

cobas[®] **CMV**

**Ilościowy test kwasu nukleinowego
do użytku z systemem cobas[®] 4800**

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

cobas[®] CMV	120 Tests	P/N: 07865970190
cobas[®] CMV Control Kit	10 Sets	P/N: 07865988190
cobas[®] 4800 System Sample Preparation Kit 2	240 Tests 960 Tests	P/N: 06979513190 P/N: 06979521190
cobas[®] 4800 System Wash Buffer Kit	240 Tests 960 Tests	P/N: 05235863190 P/N: 05235871190
cobas[®] 4800 System Lysis Kit 2	240 Tests 960 Tests	P/N: 06979530190 P/N: 06979548190

SPIS TREŚCI

Zastosowanie

Podsumowanie oraz opis testu

Informacje podstawowe	4
Uzasadnienie badań NAT CMV	5
Objaśnienie testu	5
Zasady procedury	5

Materiały i odczynniki

Odczynniki.....	7
Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników.....	12
Wymagane materiały dodatkowe.....	12
Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane.....	13
Obsługiwane próbki na próbki	13

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności	14
Dobra praktyka laboratoryjna	15
Użytkowanie odczynników	15
Zanieczyszczenie.....	15
Integralność.....	16
Utylizacja	16
Rozlanie płynów i czyszczenie.....	16

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Pobieranie próbek	17
Przechowywanie i trwałość próbek podczas transportu	17

Instrukcja użytkowania

Wykonywanie oznaczenia.....	18
Wielkość przebiegu	18
Przebieg pracy	19

Wyniki

Kontrola jakości i ważność wyników	22
Interpretacja wyników kontroli.....	22
Interpretacja wyników	23
Lista flag.....	24
Ograniczenia metody	25

Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych

Najważniejsze parametry działania testu.....	26
Granica wykrywalności (LoD)	26
Międzynarodowy standard WHO	26
Zakres liniowości.....	26
Dokładność wewnątrz laboratorium	28
Weryfikacja genotypu.....	28
Weryfikacja granicy wykrywalności dla genotypów gB-2, gB-3 i gB-4 glikoproteiny B.....	28
Weryfikacji zakresu liniowego dla genotypów gB-2, gB-3 i gB-4 glikoproteiny B.....	29
Weryfikacja próbki lekoopornego CMV.....	29
Weryfikacja granicy wykrywalności próbek lekoopornego CMV (opornego na foskarnet lub gancyklowir, walgancyklowir i cidofowir).....	29
Weryfikacja zakresu liniowego próbek lekoopornego CMV (opornego na foskarnet lub gancyklowir, walgancyklowir i cidofowir).....	29
Swoistość analityczna	30
Swoistość analityczna — substancje wpływające na wynik testu	31
Błąd całego systemu	31
Zanieczyszczenie pomiędzy próbkami	31

Ocena klinicznej wiarygodności testu

Korelacja metody	32
Swoistość	32

Dodatkowe informacje

Najważniejsze cechy oznaczenia	33
Oznaczenia	34
Pomoc techniczna.....	35
Wytwórca i importer	35
Znaki towarowe i patenty	35
Prawo autorskie	35
Piśmiennictwo	36
Wersja dokumentu	38

Zastosowanie

cobas® CMV to test do amplifikacji kwasu nukleinowego w warunkach *in vitro* do ilościowego oznaczania DNA cytomegalowirusa (CMV) w ludzkim osoczu pobranym na EDTA. **cobas® CMV** jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w diagnostyce i leczeniu CMV u pacjentów po przeszczepach narządów miękkich oraz pacjentów po przeszczepach hematopoetycznych komórek macierzystych. Test może być stosowany u tych populacji pacjentów w celu oceny potrzeby inicjowania leczenia przeciwwirusowego. U pacjentów otrzymujących terapię anti-CMV, seryjne oznaczenia DNA można stosować w celu oceny odpowiedzi wirusa na terapię. Wyniki testu **cobas® CMV** muszą być interpretowane w oparciu o wszystkie istotne dane kliniczne i laboratoryjne.

Podsumowanie oraz opis testu

Informacje podstawowe

Ludzki cytomegalowirus (CMV) to ludzki patogen wirusowy należący do rodziny herpeswirusów występujących powszechnie na całym świecie.^{1, 2} U gospodarzy z obniżoną odpornością, zakażenia CMV są często bezobjawowe, ale zasadnicze zakażenie może występować jako ostry zespół podobny do mononukleozy. Po zakażeniu CMV zazwyczaj utrzymuje się jako dożywotnie zakażenie utajone, które może okresowo ulegać reaktywacji. Najczęstszymi miejscami zakażenia CMV są komórki jednojądrzaste krwi obwodowej linii szpikowej (ale nie limfocyty) oraz komórki śródbłonna naczyń.³ U człowieka wirus CMV pozostaje w stanie utajonym w monocytach/makrofagach.² Osoby z zakażeniem utajonym mogą bezobjawowo wydzielać wirusa do płynów ustrojowych (np. moczu, śliny) i w ten sposób zarażać innych. Osoby z obniżoną odpornością, w tym niemowlęta, biorcy przeszczepów oraz pacjenci z AIDS, należą do grupy wysokiego ryzyka wystąpienia ciężkich pierwotnych zakażeń CMV lub reaktywacji uspiętego CMV, które mogą prowadzić do podwyższonej zachorowalności i śmiertelności.⁴ Ciężkie objawy choroby CMV obejmują zapalenie siatkówki, poliradikulopatię, nieżyt żołądkowo-jelitowy, zapalenie wątroby, zapalenie mózgu, zapalenie przełyku, zapalenie jelit, zapalenie trzustki, zapalenie nerek, odrzucenie dawcy narządu, zapalenie płuc i zespół wirusowy CMV.^{2, 5, 6}

Nasze obecne rozumienie istotnych klinicznie wartości progowych rozwoju choroby CMV pochodzi z różnorodnych badań przy użyciu różnych technik, populacji badania i punktów końcowych.⁷⁻¹⁴ Ogólnie, z ryzykiem rozwoju choroby ściślej związane jest wyższe miano wirusa CMV. Związek między wirusią a chorobą jest sigmoidalny, tj. ryzyko choroby CMV znacząco rośnie, po tym jak obciążenie wirusem CMV osiągnie „krytyczną wartość progową”. Na przykład podczas stosowania laboratoryjnego testu DNA CMV z krwi pełnej w celu badania biorców przeszczepu wątroby, kluczowa wartość progowa wynosiła $\geq 5 \log_{10}$ kopii/ml DNA CMV.¹² U pacjentów z HIV/AIDS, stężenia DNA CMV były skorelowane z ryzykiem choroby CMV i śmiertelnością całkowitą.¹³⁻¹⁸

Jednak obecne metody laboratoryjne ilościowego oznaczania DNA CMV są ograniczone przez brak standaryzowanych wyników, które mogą prowadzić do wysokiego stopnia zmienności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej.¹⁷ Walidowanie odtwarzalności obciążenia DNA wirusa CMV jest kluczowe do zapewnienia spójnych wyników w celu leczenia pacjentów z chorobą CMV. Obecne wytyczne oparte na precyzji testów PCR sugerują, że zmiany seryjnych pomiarów obciążenia wirusowego powinny być co najmniej 3-krotne ($0,5 \log_{10}$ kopii/ml), aby reprezentowały zmiany istotne biologicznie. Ponieważ zmienność jest największa przy niskich stężeniach, dla wartości bliskich dolnej granicy oznaczalności mogą być wymagane ponad 5-krotne ($0,7 \log_{10}$ kopii/ml) zmiany wirusii, aby można je było uznać za istotne.^{9, 19}

Chociaż ściśle wartości progowe nadal są przedmiotem debaty ze względu na zmienność pomiędzy testami, koncepcja kluczowej wartości progowej wydaje się być ważna i była zgłaszana w badaniach przyrodniczych pokazując, że wyższe wartości miana wirusa korelowały ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby CMV.⁷⁻¹² Jedno badanie wykorzystujące test COBAS® AMPLICOR CMV MONITOR (test CACM, w Stanach Zjednoczonych ma status przeznaczony wyłącznie do celów naukowych i nosi znak CE-IVD) ustaliło wartość odcięcia prognozującą chorobę między 2000 i 5000 kopii/ml u seropozytywnych pod względem CMV biorców przeszczepu wątroby.⁸

Uzasadnienie badań NAT CMV

Do metod laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce rozlanego zakażenia oraz aktywnej choroby narządowej spowodowanej przez ludzki wirus CMV należą: wyizolowanie wirusa metodą hodowli z leukocytów krwi obwodowej (ang. *Peripheral Blood Leukocytes*, PBL), badanie histologiczne bioptatów, metody serologiczne, pomiar poziomu antygeny pp65 oraz detekcja DNA CMV przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR).¹⁸ Badania serologiczne mają znaczenie jedynie w określaniu, czy pacjent został wcześniej zakażony CMV i czy grozi mu reaktywacja. Metody hodowli mają małą wartość predykcyjną; czas hodowli wynosi ponad 48 godzin, a ich zastosowanie ograniczone jest do pacjentów z upośledzoną odpornością. Ocena poziomu antygeny pp65 jest pracochłonna i wymaga opracowania próbki krwi w ciągu 6 godzin od jej pobrania, ponieważ przechowywanie próbki powoduje spadek poziomu antygeny.²⁰ Ocena pp65 jest również trudna do przeprowadzenia u pacjentów z neutropenią. Bezpośrednia detekcja DNA wirusa CMV np. za pomocą metod PCR w czasie rzeczywistym potencjalnie oferuje szeroki zakres dynamiczny, precyzję i wysoką czułość.

Objaśnienie testu

Test **cobas®** CMV to test ilościowy wykonywany z użyciem systemu **cobas®** 4800. Test **cobas®** CMV umożliwia wykrywanie i oznaczanie ilościowe DNA CMV oparte na 1. międzynarodowym wzorcu WHO HCMV w osoczu z EDTA u pacjentów zakażonych. Miano wirusa jest określone ilościowo w porównaniu ze standardem kwantyfikacji DNA nie-CMV (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 CMV. Każda seria zestawu do amplifikacji/detekcji została skalibrowana w odniesieniu do międzynarodowego standardu WHO CMV.

Zasady procedury

Test **cobas®** CMV opiera się na całkowicie zautomatyzowanym przygotowaniu próbek (ekstrakcji i oczyszczaniu kwasów nukleinowych), po którym przeprowadzana jest amplifikacja i detekcja podczas reakcji PCR. System **cobas®** 4800 składa się z aparatu **cobas®** x 480 oraz analizatora **cobas®** z 480. Automatyczne przetwarzanie danych jest prowadzone przez oprogramowanie **cobas®** 4800, które przypisuje wynik testu dla wszystkich badań jako „nie wykryto materiału docelowego”, < LLoQ (poniżej dolnej granicy oznaczalności), > ULoQ (powyżej górnej granicy oznaczalności) lub „wykryto DNA CMV”, wartość w liniowym zakresie oznaczalności $LLoQ \leq x \leq ULoQ$). Wyniki można analizować bezpośrednio na ekranie systemu, można je eksportować lub wydrukować w postaci raportu.

Kwasy nukleinowe z próbek pacjentów, kontrole zewnętrzne i dodane cząsteczki DNA QS lambda są izolowane równocześnie. Podsumowując, kwasy nukleinowe wirusów są uwalniane przez dodanie do próbki proteiny i odczynnik lizujący. Uwolnione kwasy nukleinowe łączą się z silikonową powierzchnią dodanych szklanych cząstek magnetycznych. Niezwiązane substancje i zanieczyszczenia, takie jak

zdenaturowane białka, pozostałości komórek i potencjalne inhibitory reakcji PCR są usuwane na kolejnych etapach z użyciem buforu płuczącego, a oczyszczone kwasy nukleinowe są następnie wmywane w podwyższonej temperaturze ze szklanych cząstek magnetycznych z użyciem buforu do elucji.

Wybiórcza amplifikacja docelowego kwasu nukleinowego z próbki jest osiągnięta przez zastosowanie docelowych swoistych dla wirusa starterów, przedniego i wstecznego, wybranych z wysoce konserwatywnych regionów genu polimerazy DNA wirusa CMV (UL54). Selektywna amplifikacja DNA QS uzyskiwana jest przy użyciu starterów sensownego i antysensownego o swoistej sekwencji, które wybierane są tak, aby nie były homologiczne z genomem CMV. 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). Jakikolwiek 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.²¹⁻²³ Jednak nowo powstały amplikon nie jest eliminowany, gdyż enzym AmpErase w temperaturze przekraczającej 55°C ulega inaktywacji.



Odczynnik Master Mix **cobas**® CMV zawiera jedną sondę detekcyjną swoistą dla badanych sekwencji CMV i jedną sondę dla DNA QS. Sondy są oznaczone za pomocą swoistych dla sekwencji docelowych fluorescencyjnych barwników reporterowych, pozwalających na równoczesne wykrywanie badanego CMV i DNA QS w dwóch różnych kanałach detekcji.^{24, 25} W przypadku niezwiązania z sekwencją docelową sygnały fluorescencyjne nienaruszonych sond są tłumione przez barwnik wygaszający. Podczas amplifikacji PCR hybrydacja sond do swoistych sekwencji jednoniciowej matrycy DNA skutkuje cięciem sondy przez polimerazę DNA w wyniku posiadanej przez nią aktywności nukleazy w kierunku od końca 5' do 3', co powoduje rozdzielenie barwników reporterowych i wygaszającego 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.

Materiały i odczynniki

Odczynniki



Wszystkie nieotwarte odczynniki i kontrole powinny być przechowywane zgodnie z zaleceniami zawartymi w tabeli Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników.

Zestaw	Elementy i składniki odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie
cobas® CMV 120 testów (P/N: 07865970190)	MMX R1 (cobas® Master Mix Reagent 1 — Odczynnik 1 cobas® Master Mix) Octan magnezu, wodorotlenek potasu, < 0,1% azydku sodu	10 × 1,75 ml	Nie dotyczy
	CMV MMX R2 (cobas® CMV Master Mix Reagent 2 — Odczynnik 2 cobas® CMV Master Mix) Bufor trycynowy, octan potasu, 18% dimetylo- sulfotlenku, glicerol, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% starterów sensownych i anty- sensownych dla CMV, < 0,01% starterów sensownych i antysensownych standardu ilościowego, < 0,01% znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond oligonukleotydowych, swoistych dla CMV i standardu ilościowego, < 0,01% aptameru oligonukleotydowego, < 0,01% polimerazy DNA Z05D (bakteryjnej), < 0,01% enzymu AmpErase (uracylo-N- glikozylazy) (bakteryjnej), < 0,1% azydku sodu	10 × 0,5 ml	Nie dotyczy
	DNA QS (cobas® DNA Quantitation Standard — Wzorzec ilościowy cobas® DNA) Bufor Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% konstruktu innego niż DNA CMV zawierającego starter wiążący region inny niż CMV oraz region unikatowej sondy (niezakaźny DNA), 0,002% Poli-rA RNA (syntetyczny), < 0,1% azydku sodu	10 × 1,75 ml	Nie dotyczy



Zestaw	Elementy i składniki odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie ^a
cobas® CMV Control Kit 10 zestawów (P/N: 07865988190)	CMV L(+)C (Kontrola nisko dodatnia cobas® CMV) < 0,001% syntetycznego DNA (plazmid) wirusa CMV opłaszczanego białkiem kapsydowym bakteriofaga Lambda, prawidłowe osocze ludzkie niewykazujące reaktywności w licencjonowanych testach względem przeciwciał przeciwko wirusowi HCV, HIV-1/2, antygenowi HBsAg, przeciwciał przeciwko antygenowi HBc; niewykrywalne metodami PCR RNA wirusa HIV-1, RNA wirusa HIV-2, RNA wirusa HCV, DNA wirusa HBV, RNA wirusa HEV, RNA wirusa WNV oraz DNA wirusa CMV. 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300	10 × 0,75 ml	  UWAGA H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P272: Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wносить poza miejsce pracy. 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.
	CMV H(+)C (Kontrola wysoko dodatnia cobas® CMV) < 0,001% wysokiego miana syntetycznego DNA (plazmid) wirusa CMV opłaszczanego białkiem kapsydowym bakteriofaga Lambda, prawidłowe osocze ludzkie niewykazujące reaktywności w licencjonowanych testach względem przeciwciał przeciwko wirusowi HCV, HIV-1/2, antygenowi HBsAg, przeciwciał przeciwko antygenowi HBc; niewykrywalne metodami PCR RNA wirusa HIV-1, RNA wirusa HIV-2, RNA wirusa HCV, DNA wirusa HBV, RNA wirusa HEV, RNA wirusa WNV oraz DNA wirusa CMV. 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300	10 × 0,75 ml	
	(-)C2 (Ujemna kontrola 2 cobas®) Prawidłowe osocze ludzkie niewykazujące reaktywności w licencjonowanych testach względem przeciwciał przeciwko wirusowi HCV, HIV-1/2, antygenowi HBsAg, przeciwciał przeciwko antygenowi HBc; niewykrywalne metodami PCR RNA wirusa HIV-1, RNA wirusa HIV-2, RNA wirusa HCV, DNA wirusa HBV, RNA wirusa HEV, RNA wirusa WNV oraz DNA wirusa CMV. < 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300	10 × 0,75 ml	

^a Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zasadniczo zgodne z wytycznymi GHS UE.

Zestaw	Elementy i składniki odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 240 testów (P/N: 06979513190)	MGP 2 (cobas® 4800 MGP Reagent 2 — Odczynnik 2 cobas® 4800 MGP) Szkłane cząstki magnetyczne, bufor Tris, 0,1% metylo-4-hydroksybenzoesanu, < 0,1% azydku sodu	10 × 8 ml	Nie dotyczy
	EB 2 (cobas® 4800 Elution Buffer 2 — Bufor do elucji 2 cobas® 4800) Bufor Tris, 0,2% metylo-4-hydroksybenzoesan	10 × 17 ml	
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 960 testów (P/N: 06979521190)	MGP 2 (cobas® 4800 MGP Reagent 2 — Odczynnik 2 cobas® 4800 MGP) Szkłane cząstki magnetyczne, bufor Tris, 0,1% metylo-4-hydroksybenzoesanu, < 0,1% azydku sodu	10 × 16 ml	Nie dotyczy
	EB 2 (cobas® 4800 Elution Buffer 2 — Bufor do elucji 2 cobas® 4800) Bufor Tris, 0,2% metylo-4-hydroksybenzoesan	10 × 17 ml	
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 240 testów (P/N: 05235863190)	WB Dwuwodny cytrynian sodu, 0,05% N-metyloizotiazolonu HCl	10 × 55 ml	Nie dotyczy
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 960 testów (P/N: 05235871190)	WB Dwuwodny cytrynian sodu, 0,05% N-metyloizotiazolonu HCl	10 × 200 ml	Nie dotyczy

Zestaw	Elementy i składniki odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie ^a
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 240 testów (P/N: 06979530190)	<p>P 2 (Proteaza 2 cobas® 4800) Bufor Tris, < 0,05% EDTA, chlorek wapnia, octan wapnia, 8% (udział wagowo-obj.) proteiny</p>	10 × 1,0 ml	 <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H334: Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. P261: Unikać wdychania mgły lub par. P280: Stosować rękawice ochronne. P284: Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. P304 + P340: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P342 + P311: W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. 39450-01-6 Proteinaza serynowa, <i>Tritirachium album</i></p>
	<p>LYS 2 (Bufor do lizy 2 do systemu cobas® 4800) 43% (udział wagowy) tiocyjanian guanidyny, 5% (udział wagowo-obj.) polidokanol, 2% (udział wagowo-obj.) ditiotreitrol, dwuwodny cytrynian sodu</p>	10 × 27 ml	 <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H302: Działa szkodliwie po połknięciu. 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. EUH071: Działa żrąco na drogi oddechowe. 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</p>

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

Zestaw	Elementy i składniki odczynników	Ilość na test	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie ^a
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 960 testów (P/N: 06979548190)	<p>P 2 (Proteaza 2 cobas® 4800) Bufor Tris, < 0,05% EDTA, chlorek wapnia, octan wapnia, 8% (udział wagowo-obj.) proteiny</p>	10 × 1,0 ml	 <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. H334: Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. P261: Unikać wdychania mgły lub par. P280: Stosować rękawice ochronne. P284: Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych. P304 + P340: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P342 + P311: W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. 39450-01-6 Proteinaza serynowa, <i>Tritirachium album</i></p>
	<p>LYS 2 (Bufor do lizy 2 do systemu cobas® 4800) 43% (udział wagowy) tiocyjanian guanidyny, 5% (udział wagowo-obj.) polidokanol, 2% (udział wagowo-obj.) ditiotreitol, dwuwodny cytrynian sodu</p>	10 × 84 ml	 <p>NIEBEZPIECZEŃSTWO H302: Działa szkodliwie po połknięciu. 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. EUH071: Działa żrąco na drogi oddechowe. 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</p>

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

Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników

Odczynnik	Temperatura przechowywania	Czas przechowywania
cobas® CMV	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® CMV Control Kit*	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit	15-25°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.
cobas® 4800 System Lysis Kit 2	2–8°C	Zachowuje trwałość do momentu upływu wskazanej daty ważności.

* Zestaw kontroli należy przechowywać w pozycji pionowej

Nie należy zamrażać odczynników.

Wymagane materiały dodatkowe

Materiały	P/N
Płytki do ekstrakcji (z głębokimi dołkami) systemu cobas® 4800 2,0 ml	06884008001
Płytki AD (z mikrodołkami) systemu cobas® 4800 0,3 ml	05232724001
Aplikator folii uszczelniającej	04900383001
Końcówki CORE, 1000 µl, statyw zawierający 96 sztuk	04639642001
Pojemnik na odczynnik 200 ml (Reagent Reservoir)	05232759001
Pojemnik na odczynnik 50 ml (Reagent Reservoir)	05232732001
Nośnik 24-pozycyjny	04639502001
Nośnik 32-pozycyjny	04639529001
Worek na odpady stałe (Solid waste bag)	05530873001 (mały) lub 04691989001 (duży)
Plastikowa zsuwnia Hamilton STAR	04639669001
Rękawice jednorazowe bezpudrowe	Akceptowalne są jakiegokolwiek bezpudrowe rękawice jednorazowe.
Mieszadło wibracyjne (do mieszania jednej próbki)	Akceptowalne jest dowolne mieszadło wibracyjne.
Wirówka laboratoryjna, wyposażona w rotor wychylny o minimalnej wartości RCF równej 1500	Akceptowalna jest dowolna wirówka spełniająca te wymagania.

W celu uzyskania dodatkowych informacji dotyczących materiałów sprzedawanych oddzielnie prosimy o kontakt z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane

Urządzenia i oprogramowanie wymagane, lecz niedostarczane
cobas® 4800 System Aparat cobas® x 480 Analizator cobas® z 480 Jednostka sterująca
Oprogramowanie aplikacyjne (podstawowe) systemu cobas® 4800 w wersji 2.2 lub nowsze
System cobas® 4800 System cobas® CMV AP w wersji 1.2.0 lub nowszy

Uwaga: Szczegółową listę zamówień na statywy na próbki, statywy na końcówki, statywy na odczytniki i nośniki na płytki akceptowane przez urządzenia można uzyskać po skontaktowaniu się z miejscowym przedstawicielstwem firmy Roche.

Obsługiwane próbki na próbki

Test akceptuje powszechnie stosowane pierwotne i wtórne próbki z próbkami.

Obsługiwane są następujące próbki na próbki:

Próbki pierwotne (objętość przetwarzania 400 µl)

Średnica nominalna (mm)	Objętość wejściowa próbki — przetworzona (odwirowana) krew pełna	Probówka z osoczem pobranym na EDTA
11-14	1800 µl lub więcej	Z żelem lub bez żelu
14,5-16	Ponad 4000 µl	Z żelem lub bez żelu

W celu uzyskania informacji na temat zamawiania określonych próbek na próbki oraz minimalnych objętości wejściowych określonych próbek pierwotnych, należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.

Próbki wtórne (objętość przetwarzania 400 µl)

Średnica nominalna (mm)	Objętość wejściowa próbki
11-16	1000 µl lub więcej (określone próbki wtórne mają minimalną objętość wejściową poniżej 1000 µl)

W celu uzyskania informacji na temat zamawiania określonych próbek na próbki oraz minimalnych objętości wejściowych określonych próbek wtórnych, należy skontaktować 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 analityczną niniejszego testu należy przedsięwziąć wyjątkową ostrożność, aby zapobiec zanieczyszczeniu odczynników, próbek oraz mieszanin do amplifikacji.

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Test **cobas**® CMV nie został zaprojektowany jako badanie przesiewowe na obecność wirusa CMV we krwi lub jej produktach.
- 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.^{26, 27} Procedurę tę powinien wykonywać wyłącznie personel biegły w obchodzeniu się z materiałem zakaźnym, użytkowaniu testu **cobas**® CMV i systemu **cobas**® 4800.
- Wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy uważać za potencjalnie zakaźne i postępować z nimi z zastosowaniem ogólnych środków ostrożności. Zestaw **cobas**® CMV Control Kit zawiera osocze pochodzące z krwi ludzkiej. Materiał źródłowy był badany z wykorzystaniem licencjonowanych testów z użyciem przeciwciał i nie wykazywał obecności przeciwciał przeciwko wirusom HCV, HIV-1/2, antygenowi HBsAg ani przeciwciał przeciwko antygenowi HBc. Badanie prawidłowego osocza ludzkiego z użyciem metod PCR również nie wykazało obecności RNA wirusa HIV-1 (grupy M oraz O), RNA wirusa HIV-2, RNA wirusa HCV, DNA wirusa HBV, RNA wirusa HEV, RNA wirusa WNV ani DNA wirusa CMV. Żadna ze znanych metod badania nie może zaoferować całkowitej pewności, że produkty otrzymane z ludzkiej krwi nie będą przenosić czynników zakaźnych.
- Nie wolno narażać odczynnika MGP na działanie źródeł pola magnetycznego.
- **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 eksploatacyjne.
- Karty charakterystyki (ang. Safety Data Sheet, SDS) są dostępne na żądanie w miejscowym 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.
- Zestaw kontroli **cobas**® CMV należy przechowywać w pozycji pionowej.
- Jeżeli w trakcie obchodzenia się z próbkami i ich przygotowywania nie stosuje się odpowiedniej kontroli zanieczyszczenia między próbkami, może dojść do wystąpienia fałszywie dodatnich wyników.
- Dodatkowe ostrzeżenia, środki ostrożności oraz procedury mające na celu zredukowanie ryzyka zakażenia, dotyczące aparatu **cobas**® x 480 lub analizatora **cobas**® z 480 można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800 (znanym wcześniej jako podręcznik systemu). W przypadku podejrzenia wystąpienia zanieczyszczenia należy przeprowadzić czyszczenie oraz konserwację tygodniową zgodnie z opisem zamieszczonym w podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800 System.
- Należy poinformować lokalny właściwy organ o wszelkich poważnych zdarzeniach, które mogą wystąpić podczas stosowania tego testu.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje zamieszczono w części „Pobieranie, transport i przechowywanie próbek”.

Dobra praktyka laboratoryjna

- Nie należy pipetować za pomocą ust.
- Nie wolno jeść, pić ani palić w obszarach roboczych laboratorium.
- Należy dokładnie umyć ręce po zakończeniu pracy z próbkami i odczynnikami z zestawu, a także po zdjęciu rękawic.
- Podczas pracy z jakimikolwiek odczynnikami należy używać osłon na oczy oraz fartuchów laboratoryjnych i rękawic jednorazowych. Należy unikać kontaktu wymienionych materiałów ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, miejsce jego wystąpienia należy natychmiast spłukać dużą ilością wody. Jeżeli nie zostaną podjęte odpowiednie działania lecznicze, może dojść do oparzeń. W razie rozlania przed wytarciem należy rozcieńczyć wodą.
- Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie laboratoryjne powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,5% podchlorynu sodu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej (rozcieńczyć domowy wybielacz w stosunku 1:10). Następnie należy przetrzeć powierzchnię 70% etanolem.
- W laboratorium należy zachowywać spójną temperaturę, która spełnia parametry środowiskowe określone w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System**.

Użytkowanie odczynników

- Aby uniknąć zanieczyszczenia między próbkami lub kontrolami, z wszystkimi odczynnikami, kontrolami i próbkami należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Przed użyciem należy ocenić wzrokowo każdą butelkę odczynnika oraz fiolkę, aby upewnić się, że nie ma żadnych oznak wycieku. W razie wystąpienia wycieku nie wolno używać tego materiału do badania.
- Bufor do lizy 2 do systemu **cobas® 4800** zawiera tiocyjanian 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.
- Test **cobas® CMV** i zestaw **cobas® 4800 Sample Preparation Kit 2** zawierają azydek sodu jako środek konserwujący. 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 buforu do lizy 2 **cobas® 4800** zawierającego tiocyjanian guanidyny, z roztworem podchlorynu sodu (wybielaczem). Połączenie to może skutkować wytworzeniem silnie trującego gazu.

Zanieczyszczenie

- W celu zapobieżenia zanieczyszczeniu konieczne jest noszenie rękawic i ich zmiana pomiędzy pracą z próbkami a odczynnikami testu **cobas® CMV**. Podczas pracy z próbkami i kontrolami należy unikać zanieczyszczenia rękawic. Podczas obchodzenia się z próbkami i zestawem odczynników należy nosić jednorazowe rękawice, fartuchy laboratoryjne oraz osłonę oczu.
- Należy unikać zanieczyszczenia odczynników przez rybonukleazy i mikrobiologicznego.
- Jeżeli w trakcie obchodzenia się z próbkami nie jest możliwa odpowiednia kontrola przeniesienia zanieczyszczenia między próbkami, może dojść do wystąpienia wyników fałszywie dodatnich.

Integralność

- Nie wolno używać zestawów po upływie daty ważności.
- Nie należy poddawać odczynników pulowaniu.
- Nie wolno używać przedmiotów jednorazowego użytku po upływie daty ważności.
- Wszystkie przedmioty jednorazowego użytku są przeznaczone do jednokrotnego użycia. Nie wykorzystywać ponownie.
- Całe wyposażenie powinno być odpowiednio konserwowane, zgodnie z instrukcjami producenta.

Utylizacja

- Test **cobas®** CMV, zestaw **cobas®** 4800 System Sample Preparation Kit 2 zawierają azydek sodu jako środek konserwujący (patrz rozdział „**Ostrzeżenia i środki ostrożności**”). Azydek sodu może reagować z instalacjami wodno-kanalizacyjnymi wykonanymi z ołowiu lub miedzi, tworząc silnie wybuchowe azydki metali. Usuwając roztwory zawierające azydek sodu do zlewów laboratoryjnych, należy przepłukać rury dużą ilością zimnej wody, aby zapobiec nagromadzeniu azydków.
- Należy wyrzucić wszystkie nieużyte odczynniki, postępując zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi i lokalnymi.

Uwaga: Informacje dotyczące usuwania odpadów płynnych zamieszczono w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System.**

Rozlanie płynów i czyszczenie

- Test **cobas®** 4800 Lysis Buffer 2 zawiera tiocyjanian guanidyny. Jeśli płyn zawierający tiocyjanian guanidyny ulegnie rozlaniu, do czyszczenia należy używać odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. Jeśli rozlany płyn zawiera potencjalne czynniki zakaźne, do czyszczenia należy **NAJPIERW** używać detergentu laboratoryjnego i wody, a następnie 0,5% roztworu podchlorynu sodu.
- Jeśli do rozlania płynu dojdzie na powierzchni aparatu **cobas®** x 480, należy postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w podręczniku użytkownika systemu **cobas®** 4800 System w celu przeprowadzenia czyszczenia.
- Do czyszczenia aparatu **cobas®** x 480 lub analizatora **cobas®** z 480 nie wolno używać roztworu podchlorynu sodu (wybielacza). Czyszczenia aparatu **cobas®** x 480 lub analizatora **cobas®** z 480 należy dokonywać zgodnie z procedurami opisanymi w podręczniku użytkownika systemu **cobas®** 4800 System.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

- Wszystkie próbki należy przechowywać w określonych temperaturach.
- Podwyższona temperatura ma wpływ 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 całej objętości próbki na dnie probówki.

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

Pobieranie próbek

Krew należy pobierać do probówek do otrzymywania nierozcieńczonego osocza BD Vacutainer® PPT™ lub probówek z lawendowymi korkami przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant.

Uwaga: Użytkownik musi przestrzegać instrukcji dostarczonych przez producenta probówek podczas przygotowania osocza.

Przechowywanie i trwałość próbek podczas transportu

- Krew pełna pobrana do probówek do przygotowywania osocza BD Vacutainer® PPT™ lub probówek z lawendowymi korkami lub jałowych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej może być przechowywana i/lub transportowana do 36 godzin w temperaturze od 2°C do 25°C przed odwirowaniem i wykonaniem dalszych badań.
- Alternatywnie próbki osocza mogą być przechowywane w probówkach pierwotnych przez maksymalnie 36 godzin w temperaturze od 2°C do 25°C lub przez 6 dni w temperaturze od 2°C do 8°C.
- Próbki osocza mogą być przechowywane w probówkach wtórnych do 36 godzin w temperaturze od 2°C do 30°C, do 6 dni w temperaturze od 2°C do 8°C lub do 6 tygodni w temperaturze od –15°C do –25°C. Oddzielone próbki osocza w probówkach wtórnych są stabilne przez trzy cykle zamrażania/odmrażania, gdy są przechowywane w temperaturze od –15°C do –25°C.
- Jeśli próbki mają być przesyłane, należy je opakować i oznaczyć zgodnie z odpowiednimi krajowymi i (lub) międzynarodowymi przepisami dotyczącymi transportu próbek i czynników etiologicznych.

Instrukcja użytkowania

Wykonywanie oznaczenia

Objętość przetwarzania próbki dla testu **cobas®** CMV wynosi 400 µl.

Rysunek 1: Przebieg pracy z użyciem testu **cobas®** CMV

1	Uruchomienie systemu.
2	Wykonanie czynności konserwacyjnych aparatów.
3	Wyjęcie próbek i odczynników z miejsca przechowywania.
4	Rozpoczęcie przebiegu
5	Skanowanie kart z parametrami
6	Załadowanie próbek
7	W przypadku korzystania z systemu LIS: potwierdzenie zlecenia pracy. W przypadku braku systemu LIS: utworzenie zlecenia pracy.
8	Załadowanie materiałów eksploatacyjnych (płytki głębokodołkowej, płytki mikrodołkowej, statywów na końcówki)
9	Załadowanie odczynników
10	Rozpoczęcie przebiegu przygotowania próbek.
11	Wyjęcie i uszczelnienie płytki mikrodołkowej.
12	Umieszczenie płytki mikrodołkowej w analizatorze.
13	Wyjęcie próbek, zużytych odczynników i płytki głębokodołkowej.
14	Przeanalizowanie wyników.
15	W przypadku korzystania z systemu LIS: przesłanie wyników do systemu LIS.
16	Wyjęcie płytki z analizatora.

Uwaga: Szczegółowe instrukcje obsługi można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas® 4800 System**.

Wielkość przebiegu

Ogólne zestawy odczynników do przygotowywania próbek (**cobas®** 4800 System Sample Preparation Kit 2, **cobas®** 4800 System Lysis Kit 2 oraz **cobas®** 4800 System Wash Buffer Kit) są dostępne w dwóch wielkościach, z których każda wystarcza na 10 przebiegów zawierających do 24 lub 96 próbek włączając kontrole i próbki do oznaczania. Test **cobas®** CMV jest dostępny w jednym rozmiarze zestawu, który wystarcza do zbadania 120 (10×12) próbek, włączając kontrole i próbki. Test **cobas®** CMV Control Kit jest dostępny w jednym rozmiarze zestawu, który może zostać wykorzystany we wszystkich konfiguracjach przebiegu. W każdej partii testowej musi być użyta jedna CMV Low Positive Control, jedna CMV High Positive Control oraz jedna Negative Control. W przypadku przebiegu z jednym testem maksymalna dopuszczalna liczba próbek to 93 próbki pacjentów i 3 kontrole.

Rysunek 1 przedstawia podsumowanie tej procedury.

Uwaga: W celu optymalnego użycia odczynników ogólne zestawy odczynników do przygotowywania próbek mogą być używane dla przebiegów zawierających łącznie 1–21 próbek (zestaw testowy 10×24) lub łącznie 1–93 próbek (zestaw testowy 10×96). Jednak nie można łączyć ze sobą różnych wielkości zestawu cobas® 4800 System Wash Buffer Kit, cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 i cobas® 4800 System Lysis Kit 2. Przykładowo, jeśli na początku przebiegu skanowana jest butelka z odczynnikiem Wash Buffer z zestawu 96 testów, należy użyć odczynników z pozostałych zestawów do przygotowywania próbek również o rozmiarze 96 testów.

Przebieg pracy

Test cobas® CMV to oznaczenie prowadzone z wykorzystaniem przebiegu pracy Full Workflow w ramach oprogramowania cobas® 4800. Obejmuje on przygotowanie próbek w aparacie cobas® x 480 oraz amplifikację/detekcję w analizatorze cobas® z 480. cobas® CMV można przeprowadzać pojedynczo lub w partiach mieszanych z testami, które mają wspólny taki sam zautomatyzowany proces ekstrakcji próbki oraz profil PCR do amplifikacji i detekcji. Na etapie wyboru oprogramowanie wyświetli testy, które są zgodne z testem cobas® CMV dla trybu partii mieszanej. Szczegóły można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800 System.

1. Uruchom system postępując zgodnie z instrukcjami opisanymi w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800 System.
2. Wykonaj czynności konserwacyjne, postępując zgodnie z instrukcjami opisanymi w podręczniku użytkownika systemu cobas® 4800 System.
3. Zgromadź wszystkie wymagane odczynniki i materiały eksploatacyjne. Wszystkie odczynniki, oprócz odczynników CMV MMX R2 i MMX R1, przed załadowaniem do aparatu cobas® x 480 muszą znajdować się w temperaturze pokojowej. Odczynniki CMV MMX R2 i MMX R1 można umieszczać w aparacie bezpośrednio z temperatury przechowywania 2–8°C, ponieważ ich temperatura zostanie wyrównana do temperatury otoczenia wewnątrz aparatu cobas® x 480 do momentu ich wykorzystania w procesie.

Uwaga: Wszystkie odczynniki i pojemniki na odczynniki są opatrzone kodem kreskowym i są przeznaczone do jednokrotnego użycia. Oprogramowanie cobas® 4800 śledzi użycie odczynników oraz pojemników na odczynniki i odrzuca wcześniej używane odczynniki lub pojemniki na odczynniki.

4. Rozpocznij nowy przebieg i wybierz jako rodzaj przebiegu pracy CMV. Aby przeprowadzić serię partii mieszanej, wybierz inne rodzaje odpowiednich przebiegów pracy (tj. HIV-1, HCV lub HCV GT) oprócz CMV.
5. Należy postępować zgodnie z przewodnikiem kreatora oprogramowania i zeskanować kod kreskowy na kartach parametrów zakresów kontroli i współczynników kalibracji.

Uwaga: Zeskanuj karty parametrów z nieprzetworzonych odczynników. Oprogramowanie nie sprawdza dat ważności odczynników na kartach parametrów. Przed zeskanowaniem odpowiedniego ID kodu kreskowego sprawdź datę ważności wydrukowaną na karcie parametrów lub zestawach odczynników.

6. Załaduj próbki. Można ładować pierwotne lub wtórne próbki na próbki, a minimalna objętość próbki zależy od rodzaju i wielkości próbki.

7. Utwórz zlecenie pracy. Zlecenie pracy można utworzyć na trzy sposoby:

- Korzystając z edytora próbki przed umieszczeniem dowolnego statywu z próbkami w aparacie **cobas®** x 480 (przycisk „Editor” po prawej stronie menu głównego). Zlecenia pracy można zapisać, edytować i wczytać ponownie w razie potrzeby. Podczas wybierania żądanych wyników należy zaznaczyć opcję „CMV”.
- Przez skorzystanie z kreatora oprogramowania dla nowego przebiegu i umieszczenie próbek w aparacie **cobas®** x 480 po wyświetleniu takiego polecenia. Kody kreskowe próbek zostaną automatycznie zeskanowane i konieczne będzie zdefiniowane żądanych wyników dla każdej próbki. Podczas wybierania żądanych wyników należy zaznaczyć opcję „CMV”.
- Przez skorzystanie z systemu LIS placówki.

Dodatkowe szczegóły można znaleźć w podręczniku użytkownika systemu **cobas®** 4800 System. Załaduj próbki i zdefiniuj/wyberz zlecenie pracy lub skorzystaj z systemu LIS, zależnie od tego, co będzie właściwe.

8. Załaduj materiały eksploatacyjne zgodnie z instrukcjami kreatora oprogramowania. Nie należy umieszczać pojedynczych końcówek ani ich wyjmować z częściowo wykorzystanego statywu, gdyż oprogramowanie śledzi liczbę pozostałych końcówek. Jeśli liczba końcówek będzie niewystarczająca do przeprowadzenia przebiegu, oprogramowanie poinformuje o tym fakcie użytkownika.

9. Załaduj odczynniki.

Załaduj odczynniki do przygotowywania próbek do pojemników na odczynniki opatrzone kodem kreskowym. Pojemniki na odczynniki są dostępne w dwóch rozmiarach: 200 ml i 50 ml. Postępuj zgodnie ze wskazówkami kreatora oprogramowania w celu wybrania pojemnika na odczynniki odpowiednich rozmiarów. Kody kreskowe pojemnika na odczynniki muszą znajdować się po prawej stronie nośnika. Załaduj odczynniki do przygotowywania próbek, stosując metodę „zeskanuj, zeskanuj, przelej, umieść”:

- Zeskanuj kod kreskowy butelki odczynnika.
- Zeskanuj kod kreskowy pojemnika na odczynniki.
- Przelej odczynnik do pojemnika.
- Umieść wypełniony pojemnik na odczynnik w przypisanej mu pozycji w nośniku na odczynniki.

Uwaga: System cobas® 4800 ma wewnętrzny zegar, kontrolujący czas, przez jaki odczynniki znajdują się w systemie. Od momentu zeskanowania LYS 2 lub WB w ciągu 1 godziny należy zakończyć proces ładowania i kliknąć przycisk Start. Na zakładce „Workplace” wyświetlany jest zegar odliczający czas. System nie zezwoli na rozpoczęcie przebiegu, jeżeli czas wyświetlany przez zegar aparatu upłynął.

Uwaga: Aby zapewnić właściwe przeniesienie odczynnika MGP, zworteksuj lub energicznie wstrząśnij fiolkę odczynnika MGP bezpośrednio przed umieszczeniem jej w pojemniku na odczynniki.

10. Umieść fiołki odczynników do amplifikacji/detekcji (CMV MMX R2, MMX R1 i DNA QS), fiołki kontroli [CMV L(+), CMV H(+), C i (-)C] oraz fiołki z odczynnikiem ogólnymi (P2 zgodnie z wymogami) bezpośrednio w statywie na odczynniki.

Uwaga: W celu zapobiegania niepotrzebnym przerwaniom przebiegu i skażeniom należy strząsnąć fiołki z odczynnikiem, aby zapobiec powstawaniu pęcherzyków/warstwy płynu. Kontrole należy otwierać zaczynając od tych najbliższych użytkownika (od pozycji 24 do 1). Zmieniać rękawice po pracy z kontrolami dodatkimi.

11. Rozpocznij przebieg przygotowania próbek. Po pomyślnym przebiegu przygotowania próbek przyciski „Sample Preparation results” oraz „Unload” staną się dostępne. W razie potrzeby wybierz przycisk „Sample Preparation results” w celu przeanalizowania wyników, a następnie wybierz przycisk „Unload”, aby wyładować nośniki na płytce. Można również wybrać przycisk „Unload” w celu wyładowania nośnika na płytce bez przeglądania wyników. Patrz podręcznik użytkownika systemu **cobas®** 4800 System.
12. Po rozładowaniu płytki mikrodołkowej, należy postępować zgodnie z instrukcjami w podręczniku użytkownika systemu **cobas®** 4800 System dotyczącymi uszczelniania i przenoszenia płytki do analizatora **cobas®** z 480.
13. Załaduj płytkę mikrodołkową do analizatora i rozpocznij przebieg amplifikacji i detekcji zgodnie z instrukcją w podręczniku użytkownika systemu **cobas®** 4800 System.

Uwaga: System cobas® 4800 ma wewnętrzny zegar, kontrolujący czas, jaki upływa od momentu dodania przygotowanych próbek do aktywowanego odczynnika Master Mix. Amplifikację i detekcję należy rozpocząć jak najszybciej, jednak nie później niż 40 minut od zakończenia przebiegu w aparacie cobas® x 480. Na zakładce „Workplace” wyświetlany jest zegar odliczający czas. System przerwie przebieg, jeżeli ten czas zostanie przekroczony.

14. Wyjmij próbki, zużyte odczynniki i płytkę głębokodołkową zgodnie z instrukcjami w podręczniku użytkownika systemu **cobas®** 4800 System.
15. Po zakończeniu przebiegu amplifikacji i detekcji należy wykonywać instrukcje w podręczniku użytkownika systemu **cobas®** 4800 System dotyczące przeglądania i akceptowania wyników.
16. W przypadku pracy z systemem LIS, wyślij wyniki do systemu LIS.
17. Wykonuj instrukcje w podręczniku użytkownika systemu **cobas®** 4800 System dotyczące wyładowywania płytki mikrodołkowej z analizatora **cobas®** z 480.

Wyniki

System **cobas**® 4800 automatycznie określa poziom DNA CMV w próbkach i kontrolach. Stężenie DNA CMV wyraża się w jednostkach międzynarodowych IU (International Units) na mililitr (IU/ml).

Kontrola jakości i ważność wyników

- W każdej partii przetwarzana jest jedna ujemna kontrola (–) C2 i dwie kontrole dodatnie: kontrola nisko dodatnia CMV L(+)_C oraz kontrola wysoko dodatnia CMV H(+)_C.
- Sprawdź ważność partii w oprogramowaniu **cobas**® 4800 i (lub) raporcie.
- Wyniki są unieważniane automatycznie przez oprogramowanie **cobas**® 4800 na podstawie uzyskania niepomysłnych wyników kontroli ujemnej i kontroli dodatniej.

Interpretacja wyników kontroli

Tabela 1: Interpretacja wyników kontroli dla kontroli ujemnych i dodatnich

Kontrola ujemna	Wynik	Interpretacja
(–)C2	Target Not Detected	Kontrola jest ważna. Nie wykryto DNA CMV.
	Invalid	Wynik oznaczony jako nieważny lub wynik obliczonego miana kontroli ujemnej nie jest wynikiem ujemnym.
Kontrola dodatnia	Wynik	Interpretacja
CMV L(+) _C	Miano	Kontrola jest ważna. Obliczone miano jest w zakresie kontroli.
	Invalid	Wynik oznaczony jako nieważny lub obliczone miano dla kontroli nisko dodatniej nie mieści się w określonym zakresie.
CMV H(+) _C	Miano	Kontrola jest ważna. Obliczone miano jest w zakresie kontroli.
	Invalid	Wynik oznaczony jako nieważny lub obliczone miano dla kontroli wysoko dodatniej nie mieści się w określonym zakresie.

Interpretacja wyników

Uwaga: Cały proces walidacji testu i partii jest realizowany przez oprogramowanie cobas® 4800.

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

W przypadku ważnej partii wyniki badania próbek interpretuje się w sposób, który przedstawia Tabela 2.

Tabela 2: Interpretacja wyników dla poszczególnych materiałów docelowych

cobas® CMV	Raport wyniku i jego interpretacja
Target Not Detected	Nie wykryto DNA CMV. Podać wynik jako „Nie wykryto CMV”.
< Titer Min	Obliczone miano jest niższe od dolnej granicy oznaczalności testu (LLOQ). Podać wynik jako „Wykryto CMV, miano poniżej (miano min.)”. Miano min. = 3,45E+01 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) CMV”.
> Titer Max ^a	Obliczone miano jest wyższe od górnej granicy oznaczalności testu (ULOQ). Podać wynik jako „Wykryto CMV, miano powyżej (miano maks.)”. Miano min. = 1,00E+07 IU/ml

^a Wynik próbki > Titer Max odnosi się do CMV dodatnich próbek z mianami powyżej górnej granicy liniowości testu (ULOQ). Jeśli potrzebny jest wynik ilościowy, oryginalną próbkę należy rozcieńczyć CMV-ujemnym ludzkim osoczem pobranym na EDTA, w zależności od typu oryginalnej próbki, a następnie powtórzyć test. Otrzymany wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia.

Lista flag

Tabela poniżej wymienia wszystkie flagi dotyczące interpretacji wyniku.

Tabela 3: Lista flag

Kod flagi	Opis	Zalecane działanie
R4800	Wartość docelowa jest nieważna z powodu niepowodzenia obliczeń.	Wartość docelowa jest nieważna z powodu niepowodzenia obliczeń. 1. Ponownie oznacz próbkę. 2. Jeżeli problem powtarza się, skontaktuj się z serwisem firmy Roche.
R4801	Standard ilościowy jest nieważny.	Standard ilościowy jest nieważny dla próbki. 1. Ponownie oznacz próbkę. 2. Jeżeli problem powtarza się, skontaktuj się z serwisem firmy Roche.
R4802	Kontrola zewnętrzna jest nieważna.	Kontrola zewnętrzna jest nieważna. ^a 1. Powtórz cały przebieg ze świeżymi odczynnikami. 2. Jeżeli problem powtarza się, skontaktuj się z serwisem firmy Roche.
R4803	Standard ilościowy jest nieważny.	Standard ilościowy jest nieważny dla kontroli zewnętrznej. 1. Powtórz cały przebieg ze świeżymi odczynnikami. 2. Jeżeli problem powtarza się, skontaktuj się z serwisem firmy Roche.
R4804	Kontrola zewnętrzna jest poza zakresem.	Kontrola zewnętrzna jest poza zakresem. ^b 1. Powtórz cały przebieg ze świeżymi odczynnikami. 2. Jeżeli problem powtarza się, skontaktuj się z serwisem firmy Roche.
X3	Błąd: Wykryto skrzep. Próbka nie została przetworzona.	Upewnij się, że próbki obsługiwano zgodnie z opisem przebiegu pracy. 1. Sprawdź próbkę pod kątem skrzepów. 2. Ponownie oznacz próbkę.
X4	Błąd: Wystąpił błąd pipetowania. Próbka nie została przetworzona.	Najbardziej prawdopodobną przyczyną jest niewystarczająca objętość próbki lub błąd mechaniczny podczas pipetowania. 1. Upewnij się, że jest dostępna wystarczająca objętość próbki. 2. Sprawdź, czy płytka zrzucająca końcówkę jest umieszczona prawidłowo. 3. Ponownie oznacz próbkę.

^a Jest to flaga próbki, która występuje, gdy kontrola zewnętrzna w przebiegu jest nieważna.

^b Jest to flaga obejmująca wszystkie scenariusze, w których kontrola zewnętrzna jest nieważna (wartość docelowa lub miano).

Uwaga: Opisy pozostałych flag systemowych — patrz podręcznik użytkownika systemu cobas® 4800 System.

Ograniczenia metody

1. Test **cobas**® CMV był oceniany tylko w połączeniu z zestawami **cobas**® CMV Control Kit, **cobas**® 4800 System Sample Preparation Kit 2, **cobas**® 4800 System Lysis Kit 2 i **cobas**® 4800 System Wash Buffer Kit.
2. Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od właściwego pobrania próbki, transportu, przechowywania oraz przetwarzania. Należy postępować zgodnie z procedurami opisanymi w niniejszej instrukcji (określonej również mianem ulotki dołączonej do opakowania) oraz w podręczniku użytkownika systemu **cobas**® 4800 System.
3. Ten test został zatwierdzony wyłącznie do badania osocza EDTA. Badanie innych rodzajów próbek może dawać nieprawidłowe wyniki.
4. Oznaczenie ilościowe DNA wirusa CMV zależy od liczby cząstek wirusa obecnych w próbce i mogą na nie mieć wpływ: metoda pobrania próbki, czynniki zależne od pacjenta (tj. wiek, obecność objawów) i (lub) stadium zakażenia.
5. Mutacje w obrębie wysoko konserwatywnych regionów genomu wirusowego, z którymi wiążą się startery i (lub) sondy używane w teście **cobas**® CMV — chociaż rzadkie — mogą wpływać na wiązanie starterów i (lub) sond oraz spowodować zaniżenie miana lub niewykrycie wirusa.
6. Wartość predykcyjna oznaczenia zależy do częstości występowania choroby w danej populacji.
7. Dodanie do odczynnika Master Mix **cobas**® CMV enzymu AmpErase umożliwia selektywną amplifikację docelowego kwasu dezoksyrybonukleinowego; jednak aby uniknąć zanieczyszczenia odczynników i mieszanin amplifikacyjnych, konieczne jest stosowanie dobrej praktyki laboratoryjnej i dokładne przestrzeganie procedur wyszczególnionych w niniejszej instrukcji.
8. Tego produktu mogą używać wyłącznie osoby przeszkolone w zakresie technik PCR i używania systemu **cobas**® 4800 System.
9. Zatwierdzono użycie tego produktu tylko z aparatem **cobas**® x 480 i analizatorem **cobas**® z 480. Z tym produktem nie można stosować żadnych innych urządzeń do przygotowania próbek ani systemów do PCR.
10. Z uwagi na różnice między technologiami zaleca się, aby przed zmianą stosowanych metod użytkownik przeprowadził w laboratorium badania korelacji stosowanych metod w celu określenia występujących między nimi różnic jakościowych. Użytkownicy powinni postępować zgodnie z własnymi określonymi zasadami/procedurami.
11. Zanieczyszczenie krzyżowe próbek może spowodować wyniki fałszywie dodatnie. Częstość zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami testu **cobas**® CMV została określona w badaniach nieklinicznych na poziomie 0,0%. Nie zaobserwowano zanieczyszczenia krzyżowego pomiędzy przebiegami.
12. Test **cobas**® CMV nie jest przeznaczony do przesiewowego badania na obecność wirusa CMV we krwi lub produktach krwiopochodnych ani do stosowania jako test diagnostyczny, potwierdzający zakażenie wirusem CMV.

Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych

Najważniejsze parametry działania testu

Granica wykrywalności (LoD)

Granica wykrywalności (LOD) testu **cobas**® CMV została określona dzięki analizie seryjnych rozcieńczeń międzynarodowego wzorca WHO (szczep Merlin, genotyp 1 glikoproteiny B) i zweryfikowana dla genotypów gB-2, gB-3 i gB-4 glikoproteiny B oraz lekoopornych próbek CMV. Deklarowana wartość LoD dla próbek osocza EDTA wynosi 34,5 IU/ml.

Międzynarodowy standard WHO

Granice wykrywalności testu **cobas**® CMV określono dzięki analizie seryjnych rozcieńczeń 1. międzynarodowego wzorca WHO dla DNA ludzkiego cytomegalowirusa do testów wykonywanych techniką amplifikacji kwasu nukleinowego (1. międzynarodowy wzorec WHO HCMV²⁸) uzyskanego z NIBSC, w ludzkim osoczu EDTA ujemnym pod względem CMV. Panel składający się z siedmiu poziomów stężeń i próbki ślepej był testowany na trzech seriach odczynników testu **cobas**® CMV, wielu przebiegach, dniach, operatorach i aparatach.

Wyniki przedstawia Tabela 4. Badanie wykazuje, że test **cobas**® CMV wykrywa DNA CMV przy stężeniu 20,5 IU/ml z odsetkiem trafień $\geq 95\%$ wg PROBIT.

Tabela 4: Granica wykrywalności

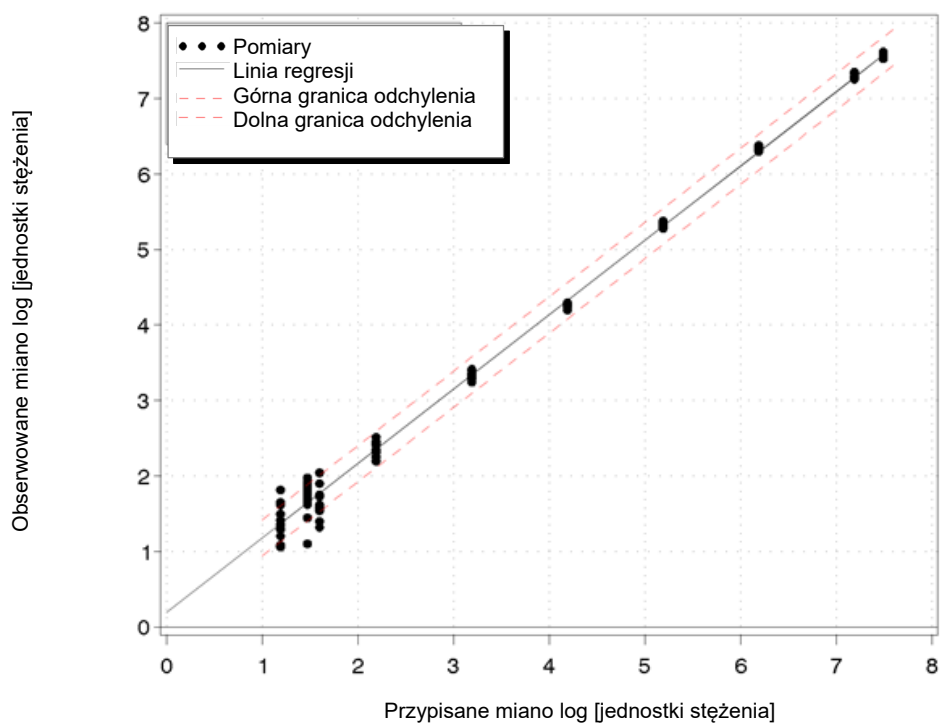
Stężenie wejściowe (DNA CMV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %
60,0	126	126	100,0
46,0	126	126	100,0
34,5	124	124	100,0
23,0	126	122	96,8
15,0	126	111	88,1
10,0	126	97	77,0
5,0	126	63	50,0
0,0	72	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafień	20,5 IU/ml (95% CI: 16,9–23,3 IU/ml)		

Zakres liniowości

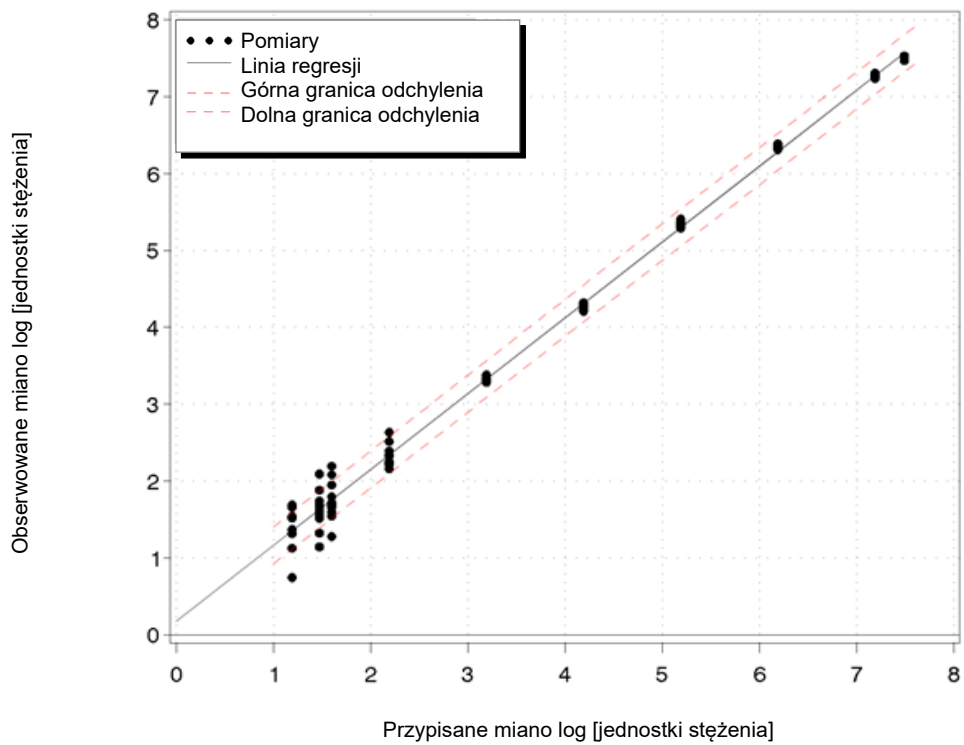
Liniowość testu **cobas**® CMV oceniono wykorzystując rozcieńczenia seryjne zawierające 10 członków panelu ze stężeniami DNA genotypu gB-1 CMV pokrywającymi zakres liniowy testu (od 1,55E+01 do 3,11E+07 IU/ml). Zastosowano dwie serie odczynników testu **cobas**® CMV i każdy członek panelu testowano w 12 powtórzeniach na serię, a wyniki badania przedstawiają Rysunek 2 i Rysunek 3 dla wyników reprezentatywnych.

Dane wykazują zachowanie liniowe od 1,55E+01 do 3,11E+07 IU/ml. Deklarowany zakres liniowy dla testu **cobas**® CMV wynosi od 34,5 do 1,0E+07 IU/ml

Rysunek 2: Liniowość serii 1



Rysunek 3: Liniowość serii 2



Dokładność wewnątrz laboratorium

Precyzję testu **cobas**® CMV określono dzięki analizie rozcieńczeń seryjnych DNA genotypu gB-1 CMV. Sześć poziomów rozcieńczeń zbadano w 90 powtórzeniach dla każdego poziomu w trzech seriach odczynników testu **cobas**® CMV przy użyciu dwóch urządzeń oraz czterech operatorów przez 15 dni. Każda próbka przechodziła całą procedurę testu **cobas**® CMV na systemie **cobas**® 4800. Dlatego podana dokładność odzwierciedla wszystkie aspekty procedury badawczej. Wyniki przedstawia Tabela 5.

Test **cobas**® CMV wykazywał wysoką precyzję dla trzech serii odczynników badanych w zakresie stężeń od 3,90E+01 IU/ml do 1,52E+06 IU/ml.

Tabela 5: Wewnątrzlaboratoryjna precyzja testu **cobas**® CMV*

Stężenie nominalne (IU/ml)	Stężenie przypisane (IU/ml)	Seria nr 1	Seria nr 2	Seria nr 3	Wszystkie serie
		SD	SD	SD	Pulowane SD
1,80E+06	1,55E+06	0,04	0,04	0,04	0,04
1,80E+05	1,55E+05	0,05	0,03	0,05	0,04
1,80E+04	1,55E+04	0,06	0,04	0,06	0,05
1,80E+03	1,55E+03	0,06	0,05	0,04	0,05
1,80E+02	1,55E+02	0,13	0,10	0,13	0,12
4,60E+01	3,97E+01	0,17	0,15	0,24	0,19

* Uważa się, iż wartości miana mają charakter rozkładu logarytmiczno-normalnego i są analizowane po zamianie na \log_{10} . Kolumny odchylenia standardowego (SD) przedstawiają całkowite przekształcone logarytmicznie miano dla każdej z trzech serii odczynników.

Weryfikacja genotypu

Wydajność testu **cobas**® CMV na genotypach CMV oceniano na podstawie:

- Weryfikacji granicy wykrywalności dla genotypów od 2 do 4 glikoproteiny B
- Weryfikacji zakresu liniowego dla genotypów od 2 do 4

Weryfikacja granicy wykrywalności dla genotypów gB-2, gB-3 i gB-4 glikoproteiny B

Supernatanty hodowli komórkowych CMV dla dwóch różnych (gB-2 i gB-3) genotypów i plazmidu DNA CMV genotypu 4 (gB-4) glikoproteiny B rozcieńczono w osoczu EDTA ujemnym pod względem CMV. Określenie odsetka trafień przeprowadzono w 42 powtórzeniach przy jednym poziomie stężenia. Badanie przeprowadzono z jedną serią odczynników **cobas**® CMV. Wyniki przedstawia Tabela 6. Wyniki te weryfikują, że test **cobas**® CMV wykrył DNA CMV dla trzech różnych genotypów przy stężeniach 34,5 IU/ml z odsetkiem trafień wynoszącym $\geq 95\%$.

Tabela 6: Weryfikacja LoD genotypów gB-2, gB-3 i gB-4 glikoproteiny B CMV

Genotyp glikoproteiny B	Odsetek trafień przy stężeniu 34,5 IU/ml
gB-2	100,0%
gB-3	100,0%
gB-4	100,0%

Weryfikacji zakresu liniowego dla genotypów gB-2, gB-3 i gB-4 glikoproteiny B

Serie rozcieńczeń stosowane w celu zweryfikowania zakresu liniowego (określone z genotypem 1 glikoproteiny B CMV) dla wszystkich deklarowanych genotypów (gB2, gB3 i gB4) glikoproteiny B CMV zawierają siedem członków panelu obejmujących docelowy zakres liniowy. Badanie przeprowadzono z jedną serią odczynnika **cobas**® CMV; zbadano 12 powtórzeń na poziom w osoczu EDTA.

Zakres liniowy testu **cobas**® CMV zweryfikowano dla wszystkich trzech genotypów (gB-2, gB-3 i gB-4). Maksymalne odchylenie między regresją liniową oraz lepiej pasującą regresją nieliniową było równe lub mniejsze niż $0,06 \log_{10}$.

Weryfikacja próbki lekoopornego CMV

Wydajność testu **cobas**® CMV na próbkach lekoopornego CMV oceniano na podstawie:

- Weryfikacji granicy wykrywalności próbek lekoopornego CMV (opornego na gancyklowir, walgancyklowir, cidofowir lub foskarnet)
- Weryfikacji zakresu liniowego próbek lekoopornego CMV (opornego na gancyklowir, walgancyklowir, cidofowir lub foskarnet)

Weryfikacja granicy wykrywalności próbek lekoopornego CMV (opornego na foskarnet lub gancyklowir, walgancyklowir i cidofowir)

Supernatanty hodowli komórkowej CMV dla dwóch różnych próbek lekoopornego CMV (opornego na foskarnet lub gancyklowir, walgancyklowir i cidofowir) rozcieńczono w osoczu EDTA ujemnym pod względem CMV. Określenie odsetka trafień przeprowadzono w 42 powtórzeniach dla jednego poziomu stężenia. Badanie przeprowadzono z jedną serią odczynników **cobas**® CMV. Wyniki przedstawia Tabela 7. Wyniki te weryfikują, że test **cobas**® CMV wykrył DNA CMV dla wszystkich badanych próbek opornych na popularne leki przeciwko wirusowi CMV przy stężeniach 34,5 IU/ml z odsetkiem trafień wynoszącym $\geq 95\%$.

Tabela 7: Weryfikacja LOD CMV dla próbek lekoopornych

Fenotyp oporności	Odsetek trafień przy stężeniu 34,5 IU/ml
Foskarnet	100,0%
gancyklowir, walgancyklowir, cidofowir	100,0%

Weryfikacja zakresu liniowego próbek lekoopornego CMV (opornego na foskarnet lub gancyklowir, walgancyklowir i cidofowir)

Serie rozcieńczeń stosowane w celu zweryfikowania zakresu liniowego (określone z genotypem 1 glikoproteiny B CMV) na próbkach opornych na popularne leki przeciwko CMV zawierają siedem członków panelu obejmujących docelowy zakres liniowy. Badanie przeprowadzono z jedną serią odczynnika **cobas**® CMV; zbadano 12 powtórzeń na poziom w osoczu EDTA.

Zakres liniowy testu **cobas**® CMV zweryfikowano dla wszystkich badanych próbek opornych na popularne leki przeciwko CMV. W przypadku obu badanych próbek lekoopornych, najlepszym modelem dopasowania była regresja liniowa.

Swoistość analityczna

Swoistość analityczna testu **cobas**® CMV była oceniana w panelu rozcieńczeń patogenów (Tabela 8) w dodatnim pod względem DNA CMV i ujemnym pod względem DNA CMV osoczu pobranym na EDTA. Patogeny dodawano do ujemnego osocza z EDTA i testowano je z i bez DNA CMV. W teście **cobas**® CMV wyniki ujemne uzyskano dla wszystkich próbek patogenów bez docelowego CMV, a wyniki dodatnie uzyskano dla wszystkich próbek patogenów z docelowym CMV. Ponadto średni \log_{10} miana każdej próbki dodatniej pod względem CMV zawierającej potencjalnie reagujący krzyżowo mikroorganizm mieścił się w granicach $\pm 0,10 \log_{10}$ średniego \log_{10} miana odpowiedniej dodanej dodatniej kontroli.

Tabela 8: Patogeny testowane pod kątem reakcji krzyżowej

Wirusy	Bakterie	Grzyby
Wirus Epsteina-Barra (EBV)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Ludzki wirus upośledzenia odporności typu 1 (HIV-1)	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Ludzki wirus upośledzenia odporności typu 2 (HIV-2)	<i>Enterococcus faecalis</i>	
Wirus opryszczki pospolitej typu 1 (HSV-1)	<i>Escherichia coli</i>	
Wirus opryszczki pospolitej typu 2 (HSV-2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Ludzki wirus opryszczki typu 6 (HHV-6)	<i>Salmonella typhimurium</i>	
Ludzki wirus opryszczki typu 7 (HHV-7)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
Ludzki wirus opryszczki typu 8 (HHV-8)	<i>Chlamydia trachomatis</i>	
Adenowirus typ 5	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Wirus JC	<i>Propionibacterium acnes</i>	
Parwowirus B19	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Poliomawirus BK	<i>Mycobacterium avium</i>	
Wirus ospy wietrznej–półpaśca (VZV)	<i>Clostridium perfringens</i>	
Ludzki wirus brodawczaka (HPV)		

Swoistość analityczna — substancje wpływające na wynik testu

Podwyższone poziomy trójglicerydów (33,0 g/l), sprzężonej bilirubiny (0,2 g/l), niesprężonej bilirubiny (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 CMV.

Testowane substancje nie zakłócały działania testu **cobas**® CMV. Ponadto badano test w obecności markerów immunologicznych tocznia rumieniowatego układowego (SLE), reumatoidalnego zapalenia stawów (RA) oraz obecności przeciwciał przeciwjądrowych (ANA).

Dodatkowo składniki leków (patrz Tabela 9) badano w trzykrotnym C_{max} z i bez DNA CMV.

Żadna z potencjalnie zakłócających substancji nie wykazywała interferencji z testem. W teście **cobas**® CMV wyniki ujemne uzyskano dla wszystkich próbek bez docelowego CMV, a wyniki dodatnie uzyskano dla wszystkich próbek z docelowym CMV. Ponadto średni \log_{10} miana każdej próbki dodatniej pod względem CMV zawierającej potencjalnie interferujące substancje mieścił się w granicach $\pm 0,36 \log_{10}$ średniego \log_{10} miana odpowiedniej dodanej dodatniej kontroli.

Tabela 9: Składniki leków badane pod kątem interferencji z ilościowym oznaczeniem DNA CMV w teście **cobas**® CMV

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

Błąd całego systemu

Częstotliwość błędu całego systemu dla testu **cobas**® CMV określono badając 100 powtórzeń osocza EDTA z dodanym docelowym CMV. Próbkę te były testowane przy stężeniu docelowym wynoszącym około $3 \times LLoQ$ (104 IU/ml).

Wyniki tego badania wykazały, że we wszystkich powtórzeniach stwierdzono ważność i reaktywność względem CMV, co dało częstość występowania błędu systemowego na poziomie 0,0%. Dolna granica dwustronnego 95% dokładnego przedziału ufności wyniosła 0,0%, a górna 3,6% [0,0%: 3,6%].

Zanieczyszczenie pomiędzy próbkami

Częstość występowania zanieczyszczenia pomiędzy próbkami w teście **cobas**® CMV określono przez oznaczenie 230 powtórzeń próbek CMV-ujemnego osocza z EDTA i 233 powtórzeń próbek wysokiego miana CMV na poziomie $1,55E+07$ IU/ml. Łącznie wykonano pięć przebiegów z użyciem próbek dodatnich i ujemnych w układzie naprzemiennym.

Wszystkie 230 powtórzeń ujemnych próbek było ważnych i dało wynik ujemny, z czego wynikała częstość skażenia wynosząca 0,0% z jednostronnym 95% przedziałem ufności wynoszącym 1,3%.

Ocena klinicznej wiarygodności testu

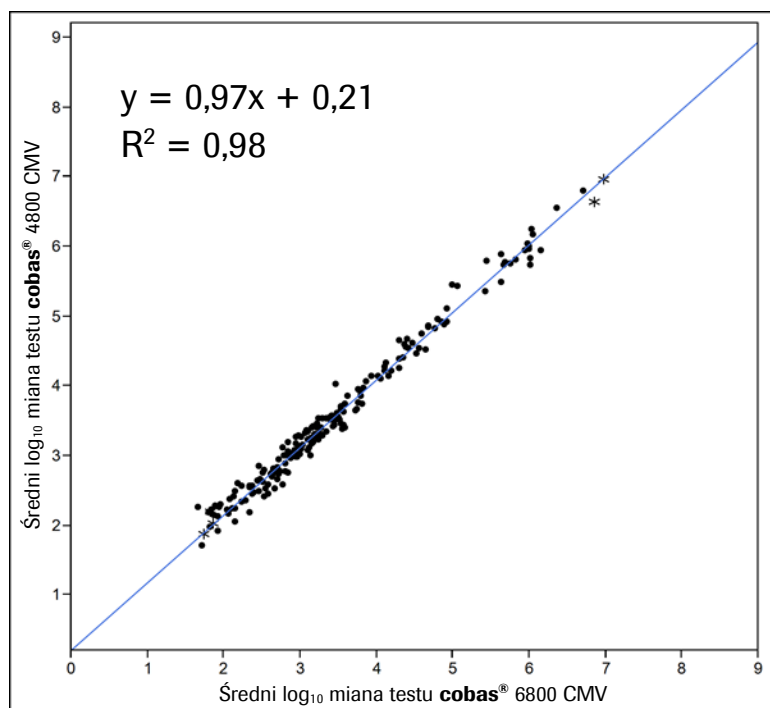
Korelacja metody

Ocena wiarygodności testu cobas® CMV do stosowania w systemie cobas® 4800 w porównaniu do testu cobas® CMV do stosowania w systemach cobas® 6800/8800

Wiarygodność testu **cobas**® CMV do stosowania w systemie **cobas**® 4800 i testu **cobas**® CMV do stosowania w systemach **cobas**® 6800/8800 została porównana dzięki analizie próbek osocza EDTA od pacjentów zakażonych wirusem CMV. W sumie 197 próbek osocza pobranego na EDTA dla wszystkich genotypów CMV uzyskało wynik ważny w przeprowadzonej podwójnie analizie i znalazło się w zakresie oznaczalności obu testów. Przeprowadzono analizę regresji Deminga. Średnie odchylenie miana próbek badanych dwoma testami wyniosło 0,11 log₁₀ (95% przedział ufności: 0,09; 0,13).

Rys. 4 zawiera wyniki regresji Deminga. Symbol * na rysunkach oznacza pojedyncze oznaczenie.

Rys. 4: Analiza regresji testu **cobas**® CMV do stosowania w systemie **cobas**® 4800 w porównaniu z testem **cobas**® CMV do stosowania w systemach **cobas**® 6800/8800



Swoistość

Swoistość testu **cobas**® CMV określono na podstawie analizy próbek CMV-ujemnego osocza z krwi pobranej na EDTA od indywidualnych dawców. 611 pojedynczych próbek osocza EDTA zbadano przy użyciu trzech serii odczynników testu **cobas**® CMV. 611 próbek miało wyniki ujemne DNA CMV. W panelu testu swoistość testu **cobas**® CMV wynosiła 100% (dolny jednostronny 95% przedział ufności wynoszący 99,5%).

Dodatkowe informacje


























Najważniejsze cechy oznaczenia

Rodzaj próbki	Osocze pobrane na EDTA
Objętość przetwarzania	400 µl
Czułość analityczna	34,5 IU/ml
Zakres liniowości	34,5 IU/ml – 1,0E+07 IU/ml
Swoistość	100%
Wykrywane genotypy	Genotypy 1–4 glikoproteiny B CMV
Wykryte próbki lekoopornego CMV	Próbki CMV opornego na gancyklowir, walgancyklowir, cidofowir i foskarnet

Oznaczenia

Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

Tabela 10: 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 <i>(Uwaga: pod symbolem może być wskazany właściwy kraj/region.)</i>	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 Arkusze 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
CE 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	 Mężczyzna	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 niejadalny	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.html

Wytwórca i importer

Tabela 11: Wytwórca i importer



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

Wyprodukowano w Stanach Zjednoczonych



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

©2024 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Piśmiennictwo

1. Griffiths PD. Cytomegalovirus. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P, editors. *Principles and Practice of Clinical Virology*. 6th Edition. London: John Wiley and Sons; 2009. pp. 161-197.
2. Mocarski ES, Shenk T, Griffiths P, Pass RF. Cytomegalovirus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields' Virology*. 6th Edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2013. pp.1960-2014.
3. Reeves M, Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. In: Shenk TE, Stinski MF, editors. *Human Cytomegalovirus*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 2008. pp. 2976-314.
4. Jordan MC. Latent infection and the elusive cytomegalovirus. *Rev Infect Dis*. 1983;5:205-15.
5. Drew WL. Other virus infections in AIDS. I. Cytomegalovirus. *Immunol Ser*. 1989;44:507-34.
6. Drew WL. Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 1992;5:204-10.
7. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. *J Infect Dis*. 2002;186:829-33.
8. Humar A, Gregson D, Caliendo AM, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Transplantation*. 1999;68:1305-11.
9. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. The third international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2018;102:900-31.
10. Cope AV, Sabin C, Burroughs A, et al. Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation. *J Infect Dis*. 1997;176:1484-90.
11. Razonable RR, Hayden RT. Clinical utility of viral load in management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:703-27.
12. Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J Clin Virol*. 2008;41:237-41.
13. Salmon-Ceron D, Mazon MC, Chaput S, et al. Plasma cytomegalovirus DNA, pp65 antigenaemia and a low CD4 cell count remain risk factors for cytomegalovirus disease in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2000;14:1041-9.
14. Emery VC, Sabin C, Feinberg JE, et al. Quantitative effects of valgacyclovir on the replication of cytomegalovirus (CMV) in persons with advanced human immunodeficiency virus disease: baseline CMV load dictates time to disease and survival. The AIDS Clinical Trials Group 204/Glaxo Wellcome 123-014 International CMV Prophylaxis Study Group. *J Infect Dis*. 1999;180:695-701.
15. Bowen EF, Sabin CA, Wilson P, et al. Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. *AIDS*. 1997;11:889-93.
16. Jabs DA, Gilpin AM, Min YI, et al. HIV and cytomegalovirus viral load and clinical outcomes in AIDS and cytomegalovirus retinitis patients: Monoclonal Antibody Cytomegalovirus Retinitis Trial. *AIDS*. 2002;16:877-87.
17. Pang XL, Fox JD, Fenton JM, et al. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant*. 2009;9:258-68.

18. Yan SS, Fedorko DP. Recent advances in laboratory diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Clin Appl Immunol Rev.* 2002;2:155-67.
19. Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis.* 2012;54:1793-7.
20. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian Society of Transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant.* 2005;5:218-27.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;10:413-7.
25. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-94.
26. Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Service, National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5th ed. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. Revised Dec 2009; Accessed 10 July 2023. <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF>.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute. M29-A4: Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; approved guideline-Fourth Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. Accessed 10 July 2023. https://clsi.org/media/1459/m29a4_sample.pdf.
28. Fryer JF, Heath AB, Minor PD, Collaborative Study G. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for human cytomegalovirus for nucleic acid amplification technology. *Biologicals.* 2016;44:242-51.

Wersja dokumentu

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc Rev. 3.0 07/2023	Zaktualizowano w celu zapewnienia zgodności z wymaganiami IVDR. Dodano część Ocena klinicznej wiarygodności testu . Na pierwszej stronie umieszczono symbol „Rx Only”. Zaktualizowano stronę z ujednoliconymi symbolami. Zaktualizowano adresy producenta. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.
Doc Rev. 4.0 02/2024	Informacje dotyczące zagrożeń związanych z zestawami Lysis Kit 2 zostały zaktualizowane. Zaktualizowano zapis marki cobas® . 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>