z pacjentami po przeszczepach oraz pacjentami z wirusem ludzkiego upośledzenia odporności/zespołem nabytego upośledzenia odporności (HIV/AIDS).³

U pacjentów po przeszczepach EBV może wywołać chorobę przez reaktywację utajonego wirusa z komórek pamięci B lub przez nową infekcję zasadniczą, zwłaszcza u ujemnych względem EBV biorców przeszczepów, którzy otrzymali przeszczep od dawców dodatnich względem EBV.³ W przypadku takich pacjentów najcięższą postacią choroby związanej z EBV jest poprzyszczepowa choroba limfoproliferacyjna (PTLD) prowadząca do niekontrolowanej proliferacji limfocytów, zwykle typu B.⁴ Ogólnie >70% przypadków PTLD u pacjentów po przeszczepach wiązanych jest z zakażeniem EBV. Najwyższe ryzyko wystąpienia PTLD zachodzi podczas pierwszego roku po przeszczepie i >90% przypadków PTLD, które występują w tym okresie wiąże się z EBV. Do 20% przypadków PTLD występujących w ciągu pierwszego roku po przeszczepie jest ujemnych względem EBV.^{4,5}

Czynniki ryzyka dla wczesnego PTLD obejmują ujemny względem EBV w chwili przeszczepu status serologiczny biorcy, młodszy wiek, ekspozycję na przeciwciała powodujące deplecję limfocytów oraz typ przeszczepianego narządu.^{5,6}

Wczesne rozpoznanie zasadniczych zakażeń EBV i monitorowanie poziomu DNA może wspierać szybką interwencję terapeutyczną zapobiegającą postępowi choroby związanej z EBV. Wytyczne zalecają regularne monitorowanie EBV z użyciem ilościowych testów kwasów nukleinowych (NAT), w szczególności u ujemnych pod względem EBV biorców od dawców wysokiego ryzyka.^{4,5} Choć dokładna wartość poziomu wirusów we krwi wciąż podlega dyskusjom ze względu na zmienność pomiędzy oznaczeniami, pojęcie krytycznej wartości progowej wydaje się być poprawne i było zgłaszane

w badaniach naukowych wykazujących, że wyższy poziom DNA EBV koreluje ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby EBV i PTLD.^{4,5,7} Do oznaczania poziomu EBV stosowano zarówno próbki osocza, jak i krwi pełnej, ale dowody sugerują, że osocze daje bardziej swoiste wyniki w zakresie wykrywania PTLD.^{4,5,7,8}

Powszechne interwencje terapeutyczne mające na celu zmniejszenie poziomu DNA EBV i zapobieganie wystąpienia PTLD obejmują zmniejszenie dawek leków immunosupresyjnych i leczenie przeciwciałami powodującymi deplecję limfocytów B.⁷ Leczenie zapobiegawcze mające na celu obniżenie poziomu DNA EBV jest skuteczne u większości pacjentów, choć u do 20% pacjentów może i tak rozwinąć się PTLD, zwłaszcza u pacjentów, u których upłynął ponad rok od przeszczepu.⁷

Większość testów laboratoryjnych do ilościowego oznaczania EBV nie została wystandaryzowana, co prowadzi do zmienności międzylaboratoryjnej oraz zmienności pomiędzy oznaczeniami w wynikach poziomu DNA i wyklucza porównanie poziomów DNA uzyskiwanych przez różne laboratoria i testy.⁷ W celu rozwiązania problemu WHO utworzyło międzynarodowy standard oznaczania ilościowego EBV, umożliwiając zgłaszanie ustandaryzowanym testom podawanie wyników w IU/ml.⁹ Formalna ocena powtarzalności i ważności poziomu DNA EBV jest kluczowa do zapewnienia spójnych wyników z różnych laboratoriów w celu poprawy opieki klinicznej pacjentom narażonym na podwyższone ryzyko chorób związanych z EBV oraz PTLD.

Uzasadnienie badań NAT

Przed przeszczepem określa się status serologiczny dawcy i biorcy względem EBV, aby ułatwić określenie ryzyka biorcy względem powikłań związanych z EBV, jednak status serologiczny nie jest dostatecznie czuły ani precyzyjny do monitorowania pacjentów po przeszczepie. Metody namnażania EBV są powolne i mają niską wartość predykcyjną w tych warunkach. Bezpośrednia detekcja DNA wirusa EBV za pomocą PCR w czasie rzeczywistym potencjalnie oferuje szeroki zakres dynamiczny, precyzję, wysoką czułość i swoistość.

Objaśnienie testu

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

Zasady procedury

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

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

Wybiórczą amplifikację docelowego kwasu nukleinowego z próbki osiąga się przez zastosowanie dwóch starterów, dla których obszarami docelowymi są swoiste dla wirusa docelowego, wysoce konserwatywne rejony EBV znajdujące się w genie EBV EBNA-1 oraz w genie EBV BMRF. Selektywna amplifikacja DNA-QS uzyskiwana jest przy użyciu starterów wiodącego i odwrotnego o swoistej sekwencji, które wybierane są tak, aby nie były homologiczne z genomem EBV. Do amplifikacji wykorzystywana jest termostabilna polimeraza DNA. Sekwencje docelowa oraz DNA-QS są amplifikowane jednocześnie przy użyciu uniwersalnego profilu amplifikacji PCR ze wstępnie zdefiniowanymi etapami temperatury i liczby cykli. Odczynnik Master Mix zamiast trifosforanu deoksytymidyny (dTTP) zawiera trifosforan deoksyurydyny (dUTP), który wbudowywany jest do nowo syntetyzowanego DNA (amplikonu).¹⁰⁻¹² Jakiegokolwiek zanieczyszczające amplikony z poprzednich reakcji PCR ulegają eliminacji podczas podgrzewania w pierwszym etapie cyklu termicznego dzięki aktywności enzymu AmpErase, który znajduje się w mieszaninie do reakcji PCR. Jednak nowo powstały amplikon nie jest eliminowany, gdyż enzym AmpErase w temperaturze przekraczającej 55°C ulega inaktywacji.

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

Odczynniki i materiały

Odczynniki i kontrole do testu cobas® EBV

Materiały dostarczone dla testu cobas® EBV zawiera Tabela 1. Materiały wymagane, ale niedostarczone: patrz Tabela 2 do Tabela 4 oraz Tabela 8 do Tabela 9.

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

Tabela 1 cobas® EBV

cobas® EBV

Przechowywać w temperaturze 2–8°C

Kaseta na 192 testów (P/N 09040943190)

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

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

Przechowywać w 2–8°C

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

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

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

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

** Substancja niebezpieczna.

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

Przechowywać w temperaturze 2–8°C

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

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

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

Odczynniki cobas omni do przygotowywania próbek

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

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

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

** Substancja lub mieszanina niebezpieczna.

Wymagania dotyczące przechowywania odczynników

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

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

Tabela 5 Przechowywanie odczynników (umieszczonych poza systemem)

Odczynnik	Temperatura przechowywania
cobas® 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

Wymagania dotyczące użytkowania systemu cobas® 5800

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

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

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

* Odczynniki do jednorazowego użycia.

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

Wymagania dotyczące użytkowania systemów cobas® 6800/8800

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

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

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

* Odczynniki do jednorazowego użycia.

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

Materiały dodatkowe wymagane dla systemu cobas® 5800

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

Materiał	P/N
cobas omni Processing Plate 24	08413975001
cobas omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Końcówki CORE TIPS z filtrem, 1 ml	04639642001
Końcówki CORE TIPS z filtrem, 300 µl	07345607001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Worek na odpady stałe lub Worek na odpady stałe z wkładką	07435967001 lub 08030073001
Probówki wtórne cobas omni 13×75 (opcjonalnie)	06438776001

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

Materiały dodatkowe wymagane dla systemów cobas® 6800/8800

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

Materiał	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Worek na odpady stałe i pojemnik na odpady stałe lub Worek na odpady stałe z wkładką i szuflada na zestawy	07435967001 i 07094361001 lub 08030073001 i 08387281001

Wymagane urządzenia i oprogramowanie

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

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

Tabela 10 Urządzenia

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

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

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

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności

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

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Test **cobas® EBV** nie został zaprojektowany jako badanie przesiewowe na obecność wirusa EBV we krwi lub produktach krwiopochodnych.
- Ze wszystkimi próbkami należy obchodzić się tak jak z materiałem zakaźnym, stosując procedury dobrej praktyki laboratoryjnej, takie jak określone w dokumentach Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories oraz CLSI Document M29-A4.^{15, 16} Procedurę tę powinien wykonywać wyłącznie personel przeszkolony w pracy z materiałami zakaźnymi oraz w stosowaniu testu **cobas® EBV** i systemu **cobas® 5800/6800/8800**.
- Wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy uważać za potencjalnie zakaźne i postępować z nimi z zastosowaniem ogólnych środków ostrożności. W przypadku rozlania materiału należy natychmiast odkazić świeżo przygotowanym 0,6% roztworem podchlorynu sodu lub potasu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej (wybielacz rozcieńczony w stosunku 1:10) lub postępować zgodnie z procedurami przyjętymi w danym ośrodku.
- Zestaw **cobas® EBV/BKV Control Kit** zawiera osocze pochodzące z krwi ludzkiej. Materiał źródłowy przetestowano metodami PCR i wykazano w nim akceptowalne ślady niskiego poziomu DNA EBV. Żadna ze znanych metod badania nie może zaoferować całkowitej pewności, że produkty otrzymane z ludzkiej krwi nie będą przenosić czynników zakaźnych.
- **Nie zamrażać pełnej krwi ani innych próbek przechowywanych w probówkach pierwotnych.**
- W celu zagwarantowania optymalnego działania testu należy stosować wyłącznie dostarczone lub wymienione potrzebne materiały zużywalne.
- Karty charakterystyki są dostępne na żądanie w lokalnym przedstawicielstwie firmy Roche.
- Ściśle przestrzegać podanych procedur i wytycznych w celu zapewnienia prawidłowego wykonania testu. Wszelkie odchylenia od procedur i wytycznych mogą mieć wpływ na optymalną skuteczność testu.
- Jeżeli w trakcie pracy z próbkami i ich przygotowywania nie stosuje się odpowiedniej kontroli kontaminacji pomiędzy próbkami, może dojść do uzyskania fałszywie dodatnich wyników.
- Ponieważ > 90% dorosłych jest przewlekłymi nosicielami wirusa Epsteina-Barr, którzy mogą wydzielać do 10⁸ kopii/ml do śliny oraz ze względu na wysoką czułość testu, należy wdrożyć odpowiednie środki kontroli zanieczyszczeń w laboratoriach.¹⁷
- Należy poinformować lokalny właściwy organ o wszelkich poważnych zdarzeniach, które mogą wystąpić podczas stosowania tego testu.

Użytkowanie odczynników

- Aby uniknąć zanieczyszczenia pomiędzy próbkami lub kontrolami, ze wszystkimi odczynnikami, kontrolami i próbkami należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Przed użyciem należy ocenić wzrokowo każdą kasetę odczynnikową, rozcieńczalnik, odczynnik do lizy i odczynnik płuczający, aby upewnić się, że nie ma jakiegokolwiek wycieku. W razie wystąpienia wycieku nie wolno używać tego materiału do badania.

- **cobas omni** Lysis Reagent zawiera izotiocyanian guanidyny, potencjalnie niebezpieczną substancję chemiczną. Nie dopuszczać do kontaktu odczynników ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody; w przeciwnym razie mogą powstać oparzenia.
- Zestawy testu **cobas® EBV**, **cobas omni** MGP Reagent oraz **cobas omni** Specimen Diluent zawierają azydek sodu jako substancję konserwującą. Nie dopuszczać do kontaktu odczynników ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody; w przeciwnym razie mogą powstać oparzenia. Jeżeli dojdzie do rozlania wymienionych odczynników, przed wytarciem należy rozcieńczyć je wodą.
- Nie wolno dopuszczać do kontaktu **cobas omni** Lysis Reagent, zawierającego tiocyanian guanidyny, z roztworem podchlorynu sodu (wybielaczem). Połączenie to może skutkować wytworzeniem silnie trującego gazu.
- Wszystkie materiały, które przypadkowo weszły w kontakt z próbkami i odczynnikami, należy utylizować zgodnie z przepisami krajowymi i lokalnymi.

Dobra praktyka laboratoryjna

- Nie należy pipetować za pomocą ust.
- Nie jeść, nie pić ani nie palić tytoniu w obszarach roboczych.
- Podczas pracy z próbkami i odczynnikami należy nosić rękawiczki laboratoryjne, fartuch oraz osłonę oczu. W celu uniknięcia zanieczyszczenia należy zmieniać rękawiczki pomiędzy czynnościami związanymi z pracą z próbkami i użytkowaniem zestawów **cobas® EBV**, kontroli nisko dodatniej EBV/BKV (EBV/BKV L(+)C), kontroli wysoko dodatniej EBV/BKV (EBV/BKV H(+)C), zestawów buforu z kontrolą ujemną **cobas® Buffer Negative Control Kit** (BUF (-) C) i odczynników **cobas omni**. Podczas pracy z próbkami i kontrolami należy unikać zanieczyszczenia rękawiczek.
- Po zakończeniu pracy z próbkami i zestawami odczynnikowymi oraz po zdjęciu rękawiczek należy dokładnie umyć ręce.
- Dokładnie oczyścić i odkażić wszystkie laboratoryjne powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,6% podchlorynu sodu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej (rozcieńczyć domowy wybielacz w stosunku 1:10). Następnie przetrzeć powierzchnię 70% etanolem.
- Jeśli na powierzchni aparatów **cobas® 5800** lub **cobas® 6800/8800** dojdzie do rozlania płynu, należy postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w Asystencie użytkownika lub podręczniku użytkownika do systemów **cobas® 5800** lub **cobas® 6800/8800** w celu prawidłowego wyczyszczenia i odkażenia powierzchni urządzenia.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

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

Wszystkie próbki należy przechowywać w określonych temperaturach.

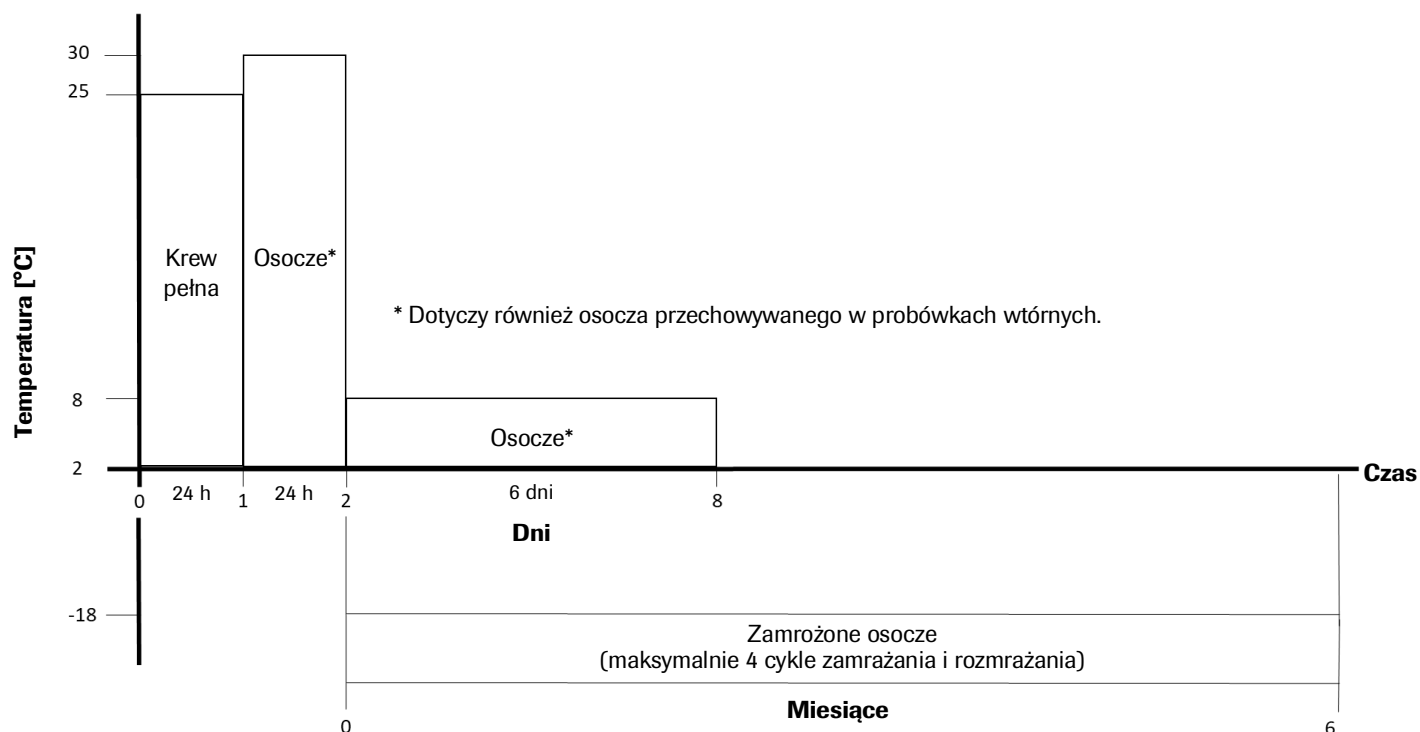
Podwyższona temperatura wpływa na stabilność próbek.

W przypadku używania próbek zamrożonych w probówkach wtórnych, należy umieścić próbki w temperaturze pokojowej (15–30°C) aż do całkowitego ich rozmrożenia, a następnie krótko wymieszać (np. na mieszadło wibracyjnym przez 3–5 sekund) i odwirować w celu zebrania się całej objętości próbki na dnie probówki.

Jeżeli po odwirowaniu istnieje możliwość, że komórki uległy ponownemu zawieszeniu w osoczu, należy rozważyć ponowne odwirowanie przed przystąpieniem do przetwarzania przy użyciu aparatu.

Próbki

- Krew pełną należy pobierać do probówek do otrzymywania nierozcieńczonego osocza BD Vacutainer® PPT™, przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant. Należy przestrzegać instrukcji producenta probówek do pobierania próbek. Należy zapoznać się z Ryc. 1.
- Krew pełna pobrana do probówek przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej BD Vacutainer® PPT™ lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant może być przechowywana i/lub transportowana do 24 godzin w temperaturze od 2°C do 25°C przed przygotowaniem osocza. Wirowanie powinno być przeprowadzane zgodnie z instrukcjami producenta.
- Po rozdzieleniu próbki, osocza można przechowywać przez 24 godziny w temperaturze 2–30°C w probówkach podstawowych lub wtórnych, a następnie:
 - Przechowywać w probówkach podstawowych lub wtórnych do 6 dni w temperaturze 2–8°C.
 - Przechowywać w probówkach wtórnych do 6 miesięcy w temperaturze ≤ –18°C.
- Próbki osocza zachowują stabilność przez maksymalnie cztery cykle zamrażania/rozmarzania w przypadku zamrożenia w temperaturze ≤ –18°C.

Ryc. 1 Warunki przechowywania próbek

- Jeśli próbki mają być przesyłane, należy je opakować i oznaczyć zgodnie z odpowiednimi krajowymi i/lub międzynarodowymi przepisami dotyczącymi transportu próbek i czynników zakaźnych.

Instrukcja użytkowania

Uwagi proceduralne

- Nie należy używać odczynników testu **cobas® EBV**, **cobas® EBV/BKV Control Kit**, **cobas® Buffer Negative Control Kit** i odczynników **cobas omni** po upływie ich daty ważności.
- Nie wykorzystywać ponownie materiałów zużywalnych. Są one przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.
- Instrukcje dotyczące prawidłowej konserwacji urządzeń zawiera podręcznik użytkownika i/lub instrukcja obsługi systemu **cobas® 5800** lub systemów **cobas® 6800/8800**.

Wykonanie testu cobas® EBV w systemie cobas® 5800

Test cobas® EBV można przeprowadzić przy użyciu minimalnej objętości próbki 375 µl, z której 200 µl jest przetwarzanych. Procedurę wykonywania testu opisano szczegółowo w Podręczniku użytkownika i/lub instrukcji obsługi systemu cobas® 5800. Na Ryc. 2 podsumowano tę procedurę.

Ryc. 2 Procedura testu cobas® EBV w systemie cobas® 5800

1	Zaloguj się do systemu
2	Wczytaj próbki do systemu: • Wczytaj statywy z próbkami do systemu • System przeprowadzi automatyczne przygotowanie • Złóż testy
3	Po poproszeniu przez system uzupełnij odczynniki i materiały zużywalne przez system: • Wczytaj swoistą dla testu kasetę (kasety) na odczynniki • Wczytaj mini statywy z kontrolami • Wczytaj końcówki do przetwarzania • Wczytaj końcówki do elucji • Wczytaj płytki do przetwarzania • Wczytaj płytki na odpady płynne • Wczytaj płytki amplifikacyjne • Wczytaj kasetę MGP • Uzupełnij rozcieńczalnik próbki • Uzupełnij odczynnik lizujący • Uzupełnij odczynnik płuczący
4	Rozpocznij przebieg przez wybranie przycisku „Start processing” (Start przetwarzania) w interfejsie użytkownika; wszystkie kolejne przebiegi rozpoczną się automatycznie, o ile nie zostaną ręcznie odłożone
5	Sprawdź i wyeksportuj wyniki
6	W razie potrzeby wyjmij i zamknij probówki z próbkami spełniające wymagania dotyczące minimalnej objętości do użycia w przyszłości Oczyść aparat: • Wyjmij puste mini statywy z kontrolami • Wyładuj pustą swoistą dla testu kasetę (kasety) na odczynniki • Opróżnij szufladę na płytki amplifikacyjne • Usuń odpady płynne • Usuń odpady stałe

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

Test cobas® EBV można przeprowadzić przy użyciu minimalnej objętości próbki 375 µl, z której 200 µl jest przetwarzanych. Procedurę wykonywania testu opisano szczegółowo w Podręczniku użytkownika i/lub instrukcji obsługi systemów cobas® 6800/8800. Na Ryc. 3 podsumowano tę procedurę.

Ryc. 3 Procedura testu cobas® EBV w systemach cobas® 6800/8800

1	Zaloguj się do systemu Naciśnij przycisk Start, aby przygotować system Zleć testy
2	Po poproszeniu przez system uzupełnij odczynniki i materiały zużywalne przez system: • Załaduj swoistą dla testu kasetę na odczynniki • Załaduj kasety z kontrolami • Załaduj końcówki pipetujące • Załaduj płytki do przetwarzania • Załaduj odczynnik MGP Reagent • Załaduj płytki amplifikacyjne • Uzupełnij rozcieńczalnik próbki • Uzupełnij odczynnik lizujący • Uzupełnij odczynnik płuczący
3	Załaduj próbki do systemu: • Załaduj statywy na próbki i statywy na niedrożne końcówki do modułu podajnika próbek • Potwierdź, że próbki zostały przyjęte do modułu transferu
4	Rozpocznij przebieg przez wybranie przycisku Start manualnie w interfejsie użytkownika lub ustaw automatyczne rozpoczęcie przebiegu po 120 minutach bądź po zapełnieniu partii
5	Sprawdź i wyeksportuj wyniki
6	W razie potrzeby wyjmij i zamknij probówki z próbkami spełniające wymogi dotyczące minimalnej objętości do użycia w przyszłości Oczyść aparat: • Wyjmij puste kasety z kontrolami • Opróżnij szufladę na płytki amplifikacyjne • Usuń odpady płynne • Usuń odpady stałe

Wyniki

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

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

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

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

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

Wyniki kontroli w systemie **cobas**® 5800

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

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

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

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

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

Oflagowanie kontroli w systemach **cobas® 6800/8800**

Tabela 11 Oflagowania kontroli ujemnej i kontroli dodatnich

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

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

Interpretacja wyników

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

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

Tabela 12 Interpretacja wyników dla poszczególnych targetów

Wyniki	Interpretacja
Target Not Detected	Nie wykryto EBV DNA. Podać wynik jako „Nie wykryto EBV”.
< Titer Min ^a	Obliczone miano jest niższe od dolnej granicy oznaczalności testu (LLoQ). Podać wynik jako „Wykryto EBV, miano poniżej (miano min.)”. Miano min. = 35,0 IU/ml
Miano	Obliczone miano znajduje się w zakresie liniowym testu — jest większe lub równie mianu min. oraz mniejsze lub równe mianu maks. Podać wynik jako „Wykryto (miano) EBV”.
> Titer Max ^b	Obliczone miano jest wyższe od górnej granicy oznaczalności testu (ULoQ). Podać wynik jako „Wykryto EBV, miano powyżej (miano maks.)”. Miano maks. = 1,0E+08 IU/ml

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

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

Interpretacja wyników w systemie cobas® 5800

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

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

- Próbkę powiązaną z ważną partią kontroli wyświetlane są jako „Valid” (Ważne) w kolumnie „Control result” (Wynik kontroli), jeśli wszystkie wyniki docelowe kontroli zgłaszane są jako ważne. Próbkę powiązaną z błędną partią kontroli wyświetlane są jako „Invalid” (Nieważne) w kolumnie „Control result” (Wynik kontroli), jeśli wszystkie wyniki docelowe kontroli zgłaszane są jako nieważne.
- Jeśli powiązane kontrole wyniku próbki są nieważne, do wyniku próbki zostanie dodana określona flaga:
 - Q05D: niepowodzenie weryfikacji wyniku z powodu nieważnej kontroli dodatniej
 - Q06D: niepowodzenie weryfikacji wyniku z powodu nieważnej kontroli ujemnej
- Wartości w kolumnie „Results” (Wyniki) dla poszczególnych wyników docelowych próbek powinny być interpretowane zgodnie z tym, co przedstawia Tabela 11 powyżej.

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

Interpretacja wyników w systemach cobas® 6800/8800

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

- Próbkę są oznaczane jako „Yes” (Tak) w kolumnie „Valid” (Ważna), jeżeli wszystkie pozyskane wyniki docelowe okazały się wynikami ważnymi. Próbkę oznaczone „No” (Nie) w kolumnie „Valid” (Ważna) mogą wymagać dodatkowej interpretacji i działania.
- Wartości dla poszczególnych wyników docelowych próbek powinny być interpretowane zgodnie z tym, co przedstawia Tabela 12 powyżej.

Ograniczenia metody

- Test **cobas® EBV** został oceniony jedynie pod kątem stosowania z **cobas® EBV/BKV Control Kit**, **cobas® Buffer Negative Control Kit**, **cobas omni MGP Reagent**, **cobas omni Lysis Reagent**, **cobas omni Specimen Diluent** i **cobas omni Wash Reagent** do użytku w systemach **cobas® 5800/6800/8800**.
- Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od prawidłowych procedur pobierania, przechowywania i dalszego postępowania z próbkami.
- Test ten został zatwierdzony wyłącznie do badania osocza krwi pobranej na EDTA. Badanie innych rodzajów próbek przy użyciu testu **cobas® EBV** może dawać nieprawidłowe wyniki. Pomiarów wirerii w osoczu nie można bezpośrednio porównać z wiracją w innych typach próbek.
- Na oznaczenie ilościowe DNA wirusa EBV wpływ mogą mieć: metoda pobrania próbki, czynniki zależne od pacjenta (tj. wiek, obecność objawów) i (lub) stadium zakażenia.
- Podobnie jak w przypadku każdego testu molekularnego, mutacje w obrębie regionów docelowych testu **cobas® EBV** mogą wpływać na wiązanie startera i/lub sondy oraz spowodować zaniżenie miana lub niewykrycie wirusa.

- Z uwagi na różnice pomiędzy metodami zaleca się, aby przed zmianą użytkownik przeprowadził w laboratorium badania korelacji stosowanych metod w celu określenia występujących pomiędzy nimi różnic jakościowych. Użytkownicy powinni postępować zgodnie z własnymi określonymi zasadami/procedurami.
- Test **cobas® EBV** nie jest przeznaczony do wykorzystania jako badanie przesiewowe na obecność wirusa EBV we krwi lub produktach krwiopochodnych.

Niekliniczna ocena wiarygodności

Najważniejsze parametry działania wykonywanego w systemach **cobas® 6800/8800**

Granica wykrywalności (LoD)

Międzynarodowy standard WHO

Granice wykrywalności testu **cobas® EBV** określono dzięki analizie seryjnych rozcieńczeń 1. międzynarodowego wzorca WHO dla DNA wirusa Epsteina-Barra do testów wykonywanych techniką amplifikacji kwasu nukleinowego (1. międzynarodowy wzorzec WHO EBV) uzyskanego z NIBSC (NIBSC 09/260), w ludzkim osoczu z krwi pobranej na EDTA ujemnym pod względem EBV. Panel składający się z sześciu poziomów stężeń i kontroli ślepej był testowany na trzech seriach odczytników **cobas® EBV**, wielu przebiegach, dniach, operatorach i aparatach.

Wyniki dla osocza z krwi pobranej na EDTA przedstawia Tabela 13 do Tabela 15. Badanie wykazało, że dla najmniej czulej serii stężenie, dla którego oczekuje się 95% trafności w analizie PROBIT wynosi 18,8 IU/ml przy 95% przedziale ufności od 14,5 do 27,5 IU/ml w osoczu z krwi pobranej na EDTA. Najniższe stężenie z odsetkiem trafności $\geq 95\%$ wynosi 20,0 IU/ml w osoczu z krwi pobranej na EDTA.

Tabela 13 Granica wykrywalności w osoczu z krwi pobranej na EDTA, seria 1

Stężenie wejściowe (DNA EBV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
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 w analizie PROBIT przy 95% trafności	18,8 IU/ml 95% przedział ufności: 14,5–27,5 IU/ml		

Tabela 14 Granica wykrywalności w osoczu z krwi pobranej na EDTA, seria 2

Stężenie wejściowe (DNA EBV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
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 w analizie PROBIT przy 95% trafności	12,4 IU/ml 95% przedział ufności: 10,0–17,0 IU/ml		

Tabela 15 Granica wykrywalności w osoczu z krwi pobranej na EDTA, seria 3

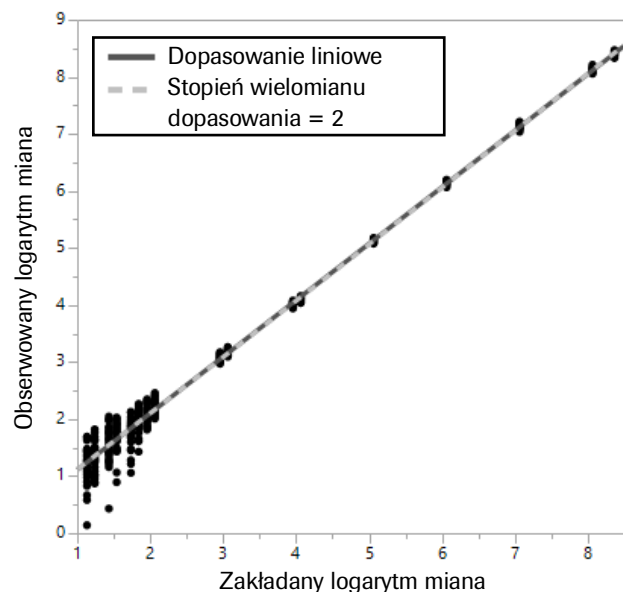
Stężenie wejściowe (DNA EBV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	62	98,4
10,0	63	48	76,2
5,0	63	38	60,3
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	18,6 IU/ml 95% przedział ufności: 14,4–27,1 IU/ml		

Zakres liniowości

Liniowość testu **cobas® EBV** oceniono, wykorzystując rozcieńczenia seryjne zawierające 17 elementów panelu z DNA genotypu 1 EBV pokrywającymi zakres liniowy testu. Użyto wyższego miana podstawowego DNA lambda do przygotowania 11 elementów panelu obejmującego cały zakres liniowości. Użyto próbki klinicznej do przygotowania 6 elementów panelu obejmującego pośredni i niższy poziom zakresu liniowości.

Wszystkie elementy panelu testowano w 36 powtórzeniach w obrębie trzech serii odczynników testu **cobas® EBV**, a wyniki badania przedstawia Ryc. 4.

Wykazano, że test **cobas® EBV** jest liniowy w zakresie od $1,40 \times 10^1$ IU/ml do $2,30 \times 10^8$ IU/ml i wykazuje bezwzględne odchylenie od bardziej dopasowanej regresji nieliniowej wynoszące najwyżej $\pm 0,1 \log_{10}$ w ludzkim osoczu z krwi pobranej na EDTA (patrz Ryc. 4). W zakresie liniowym dokładność testu mieściła się w granicach $\pm 0,2 \log_{10}$.

Ryc. 4 Określanie zakresu liniowego w osoczu z EDTA

Precyzja wewnątrz laboratorium

Precyzję testu **cobas® EBV** określono dzięki analizie rozcieńczeń seryjnych wysokiego miana DNA EBV (genotyp 1) w osoczu z krwi pobranej na EDTA ujemnym dla EBV. Sześć poziomów rozcieńczeń zbadano w 72 powtórzeniach dla każdego poziomu w trzech seriach odczynników testu **cobas® EBV** przy użyciu trzech urządzeń oraz trzech użytkowników przez 12 dni. Każda próbka przechodziła całą procedurę testu **cobas® EBV** na w pełni zautomatyzowanych **cobas® 6800/8800 Systems**. Dlatego podana precyzja odzwierciedla wszystkie aspekty procedury badawczej. Wyniki przedstawia Tabela 16.

Test **cobas® EBV** wykazywał wysoką precyzję dla trzech serii odczynników badanych w zakresie stężeń od $1,08\text{E}+02$ IU/ml do $5,40\text{E}+07$ IU/ml.

Tabela 16 Precyzja wewnątrzlaboratoryjna testu **cobas® EBV**

Stężenie nominalne [IU/ml]	Stężenie zakładane [IU/ml]	Osocze krwi pobranej na EDTA			
		Seria nr 1	Seria nr 2	Seria nr 3	Wszystkie partie
		OS	OS	OS	OS pulowane
$5,00\text{E}+07$	$5,40\text{E}+07$	0,03	0,04	0,04	0,04
$1,00\text{E}+06$	$1,08\text{E}+06$	0,02	0,03	0,02	0,02
$1,00\text{E}+05$	$1,08\text{E}+05$	0,02	0,02	0,03	0,02
$1,00\text{E}+04$	$1,08\text{E}+04$	0,04	0,02	0,03	0,03
$1,00\text{E}+03$	$1,08\text{E}+03$	0,05	0,05	0,05	0,05
$1,00\text{E}+02$	$1,08\text{E}+02$	0,17	0,18	0,15	0,17

Weryfikacja genotypu

Wydajność testu **cobas**® EBV dla genotypu 2 EBV oceniano na podstawie:

- Weryfikacji granicy wykrywalności
- Weryfikacji zakresu liniowości

Weryfikacja granicy wykrywalności dla genotypu 2

DNA EBV dla genotypu 2 rozcieńczono do trzech poziomów stężeń w ujemnym względem EBV osoczu z krwi pobranej na EDTA. Określenie odsetka trafności przeprowadzono w 63 powtórzeniach dla każdego poziomu. Badania przeprowadzono z użyciem trzech serii odczynników **cobas**® EBV, w kilku przebiegach, przez kilka dni, w wykonaniu różnych użytkowników i z użyciem różnych analizatorów. Wyniki dowodzą, że test **cobas**® EBV wykrywał DNA EBV genotypu 2 w stężeniu 18,8 IU/ml z odsetkiem trafności wynoszącym $\geq 95\%$.

Weryfikacja zakresu liniowości dla genotypu 2

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

Dla genotypu 2 zweryfikowano zakres liniowości testu **cobas**® EBV.

Swoistość

Swoistość testu **cobas**® EBV określono na podstawie analizy próbek EBV-ujemnego osocza z krwi pobranej na EDTA od indywidualnych dawców. Sto jeden pojedynczych próbek osocza z EDTA zbadano przy użyciu trzech serii odczynników testu **cobas**® EBV. Wszystkie badane próbki były ujemne pod względem DNA EBV. W panelu testu swoistość testu **cobas**® EBV wynosiła 100% (dolny jednostronny 95% przedział ufności wynoszący 97,08%).

Swoistość analityczna

Swoistość analityczną testu **cobas® EBV** oceniono w panelu rozcieńczeń drobnoustrojów do stężenia 1,00E+06 jednostek/ml (komórek/ml, CFU/ml, IFU/ml, CCU/ml) dla bakterii i drożdży oraz pomiędzy 3,00E+05 a 1,00E+06 jednostek/ml (IU/ml, kopii/ml, komórek/ml, TCID₅₀/ml) dla wirusów w dodatnim pod względem DNA EBV i ujemnym pod względem DNA EBV osoczu z krwi pobranej na EDTA. Dwa swoiste badane organizmy podano w Tabeli 17. Każdy element panelu został przebadany przy użyciu testu **cobas® EBV**. Żaden z patogenów innych niż EBV nie zakłócał wiarygodności testu.

Tabela 17 Drobnoustroje badane pod kątem reaktywności krzyżowej

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

Swoistość analityczna – substancje interferujące

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

Dodatkowo składniki leków wymienione w Tabeli 18 badano trzykrotnym C_{max} z i bez DNA EBV.

Żadna z potencjalnie interferujących substancji nie wykazywała interferencji z testem.

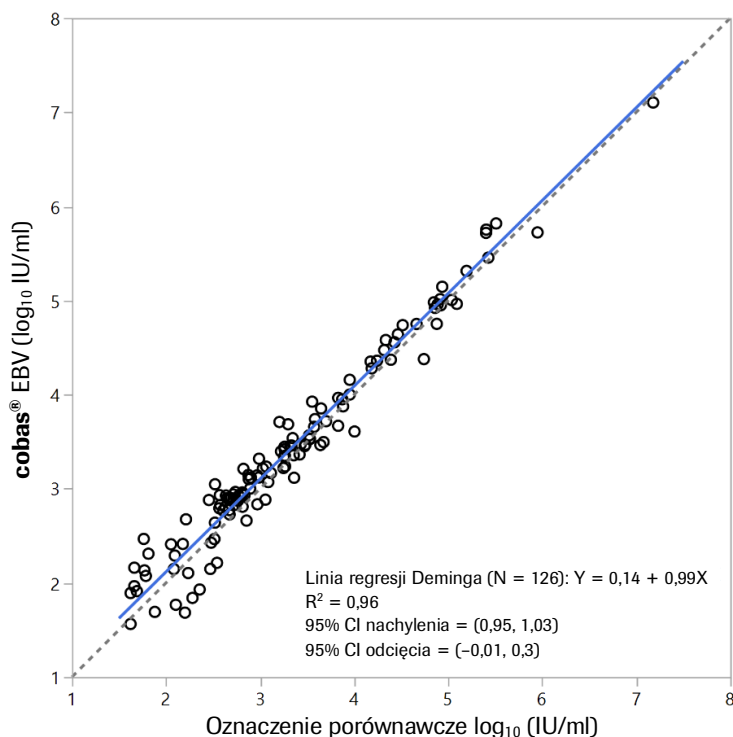
Tabela 18 Składniki leków badane pod kątem interferencji z ilościowym oznaczeniem DNA EBV w teście cobas® EBV

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

Korelacja metody

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

Rys. 5 zawiera wyniki regresji Deminga.

Rys. 5 Analiza regresji testu cobas® EBV w odniesieniu do oznaczenia porównawczego

Błąd całego systemu

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

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

Kontaminacja między próbkami

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

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

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

Powtarzalność testu **cobas® EBV**

Powtarzalność testu **cobas® EBV** oceniano w odniesieniu do wielu czynników, takich jak seria odczynników, ośrodki badawczy, partia i dni, w których przeprowadzono test, które mogą wpływać na zgłaszane wyniki rutynowych testów klinicznych. Ocena została przeprowadzona w 3 ośrodkach badawczych przy użyciu 3 serii odczynników oraz panelu próbek dodatnich i ujemnych, co dało łącznie 270 testów (nie uwzględniając kontroli). Panele zostały przygotowane z osocza krwi pobranej na EDTA, które było ujemne w kierunku przeciwciał VAC IgG przeciwko wirusowi EBV. Zostały również przebadane pod kątem wirusa EBV zgodnie z protokołem przeprowadzania testu NAT na osoczu. Ponadto do paneli dodano międzynarodowy standard WHO EBV, supernatant hodowli komórkowej EBV lub fagemid lambda zawierający DNA wirusa EBV. We wszystkich ośrodkach dwóch operatorów testowało każdą serię odczynników przez 5 dni. Każdego dnia wykonywano dwa przebiegi (1 przebieg = 1 partia; 1 partia = 1 panel + 3 kontrole) na operatora, a podczas każdego przebiegu analizowano 3 powtórzenia każdego elementu panelu. Zestawienie wyników oceny, patrz Tabela 19.

Tabela 19 Możliwe do przypisania procentowe udziały zmienności całkowitej (%TV), odchylenia standardowego precyzji całkowitej (OS), i logarytmiczno-normalnego CV (%) stężenia DNA EBV ($\log_{10}$ IU/ml) wg. dodatnich elementów panelu

Oczekiwane stężenie DNA EBV ($\log_{10}$ IU/ml)	Obserwowane średnie ^a stężenie DNA wirusa EBV ($\log_{10}$ IU/ml)	Liczba testów ^b	Seria %TV ^c (CV%) ^d	Ośrodek %TV ^c (CV%) ^d	Dzień/operator %TV ^c (CV%) ^d	Partia %TV ^c (CV%) ^d	W ramach partii %TV ^c (CV%) ^d	Precyzja całkowita OS ^e	Precyzja całkowita 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 Obliczono z użyciem procedury SAS MIXED.

^b Liczba ważnych testów z wykrywalnym poziomem DNA.

^c %TV = procentowy udział w zmienności całkowitej.

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

^e Obliczono z użyciem całkowitej zmienności procedury SAS MIXED.

Uwaga: Tabela obejmuje wyłącznie wyniki z wykrywalnym poziomem DNA. OS = odchylenie standardowe. CV = współczynnik zmienności; EBV = wirus Epsteina-Barra.

Test **cobas® EBV** wykazał akceptowalną powtarzalność kliniczną przy odpowiednich stężeniach porównawczych. Ponadto system wykrył 100% z 3 próbek z LLoQ. Systemy **cobas® 6800** i **cobas® 8800** cechuje modułowa konstrukcja. Są one równoważne w przypadku wykonywania testu **cobas® EBV**. Wszystkie granice oszacowanych 95% przedziałów ufności związanych z różnicą między 2 pomiarami dotyczącymi tego samego pacjenta mieściły się w zakresie $\pm 0,53 \log_{10}$ IU/ml. Oznacza to, że za pomocą testu można ocenić zmiany poziomów DNA wirusa EBV o istotnym znaczeniu klinicznym.

Z 270 ważnych testów pod kątem ujemnych elementów panelu wykonanych za pomocą systemu **cobas® 6800/8800** 14 próbek (5,19%) wykazało wykrywalność < LLoQ wyników dodatnich. Wyniki nie były związane z konkretnym aparatem/ośrodkiem ani serią odczytników. Połowicznie zagnieżdżony test PCR oraz sekwencjonowanie DNA potwierdziły obecność DNA wirusa EBV w tych próbkach.

Wiarygodność testu **cobas® EBV**

Wiarygodność kliniczna testu **cobas® EBV** została dodatkowo oceniona w trzech ośrodkach badawczych. Zmierzono poziomy DNA wirusa EBV w próbkach klinicznych (rozcieńczonych i nierozcieńczonych) pobranych od pacjentów zakażonych i niezakażonych wirusem EBV oraz w spreparowanych próbkach osocza krwi pobranej na EDTA z dodanym wirusem EBV z hodowli. Wyniki porównano z wynikami uznanego testu do oznaczania kwasów nukleinowych opracowanego laboratoryjnie (LDT) (oznaczenie porównawcze EBV LDT). Ze wszystkich próbek oznaczonych za pomocą testu **cobas® EBV** i oznaczenia porównawczego EBV łącznie 464 próbki (439 nierozcieńczonych lub rozcieńczonych próbek klinicznych od 72 biorców przeszczepu oraz 25 próbek spreparowanych) dało wyniki ważne w obu testach i kwalifikowały się do klinicznej analizy zgodności.

Tabela 20 Analiza zgodności testu **cobas® EBV** i oznaczenia porównawczego LDT na podstawie wyników poziomów DNA wirusa EBV oznaczonych we wszystkich próbkach

cobas® EBV (log₁₀ IU/ml)	Oznaczenie porównawcze EBV LDT (log₁₀ IU/ml) Target Not Detected	Oznaczenie porównawcze EBV LDT (log₁₀ IU/ml) < LLoQ (< 2)	Oznaczenie porównawcze EBV LDT (log₁₀ IU/ml) od 2 do < 2,6	Oznaczenie porównawcze EBV LDT (log₁₀ IU/ml) od 2,6 do < 3,2	Oznaczenie porównawcze EBV LDT (log₁₀ IU/ml) od 3,2 do 3,8	Oznaczenie porównawcze EBV LDT (log₁₀ IU/ml) >3,8	Ogółem
Target Not Detected	95	17	17	0	0	0	129
< LLoQ (< 2)	39	46	75	11	0	0	171
od 2 do < 2,6	1	2	16	37	6	0	62
od 2,6 do < 3,2	1	0	5	15	30	1	52
od 3,2 do 3,8	0	0	0	0	9	11	20
>3,8	0	0	0	0	1	29	30
Ogółem	136	65	113	63	46	41	464
Zgodność kolumny (%)	(134/136) 98,5%	(65/65) 100%	(96/113) 85,0%	(52/63) 82,5%	(40/46) 87,0%	(40/41) 97,6%	-
(Punktacja 95% CI) ^a	(94,8%, 99,6%)	(94,4%, 100%)	(77,2%, 90,4%)	(71,4%, 90,0%)	(74,3%, 93,9%)	(87,4%, 99,6%)	-

Uwaga: LLoQ = dolna granica oznaczalności oznaczenia porównawczego EBV LDT (100 IU/ml).

Odchylenie standardowe oznaczenia porównawczego EBV LDT oszacowano na 0,3 log₁₀ IU/ml (na podstawie analitycznego badania precyzji EBV LDT).

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

^a Założona niezależność między wszystkimi próbkami.

CI = przedział ufności.

Sekwencjonowanie DNA próbek reprezentatywnych od pacjentów, których wyniki cechują się stałym przesunięciem o ponad 1 log₁₀ IU/ml poziomu DNA, nie wykazało niedopasowań sekwencji docelowych w przypadku startera i sondy w teście **cobas® EBV**.

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

Z 43 próbek ujemnych pod kątem oznaczenia porównawczego EBV LDT pobranych do oceny procentowej zgodności wyników ujemnych (NPA) za pomocą testu **cobas® EBV** 41 próbek dało wynik ujemny w teście **cobas® EBV**. Oznacza to, że NPA wynosiła 95,4%, przy czym ścisły 95% przedział ufności mieścił się w granicach od 84,2% do 99,4%. Dwie próbki ujemne pod kątem oznaczenia porównawczego EBV LDT dały wynik dodatni (< LLoQ) w teście **cobas® EBV** i wynik seropozytywny pod kątem przeciwciał VCA IgG przeciwko wirusowi EBV oraz przeciwciał IgG przeciwko wirusowi EBNA-1 w dodatkowym badaniu serologicznym.

Zgodność testu **cobas® EBV** i oznaczenia porównawczego EBV LDT oceniono, stosując różne kliniczne wartości progowe.

Tabela 21 Podsumowanie zgodności testu **cobas® EBV** i oznaczenia porównawczego EBV LDT przy zastosowaniu różnych wartości progowych dla wszystkich próbek

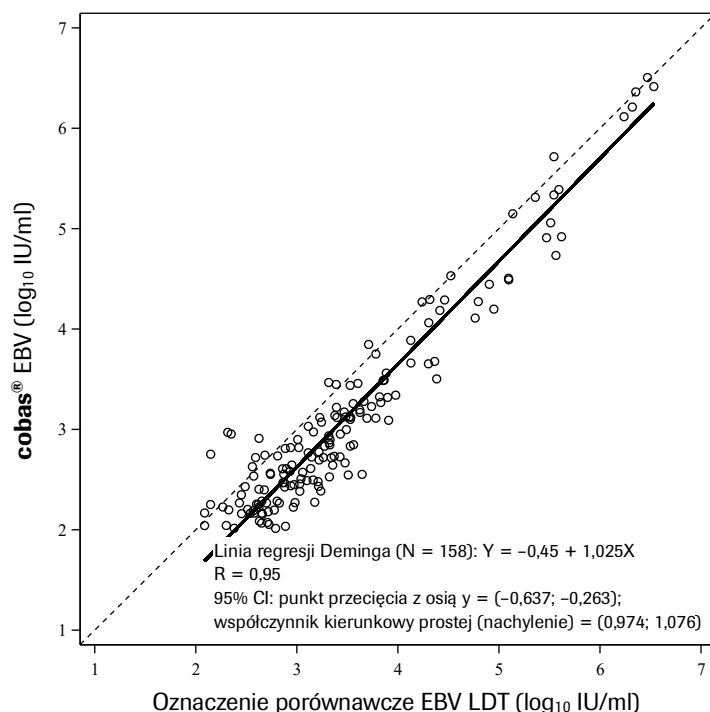
	Zgodność procentowa < wartość progowa 95% CI ^b (n/N)	Zgodność procentowa ≥ wartość progowa 95% CI ^b (n/N)
Target Not Detected	98,5% (134/136) (94,8%, 99,6%)	89,6% (294/328) (85,9%, 92,5%)
LLoQ ^a (2,0 log ₁₀ IU/ml)	98,0% (197/201) (95,0%, 99,2%)	60,8% (160/263) (54,8%, 66,5%)
3,0 log ₁₀ IU/ml	100,0%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

^a LLoQ = dolna granica oznaczalności oznaczenia porównawczego EBV LDT (100 IU/ml).

^b CI = przedział ufności.

Ze wszystkich próbek oznaczonych za pomocą testu **cobas® EBV**, które po wykonaniu oznaczenia porównawczego EBV były dodatnie w kierunku EBV, łącznie 158 próbek (139 nierozcieńczonych lub rozcieńczonych próbek klinicznych od 28 biorców przeszczepu oraz 19 spreparowanych próbek) kwalifikowało się do analizy korelacji w trzech ośrodkach badawczych.

Ryc. 6 Korelacja testu **cobas® EBV** z oznaczeniem porównawczym EBV LDT dla wszystkich próbek: wykres regresji liniowej Deminga poziomów DNA (log₁₀ IU/ml)



Dodatkowa analiza wykresu rozrzutu przedstawiającego różnice w poziomach DNA wykazała różnicę systematyczną pomiędzy obydwoma testami, która jest stała przez cały nakładający się zakres liniowy. 95% przedział ufności punktu przecięcia prostej regresji z osią y na wykresach rozrzutu wynosił $(-0,456; 0,104)$, co mieści się w granicy $\pm 0,6 \log_{10}$ IU/ml (± 2 odchylenia standardowe precyzji analitycznej oznaczenia porównawczego EBV LDT).

Ponadto średni rozrzut oszacowano na $-0,364 \log_{10}$ IU/ml, a różnica systematyczna między obydwoma testami wynosiła $-0,352 \log_{10}$ IU/ml i $-0,376 \log_{10}$ IU/ml w przypadku próbek o poziomach DNA wynoszących odpowiednio $3 \log_{10}$ IU/ml i $4 \log_{10}$ IU/ml.

Równoważność/porównanie systemu

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

Dodatkowe informacje

Najważniejsze cechy testu

Rodzaj próbki	Osocze krwi pobranej na EDTA
Wymagana ilość próbki	375 µl*
Objętość przetwarzania	200 µl
Czułość analityczna	18,8 IU/ml
Zakres liniowości	35,0 IU/ml – 1E+08 IU/ml
Swoistość	100%
Wykrywane genotypy	Genotypy 1 i 2 EBV

* Dla próbek wtórnych **cobas omni** zidentyfikowano objętość martwą wynoszącą 175 µl. Inne próbki używane do testów mogą mieć inną objętość martwą i wymagać większej lub mniejszej objętości minimalnej. Aby uzyskać więcej informacji, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.

Oznaczenia

Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

Tabela 22 Oznaczenia stosowane na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR

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

Pomoc techniczna

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

Wytwórca i importer

Tabela 23 Wytwórca i importer



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

Made in USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Znaki towarowe i patenty

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

Prawo autorskie

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Piśmiennictwo

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 JL. 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.

Wersja dokumentu

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc Rev. 1.0 03/2022	Pierwsza publikacja.
Doc Rev. 2.0 09/2022	Zaktualizowano pierwszą stronę, tabelę 2 i tabelę 3 o dodatkowe numery P/N zestawów kontrolnych. Zaktualizowano sekcję Znaki towarowe i patenty oraz link. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.

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