

cobas[®] **BKV**

Quantitativer Nukleinsäuretest zur Verwendung auf den cobas[®] 5800/6800/8800 Systems

In-vitro-Diagnostikum

cobas[®] **BKV**

P/N: 09040960190

Zur Verwendung auf dem cobas[®] 5800 System

cobas[®] **EBV/BKV Control Kit**

P/N: 09040951190

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

P/N: 09051953190

Zur Verwendung auf den cobas[®] 6800/8800 Systems

cobas[®] **EBV/BKV Control Kit**

P/N: 08688214190 oder
P/N: 09040951190

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

P/N: 07002238190 oder
P/N: 09051953190

Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck	5
Zusammenfassung und Erklärung des Tests	5
Reagenzien und Materialien	8
cobas® BKV-Reagenzien und Kontrollen.....	8
cobas® omni Reagenzien für die Probenvorbereitung	11
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	12
Handhabung der Reagenzien für das cobas ® 5800 System	13
Handhabung der Reagenzien für die cobas ® 6800/8800 Systems	14
Zusätzlich benötigte Materialien für das cobas ® 5800 System	15
Zusätzlich benötigte Materialien für die cobas ® 6800/8800 Systems	16
Benötigte Geräte und Software.....	17
Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung	18
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	18
Umgang mit Reagenzien	19
Gute Laborpraxis.....	19
Entnahme, Transport und Lagerung von Proben	20
EDTA-Plasmaproben	20
Urinproben.....	21
Gebrauchsanweisung	22
Hinweise zum Verfahren	22
Durchführung des cobas ® BKV-Tests auf dem cobas ® 5800 System.....	22
Durchführung des cobas ® BKV-Tests auf den cobas ® 6800/8800 Systems.....	24
Ergebnisse	25
Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse auf dem cobas ® 5800 System.....	25
Kontrollergebnisse auf dem cobas ® 5800 System	25

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse auf den cobas ® 6800/8800 Systems.....	26
Kontroll-Flags auf den cobas ® 6800/8800 Systems.....	26
Interpretation der Ergebnisse	27
Interpretation der Ergebnisse auf dem cobas ® 5800 System	27
Interpretation der Ergebnisse auf den cobas ® 6800/8800 Systems.....	28
Verfahrenseinschränkungen.....	28
Nichtklinische Leistungsmerkmale	29
Wichtige Leistungsmerkmale für EDTA-Plasmaproben zu den cobas ® 6800/8800 Systems	29
Nachweisgrenze (LoD): Internationaler WHO-Standard.....	29
Linearer Bereich.....	30
Laborinterne Präzision.....	31
Subtypverifizierung	32
Spezifität.....	32
Analytische Spezifität	32
Analytische Spezifität – Störsubstanzen	34
Korrelation der Methoden.....	34
Gesamtsystemausfall	35
Kreuzkontamination	35
Wichtige Leistungsmerkmale für Urinproben zu den cobas ® 6800/8800 Systems.....	36
Nachweisgrenze (LoD): Internationaler WHO-Standard.....	36
Linearer Bereich.....	38
Laborinterne Präzision.....	38
Subtypverifizierung	39
Spezifität.....	39
Analytische Spezifität	40
Analytische Spezifität – Störsubstanzen	41
Korrelation der Methoden.....	42
Kreuzkontamination	42

Klinische Leistungsmerkmale für die cobas® 6800/8800 Systems.....	43
Reproduzierbarkeit des cobas® BKV-Tests für EDTA-Plasmaproben.....	43
Leistungsmerkmale des cobas® BKV-Tests für EDTA-Plasmaproben.....	44
Reproduzierbarkeit des cobas® BKV-Tests für stabilisierte Urinproben.....	46
Leistungsmerkmale des cobas® BKV-Tests für stabilisierte Urinproben.....	47
Systemäquivalenz und -vergleich.....	50
Weitere Informationen.....	51
Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests	51
Symbole	52
Technischer Support.....	53
Hersteller und Importeur.....	53
Marken und Patente.....	53
Copyright.....	53
Literatur	54
Dokumentversion.....	55

Verwendungszweck

Der **cobas**® BKV-Test ist ein *in-vitro*-Nukleinsäure-Amplifikationstest zur quantitativen Bestimmung von BK-Virus (BKV)-DNA in EDTA-Humanplasma und in **cobas**® PCR Media stabilisiertem Urin.

Bei EDTA-Plasma ist der **cobas**® BKV-Test zur Unterstützung der Diagnose und Behandlung von BKV bei Transplantationspatienten vorgesehen. Bei Patienten, die auf BKV in EDTA-Plasma überwacht werden, können DNA-Reihenmessungen auf möglicherweise erforderliche Anpassungen der Therapie hinweisen und zur Beurteilung der Virusreaktion auf die Behandlung verwendet werden.

Bei in **cobas**® PCR Media stabilisiertem Urin ist der **cobas**® BKV-Test zur Unterstützung der Diagnose und Behandlung von BKV bei Transplantationspatienten vorgesehen.

Die Ergebnisse des **cobas**® BKV-Tests müssen im Kontext aller relevanten klinischen Befunde und Laborwerte interpretiert werden.

Der **cobas**® BKV-Test ist nicht zur Verwendung als Screening-Test für Blut oder Blutprodukte vorgesehen.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Hintergrund

Bei Transplantatempfängern besteht ein erhöhtes Risiko für viele virale oder bakterielle Infektionen, die, anders als bei Menschen mit einem guten Gesundheitszustand, eher zu schwerwiegenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen können. Dieses erhöhte Risiko ist z. T. auf eine eingeschränkte Funktion des Immunsystems aufgrund von immunsuppressiven Medikamenten zurückzuführen. Transplantationspatienten sind jedoch auf die Einnahme solcher Medikamente angewiesen, um das Risiko einer Transplantatabstoßung zu minimieren.^{1,2}

Beim BK-Virus (BKV; Genom ca. 5 kb) handelt es sich um nicht-behüllte DNA-Viren aus der Familie der Polyomaviridae. Das BK-Virus ist in vier Subtypen eingeteilt, von denen Subtyp I (80 %), gefolgt von Subtyp IV (15 %), am häufigsten vorkommt.³ Die Seroprävalenz des BKV liegt bei gesunden Erwachsenen bei > 80 %.⁴ Bei immunkompetenten Menschen ist das BKV nicht mit signifikanten pathologischen Befunden assoziiert. Allerdings kann das BKV bei Personen mit geschwächtem Immunsystem, z. B. Transplantationspatienten, schwere klinische Erkrankungen hervorrufen.⁵

BKV-Infektionen manifestieren sich in den meisten Fällen in den Nieren oder Harnwegen. Nach der Erstinfektion verbleibt das Virus im Epithel der Nierentubuli und der Ureter und kann bei immungeschwächten Patienten eine reaktivierte latente Infektion hervorrufen. Bei nierentransplantierten Patienten besteht im Vergleich zu anderen Transplantationspatienten ein erhöhtes Risiko für BKV-assoziierte Komplikationen, wie z. B. BK-Virusnephropathie (BKVN) oder Ureterstenose. Eine BKVN tritt bei bis zu 10 % aller Nierentransplantatempfänger auf. Das Risiko eines Transplantatverlusts infolge der Infektion liegt bei ca. 50 %. Außerdem erkranken ca. 3 % aller Nierentransplantatempfänger an einer BKV-assoziierten Ureterstenose.⁵ Auch infolge einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) besteht ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von BKV-assoziierten Komplikationen. Besonders häufig erkranken diese Patienten an hämorrhagischer Zystitis (zwischen 5 und 15 % aller HSZT-Patienten).¹

Gemäß den aktuellen Leitlinien sollten nierentransplantierte Patienten im Zeitraum von 5 Jahren nach der Transplantation regelmäßige Nachsorgetermine zur Untersuchung auf BKV wahrnehmen.⁶ Dieser Ansatz ermöglicht eine frühzeitige Identifikation von 80–90 % der BKVN-Risikopatienten. Um Patienten mit erhöhtem BKVN-Risiko zu

identifizieren, sollte deren Plasma auf BKV-Virämie untersucht werden – bei Patienten mit bekannter BKV-Virurie anhand eines Bestätigungstests bzw. als primäre Testmethode im Rahmen von Routineuntersuchungen.⁶ Derzeit liegen keine Empfehlungen für Routinekontrollen auf BKV bei HSZT-Patienten vor. Hauptsächlich bei Patienten mit Hämaturie und klinischen Symptomen, die auf eine Zystitis hindeuten, sollten jedoch die entsprechenden Tests durchgeführt werden. Ein BKV-DNA-Wert von mehr als 10.000 Kopien/ml korreliert bei Transplantationspatienten mit einem erhöhten Risiko für eine hämorrhagische Zystitis.⁷

Bei nierentransplantierten Patienten mit einer anhaltenden Erhöhung der BKV-DNA-Werte im Plasma, d. h. einem Wert von mehr als 10.000 Kopien/ml, sollte das Plasma alle 1–2 Wochen auf BKV untersucht werden, bis der DNA-Wert bei zwei aufeinanderfolgenden Messungen wieder in einem nicht nachweisbaren Bereich liegt.

Die Tatsache, dass viele Labortests für die BKV-Quantifizierung nicht standardisiert sind, führt zu hohen Inter-Labor- und Inter-Assay-Variabilitäten.^{6,7} Darüber hinaus kann es durch Urinbestandteile zu einer BKV-Aggregation kommen, was auch zu quantitativen Variabilitäten führen kann.^{8,9} Um für die klinische Behandlung von Patienten mit BKV-assoziierten Erkrankungen in allen Labors einheitliche Ergebnisse zu erzielen, ist die formale Bewertung der Reproduzierbarkeit und Gültigkeit der BKV-DNA-Werte entscheidend.

Der genaue medizinisch relevante virale Schwellenwert ist aufgrund der Inter-Assay-Variabilität zwar noch umstritten, das Konzept des kritischen Schwellenwerts hat jedoch seine Gültigkeit, denn eine Reihe von Studien zum natürlichen Krankheitsverlauf zeigt, dass höhere BKV-DNA-Werte mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer BKVN oder einer hämorrhagischen Zystitis einhergehen.^{6,7}

Nutzen von NAT-Tests

Die BK-Serologie wird nicht routinemäßig in der klinischen Praxis eingesetzt und dient lediglich zur Untersuchung, ob ein Patient zuvor mit BKV infiziert war und ob das Risiko einer Reaktivierung besteht. Verfahren zur Kultivierung des Virus haben eine lange Durchlaufzeit und sind semiquantitativ. Daher sind sie bei immunsupprimierten Patienten, die häufig geringe Viruskonzentrationen aufweisen, wenig aussagekräftig. Der direkte Nachweis von BKV-DNA mittels Echtzeit-PCR-Methoden zeichnet sich bei Transplantationspatienten potenziell durch einen breiten dynamischen Bereich, hohe Präzision sowie optimale Sensitivität und Spezifität aus.

Erklärung des Tests

Der **cobas**® BKV-Test ist ein quantitativer Test zur Verwendung auf den **cobas**® 5800/6800/8800 Systems. Der **cobas**® BKV-Test ermöglicht den Nachweis und die quantitative Bestimmung von BKV-DNA in EDTA-Plasma und in **cobas**® PCR Media stabilisiertem Urin von Infizierten. Zur quantitativen Bestimmung des BKV-DNA-Werts dient ein nicht aus BKV stammender DNA-Quantifizierungsstandard (DNA-QS), der bei der Verarbeitung jeder Probe zugegeben wird. Der DNA-QS dient zudem zur Überwachung des gesamten Prozesses der Probenvorbereitung und PCR-Amplifikation. Zusätzlich kommen bei dem Test drei externe Kontrollen zum Einsatz: eine Positivkontrolle mit hohem Titer, eine Positivkontrolle mit niedrigem Titer und eine Negativkontrolle. Die hoch positiven und niedrig positiven externen Kontrollen werden durch Verdünnung einer Stammlösung mit einem Titer hergestellt, der auf den internationalen WHO-Standard für BKV rückführbar ist. Jede Charge des Amplifikations-/Detektions-Kits ist so kalibriert, dass sie auf den internationalen WHO-Standard für BKV rückführbar ist.

Testprinzipien

Der **cobas**® BKV-Test beruht auf einer vollautomatisierten Probenvorbereitung (Extraktion und Aufreinigung der Nukleinsäuren) gefolgt von PCR-Amplifikation und Detektion. Das **cobas**® 5800 System ist als ein integriertes Gerät ausgelegt. Die **cobas**® 6800/8800 Systems bestehen aus einem Probenzufuhrmodul, einem Transfermodul, einem Aufarbeitungsmodul und einem Analysenmodul. Die automatisierte Datenverwaltung erfolgt über die Software des **cobas**® 5800 Systems oder der **cobas**® 6800/8800 Systems, die die Ergebnisse aller Tests als „Target not detected“, „BKV-DNA nachgewiesen unter der unteren Quantifizierungsgrenze“, „BKV-DNA nachgewiesen über der oberen Quantifizierungsgrenze“ einstuft oder einen Wert im linearen Bereich von „untere Quantifizierungsgrenze < x < obere Quantifizierungsgrenze“ angibt. Die Ergebnisse können direkt am Bildschirm des Systems eingesehen, exportiert oder als Bericht ausgedruckt werden.

Die in der Patientenprobe enthaltene Nukleinsäure und die zugegebenen DNA-QS-Moleküle werden gleichzeitig extrahiert. Die virale Nukleinsäure wird schließlich durch Zugabe von Proteinase und Lysereagenz zur Probe freigesetzt. Die freigesetzte Nukleinsäure bindet an die Silica-Oberfläche der hinzugefügten magnetischen Glaspartikel. Nicht gebundene Substanzen und Verunreinigungen, beispielsweise denaturiertes Protein, Zelltrümmer und potenzielle PCR-Inhibitoren werden durch anschließende Waschreagenzschritte entfernt. Die aufgereinigte Nukleinsäure wird danach mit einem Elutionspuffer bei erhöhter Temperatur von den Glaspartikeln gelöst.

Die selektive Amplifikation von Zielnukleinsäure aus der Probe erfolgt anhand eines viruspezifischen Dual Target-Ansatzes aus hochkonservierten BKV-Regionen in der Region des kleinen T-Antigens und in der VP2-Region des BKV. Zur selektiven Amplifikation des DNA-QS werden speziell ausgewählte, sequenzspezifische Forward- und Reverse-Primer eingesetzt, die keine Homologie mit dem BKV-Genom aufweisen. Für die Amplifikation wird ein thermostabiles DNA-Polymeraseenzym eingesetzt. Die Ziel- und DNA-QS-Sequenzen werden unter Verwendung eines universellen PCR-Amplifikationsprofils mit vordefinierten Temperaturschritten und vordefinierter Zyklusanzahl gleichzeitig amplifiziert. Der Master-Mix enthält anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) Desoxyuridintriphosphat (dUTP), das in die neu synthetisierte DNA (Amplifikat) eingebaut wird.¹⁰⁻¹² Etwaige Verunreinigungen durch Amplifikate aus vorherigen PCR-Läufen werden beim Erwärmen im ersten thermozyklischen Schritt durch das im PCR-Mix enthaltene Enzym AmpErase (Uracil-N-Glykosylase) eliminiert. Neu gebildete Amplifikate dagegen werden nicht eliminiert, da das AmpErase-Enzym durch Temperaturen über 55 °C inaktiviert wird.

Der **cobas**® BKV-Master-Mix enthält zwei Detektionssonden, die für die BKV-Zielsequenzen spezifisch sind, und eine weitere für den DNA-QS. Die Sonden sind mit zielspezifischen fluoreszierenden Reporterfarbstoffen markiert, die den gleichzeitigen Nachweis der BKV-Zielsequenz und des DNA-QS in zwei verschiedenen Zielkanälen ermöglichen.^{13, 14} Das Fluoreszenzsignal der intakten Sonden wird durch den Quencher-Farbstoff unterdrückt. Während des PCR-Amplifikationsschritts wird die Sonde an die betreffenden einsträngigen DNA-Templates hybridisiert und durch die 5'-3'-Nukleaseaktivität der DNA-Polymerase gespalten. Dadurch kommt es zur Trennung der Reporter- und Quencher-Farbstoffe, und es entsteht ein Fluoreszenzsignal. Mit jedem PCR-Zyklus werden zunehmende Mengen gespaltenen Sonden erzeugt, und das kumulative Signal des Reporterfarbstoffs steigt entsprechend an. Die Echtzeit-Detektion und die Unterscheidung der PCR-Produkte werden durch Messen der Fluoreszenz der freigesetzten Reporterfarbstoffe erreicht, die die Viruszielsequenzen und den DNA-QS repräsentieren.

Reagenzien und Materialien

cobas® BKV-Reagenzien und Kontrollen

Die mit dem cobas® BKV-Test mitgelieferten Materialien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Alle zusätzlich benötigten Materialien sind in Tabelle 2 bis Tabelle 4 sowie Tabelle 8 bis Tabelle 10 aufgeführt.

In den Abschnitten **Reagenzien und Materialien** sowie **Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung** finden Sie die Gefahrenhinweise zum Produkt.

Tabelle 1 cobas® BKV

cobas® BKV

Bei 2–8 °C lagern.

Kassette mit 192 Tests (P/N 09040960190)

Kitkomponenten	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit 192 Tests
Proteinase-Lösung (PASE)	Tris-Puffer, < 0,05 % EDTA, Calciumchlorid, Calciumacetat, 8 % Proteinase, Glycerin EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich. EUH208: Enthält Subtilisin von <i>Bacillus subtilis</i> . Kann allergische Reaktionen hervorrufen.	22,3 ml
DNA-Quantifizierungsstandard (DNA QS)	Tris-Puffer, < 0,05 % EDTA, < 0,001 % Nicht-BKV-DNA-Konstrukt mit einer Nicht-BKV-Primer- und einer eindeutigen Sonden-Bindungsregion (nicht-infektiöse DNA), < 0,002 % Poly-rA-RNA (synthetisch), < 0,1 % Natriumazid	21,2 ml
Elutionspuffer (EB)	Tris-Puffer, 0,2 % Methyl-4-Hydroxybenzoat	21,2 ml
Master-Mix-Reagenz 1 (MMX-R1)	Manganacetat, Kaliumhydroxid, < 0,1 % Natriumazid	7,5 ml
BKV-Master-Mix-Reagenz 2 (BKV MMX-R2)	Tricin-Puffer, Kaliumacetat, < 18 % Dimethylsulfoxid, Glycerin, < 0,1 % Tween 20, EDTA, < 0,12 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01 % Upstream- und Downstream-BKV-Primer, < 0,01 % Quantifizierungsstandard-Forward- und -Reverse-Primer, < 0,01 % fluoreszenzmarkierte, für BKV bzw. den BKV-Quantifizierungsstandard spezifische Oligonukleotidsonden, < 0,01 % Oligonukleotid-Aptamer, < 0,01 % Z05D-DNA-Polymerase, < 0,10 % AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase, mikrobiell), < 0,1 % Natriumazid	9,7 ml

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

Bei 2–8 °C lagern.

Zur Verwendung auf dem cobas® 5800 System (P/N 09040951190)

Zur Verwendung auf den cobas® 6800/8800 Systems (P/N 08688214190 oder P/N 09040951190)

Kitkomponenten	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit	Sicherheitssymbole und -hinweise*
Niedrig positive EBV/BKV-Kontrolle (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001 % in Lambda-Bakteriophagenhüllprotein verkapselte synthetische (Plasmid) BKV-DNA, Normal-Humanplasma, BKV-DNA nicht mittels PCR-Methoden nachweisbar 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  <p>WARNUNG</p> <p>H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.</p> <p>P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe tragen. P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. P501: Inhalt/Behälter einer zugelassenen Abfallbeseitigungsanlage zuführen.</p> <p>55965-84-9 Reaktionsmasse von: 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1).</p>
Hoch positive EBV/BKV-Kontrolle (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001 % in Lambda-Bakteriophagenhüllprotein verkapselte synthetische (Plasmid) BKV-DNA, Normal-Humanplasma, BKV-DNA nicht mittels PCR-Methoden nachweisbar 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  <p>WARNUNG</p> <p>H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen. H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.</p> <p>P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden. P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden. P280: Schutzhandschuhe tragen. P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. P501: Inhalt/Behälter einer zugelassenen Abfallbeseitigungsanlage zuführen.</p> <p>55965-84-9 Reaktionsmasse von: 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on und 2-Methyl-2H-isothiazol-3-on (3:1).</p>

* Die Sicherheitskennzeichnung der Produkte erfolgt in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU.

** Gefährliche Substanz oder gefährliches Gemisch

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

Bei 2–8 °C lagern.

Zur Verwendung auf dem **cobas®** 5800 System (P/N 09051953190)

Zur Verwendung auf den **cobas®** 6800/8800 Systems (P/N 07002238190 oder P/N 09051953190)

Kitkomponenten	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit
cobas® Puffer-Negativkontrolle (BUF (-) C)	Tris-Puffer, < 0,1 % Natriumazid, EDTA, 0,002 % Poly-rA-RNA (synthetisch)	16 ml (16 × 1 ml)

cobas® omni Reagenzien für die Probenvorbereitung

Tabelle 4 cobas® omni Reagenzien für die Probenvorbereitung

Reagenzien	Reagenzienbestandteile	Menge je Kit	Sicherheitssymbole und -hinweise*
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Bei 2–8 °C lagern. (P/N 06997546190)	Magnetische Glaspartikel, Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4 Hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid	480 Tests	Keine Angabe
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Bei 2–8 °C lagern. (P/N 06997511190)	Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4 Hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid	4 × 875 ml	Keine Angabe
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Bei 2–8 °C lagern. (P/N 06997538190)	43 % (Gew.-%) Guanidinthiocyanat**, 5 % (Massenvol.-%) Polidocanol**, 2 % (Massenvol.-%) Dithiothreitol**, Dihydro-Natriumcitrat EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.	4 × 875 ml	 <p>GEFAHR</p> <p>H302 + H332: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.</p> <p>H314: Verursacht schwere Verätzungen und schwere Augenschäden.</p> <p>H411: Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.</p> <p>P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.</p> <p>P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.</p> <p>P303 + P361 + P353: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen.</p> <p>P304 + P340 + P310: BEI EINATMEN: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.</p> <p>P305 + P351 + P338 + P310: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM/Arzt anrufen.</p> <p>P391: Verschüttete Mengen aufnehmen.</p> <p>593-84-0 Guanidinthiocyanat 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol</p>
cobas® omni Wash Reagent (WASH) Bei 15–30 °C lagern. (P/N 06997503190)	Natriumcitratdihydrat, 0,1 % Methyl-4-Hydroxybenzoat	4,2 l	Keine Angabe

* Die Sicherheitskennzeichnung der Produkte erfolgt in erster Linie gemäß GHS-Verordnung der EU.

** Gefährliche Substanz oder gefährliches Gemisch.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Reagenzien müssen wie in Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 angegeben gelagert und gehandhabt werden.

Reagenzien, die sich nicht im cobas® 5800 System oder den cobas® 6800/8800 Systems befinden, bei der in Tabelle 5 angegebenen Temperatur lagern.

Tabelle 5 Reagenzlagerung (wenn sich das Reagenz nicht im System befindet)

Reagenz	Lagertemperatur
cobas® BKV	2–8 °C
cobas® EBV/BKV Control Kit	2–8 °C
cobas® Buffer Negative Control Kit	2–8 °C
cobas® omni Lysis Reagent	2–8 °C
cobas® omni MGP Reagent	2–8 °C
cobas® omni Specimen Diluent	2–8 °C
cobas® omni Wash Reagent	15–30 °C

Handhabung der Reagenzien für das cobas® 5800 System

Reagenzien im cobas® 5800 System werden bei angemessenen Temperaturen aufbewahrt und ihr Verfallsdatum wird vom System überwacht. Das System lässt die Verwendung der Reagenzien nur zu, wenn alle in Tabelle 6 angegebenen Bedingungen erfüllt sind. Das System verhindert automatisch die Verwendung von abgelaufenen Reagenzien. In Tabelle 6 sind die Bedingungen für die Reagenzhandhabung aufgeführt, die vom cobas® 5800 System geprüft werden.

Tabelle 6 Bedingungen für die Haltbarkeit der Reagenzien, die vom cobas® 5800 System geprüft werden

Reagenz	Verfallsdatum des Kits	Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits	Anzahl der Läufe, für die dieses Kit verwendet werden kann	Haltbarkeit im Gerät
cobas® BKV	Datum nicht überschritten	90 Tage ab erstem Gebrauch	Max. 40 Läufe	Max. 36 Tage**
cobas® EBV/BKV Control Kit	Datum nicht überschritten	Keine Angabe*	Keine Angabe	Max. 36 Tage**
cobas® Buffer Negative Control Kit	Datum nicht überschritten	Keine Angabe*	Keine Angabe	Max. 36 Tage**
cobas® omni Lysis Reagent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden**	Keine Angabe	Keine Angabe
cobas® omni MGP Reagent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden**	Keine Angabe	Keine Angabe
cobas® omni Specimen Diluent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden**	Keine Angabe	Keine Angabe
cobas® omni Wash Reagent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden**	Keine Angabe	Keine Angabe

* Reagenzien für den Einmalgebrauch

** Zeit ab dem erstmaligen Laden des Reagenzes in das cobas® 5800 System.

Handhabung der Reagenzien für die cobas® 6800/8800 Systems

Reagenzien in den cobas® 6800/8800 Systems werden bei angemessenen Temperaturen aufbewahrt und ihr Verfallsdatum wird vom System überwacht. Die cobas® 6800/8800 Systems lassen die Verwendung der Reagenzien nur zu, wenn alle in Tabelle 7 angegebenen Bedingungen erfüllt sind. Das System verhindert automatisch die Verwendung von abgelaufenen Reagenzien. In Tabelle 7 sind die Bedingungen für die Reagenzhandhabung aufgeführt, die von den cobas® 6800/8800 Systems geprüft werden.

Tabelle 7 Bedingungen für die Haltbarkeit für Reagenzien, die von den cobas® 6800/8800 Systems geprüft werden

Reagenz	Verfallsdatum des Kits	Haltbarkeit nach dem Öffnen des Kits	Anzahl der Läufe, für die dieses Kit verwendet werden kann	Haltbarkeit im Gerät (kumulative Zeit im Gerät außerhalb der Kühlung)
cobas® BKV	Datum nicht überschritten	90 Tage ab erstem Gebrauch	Max. 40 Läufe	Max. 40 Stunden
cobas® EBV/BKV Control Kit	Datum nicht überschritten	Keine Angabe*	Keine Angabe	Max. 8 Stunden
cobas® Buffer Negative Control Kit	Datum nicht überschritten	Keine Angabe*	Keine Angabe	Max. 10 Stunden
cobas® omni Lysis Reagent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden**	Keine Angabe	Keine Angabe
cobas® omni MGP Reagent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden**	Keine Angabe	Keine Angabe
cobas® omni Specimen Diluent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden**	Keine Angabe	Keine Angabe
cobas® omni Wash Reagent	Datum nicht überschritten	30 Tage ab dem Laden**	Keine Angabe	Keine Angabe

* Reagenzien für den Einmalgebrauch

** Zeit ab dem erstmaligen Laden des Reagenzes in die cobas® 6800/8800 Systems.

Zusätzlich benötigte Materialien für das cobas® 5800 System

Tabelle 8 Materialien und Verbrauchsmaterialien zur Verwendung auf dem cobas® 5800 System

Material	P/N
cobas® omni Processing Plate 24	08413975001
cobas® omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas® omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Pipettenspitzen CORE TIPS mit Filter, 1 ml	04639642001
Pipettenspitzen CORE TIPS mit Filter, 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
Beutel für Festabfälle oder Beutel für Festabfälle mit Einsatz	07435967001 oder 08030073001
cobas® omni Sekundärröhrchen 13 × 75 (optional)	06438776001
cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
cobas® PCR Media Disposable Tube Stand (Halterung für Einweg-Röhrchen, optional)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050*,**	03143449001
RD5 RACK – RD Standardrack 0001-0050 LR*,**	11902997001
Röhrchen-Carrier mit 16 Positionen*	09224319001
Rack-Carrier mit 5 Positionen*	09224475001

* Eine ausführliche Bestellliste für Probenracks ist bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.

** Das 16-mm-MPA-Rack und der Röhrchen-Carrier mit 16 Positionen sind die bevorzugten Racks für Proben, die in cobas® PCR Media-Röhrchen aufgenommen wurden.

Zusätzlich benötigte Materialien für die cobas® 6800/8800 Systems

Tabelle 9 Materialien und Verbrauchsmaterialien zur Verwendung auf den **cobas®** 6800/8800 Systems

Material	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
Beutel für Festabfälle und Festabfallbehälter oder Beutel für Festabfälle mit Einsatz und neuer Beutel für Festabfälle für Kit-Schublade	07435967001 und 07094361001 oder 08030073001 und 08387281001
cobas® omni Sekundärröhrchen 13 × 75 (optional)	06438776001
cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
cobas® PCR Media Disposable Tube Stand (Halterung für Einweg-Röhrchen, optional)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050*,**	03143449001

* Eine ausführliche Bestellliste für Probenracks, Racks für verstopfte Spitzen und Racktrays, die auf den Geräten verwendet werden können, ist bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.

** 16-mm-MPA ist das bevorzugte Rack für Proben, die in **cobas®** PCR Media-Röhrchen aufgenommen wurden.

Tabelle 10 Für den **cobas®** BKV-Test geeignete Urinproben-Entnahmekits

Entnahmekit	P/N
cobas® PCR Urine Sample Kit	05170486190
cobas® PCR Media Kit	06466281190

Hinweis: Das **cobas®** PCR Urine Sample Kit dient zur Entnahme und zum Transport von Urinproben. Jedes **cobas®** PCR Urine Sample Kit enthält 100 **cobas®** PCR Urinprobenpackungen. Jede Packung enthält 1 Einwegpipette und 1 **cobas®** PCR Media-Röhrchen mit 4,3 ml **cobas®** PCR Media. Das **cobas®** PCR Media stabilisiert die Nukleinsäure und dient als Transport- und Lagerungsmedium für die Urinproben.

Für Urinproben, die ohne Verwendung des **cobas®** PCR Urine Sample Kit bei der Entnahme direkt an das Labor gesendet werden, kann alternativ das **cobas®** PCR Media Kit mit 100 **cobas®** PCR Media-Röhrchen (ohne Einwegpipetten) verwendet werden. Dabei ist zu beachten, dass Urinproben innerhalb von 24 Stunden nach der Entnahme überführt werden müssen.

Benötigte Geräte und Software

Die **cobas**® 5800 Software und das **cobas**® BKV Analysepaket für das **cobas**® 5800 System müssen auf dem **cobas**® 5800 Gerät installiert werden. Die Data Manager-Software und der PC für das **cobas**® 5800 System werden mit dem System bereitgestellt.

Die **cobas**® 6800/8800 Software und das **cobas**® BKV-Analysenpaket müssen auf dem Gerät (bzw. den Geräten) installiert sein. Der IG-Server (Instrument Gateway) ist Bestandteil des Systems.

Tabelle 11 Geräte

Ausstattung	P/N
cobas ® 5800 System	08707464001
cobas ® 6800 System (mit beweglicher Plattform)	05524245001 und 06379672001
cobas ® 6800 System (feststehend)	05524245001 und 06379664001
cobas ® 8800 System	05412722001
Probenzufuhrmodul	06301037001

Zusätzliche Informationen finden Sie in der Benutzerunterstützung und/oder den Benutzerhandbüchern des **cobas**® 5800 Systems bzw. der **cobas**® 6800/8800 Systems.

Hinweis: Eine ausführliche Bestellliste für Primär- und Sekundärröhrchen, Probenracks, Racks für verstopfte Spitzen und Racktrays, die auf den Geräten verwendet werden können, ist bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.

cobas® BKV kann mit dem Primärröhrchen verwendet werden, das für in **cobas**® PCR Media entnommenen Urinproben eingesetzt wird.

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die uneingeschränkte Leistung dieses Tests. Aufgrund der hohen Sensitivität dieses Tests ist besonders darauf zu achten, dass die Reagenzien und Amplifikationsgemische nicht kontaminiert werden.

- Nur zur Verwendung als *in vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Der **cobas**® BKV-Test wurde nicht zur Verwendung als Screening-Test für das Vorliegen von BKV in Blut oder Blutprodukten evaluiert.
- Alle Patientenproben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ und dem CLSI-Dokument M29-A4 beschrieben zu behandeln.^{15, 16} Dieses Verfahren darf nur von Personal angewandt werden, das mit dem **cobas**® BKV-Test und den **cobas**® 5800/6800/8800 Systems vertraut und in der Handhabung infektiöser Materialien geschult ist.
- Alle von Menschen gewonnenen Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und müssen unter Anwendung genereller Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Wenn Material verschüttet wurde, betroffenes Areal unverzüglich mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 0,6%igem Natrium- oder Kaliumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser desinfizieren oder die jeweiligen Laborverfahren beachten.
- Das **cobas**® EBV/BKV Control Kit enthält aus menschlichem Blut gewonnenes Plasma. Bei der Untersuchung des Ausgangsmaterials mittels PCR-Methoden konnten geringe Mengen von BKV-DNA nachgewiesen werden, die in einem vertretbaren Bereich lagen. Mit keiner der bekannten Testmethoden kann jedoch eine Übertragung von Infektionserregern durch humane Blutprodukte ausgeschlossen werden.
- **Vollblut und Urinproben in Primärrohrchen nicht einfrieren.**
- Nur die mitgelieferten oder die als erforderlich angegebenen Verbrauchsmaterialien verwenden, um eine optimale Leistung des Tests zu gewährleisten.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.
- Alle Verfahren und Vorschriften sind sorgfältig einzuhalten, um eine korrekte Durchführung des Tests sicherzustellen. Jede Abweichung von den Verfahren und Vorschriften kann sich auf die optimale Leistung des Tests auswirken.
- Es kann zu falsch-positiven Ergebnissen kommen, wenn während der Handhabung und Bearbeitung der Proben eine Probenverschleppung nicht vermieden wird.
- **cobas**® PCR Media (in Primär-Probenrohrchen) enthält Guanidinhydrochlorid. **Guanidinhydrochlorid darf nicht mit Natriumhypochlorit (Bleiche) oder anderen hochreaktiven Reagenzien wie Säuren oder Basen in direkten Kontakt kommen. Beim Mischen dieser Stoffe können giftige Gase entstehen.** Wird eine Flüssigkeit verschüttet, die Guanidinhydrochlorid enthält, mit einem geeigneten Laborreinigungsmittel und Wasser beseitigen. Enthält die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Stoffe, muss der betroffene Bereich **ZUERST** mit Laborreinigungsmittel und Wasser und anschließend mit 0,6%igem Natrium- oder Kaliumhypochlorit gereinigt werden.
- Schwerwiegende Vorkommnisse, die bei Verwendung dieses Tests auftreten, müssen den zuständigen Behörden und dem Hersteller gemeldet werden.

Umgang mit Reagenzien

- Alle Reagenzien, Kontrollen und Proben sind gemäß der guten Laborpraxis zu handhaben, um eine Verschleppung der Proben und Kontrollen zu vermeiden.
- Alle Reagenzkassetten, Verdünnungslösungen, Lysereagenzien und Waschreagenzien vor der Verwendung visuell auf auslaufende Flüssigkeit überprüfen. Liegen Anzeichen für undichte Stellen vor, das betreffende Material nicht für den Test verwenden.
- **cobas® omni** Lysis Reagent enthält die potenziell gefährliche Chemikalie Guanidinthiocyanat. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit Reagenzien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen, um Verätzungen zu vermeiden.
- **cobas®** BKV-Testkits, **cobas® omni** MGP Reagent und **cobas® omni** Specimen Diluent enthalten Natriumazid als Konservierungsstoff. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit Reagenzien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen, um Verätzungen zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- **cobas® omni** Lysis Reagent enthält Guanidinthiocyanat und darf nicht in Kontakt mit Natriumhypochloritlösung (Haushaltsbleiche) gebracht werden. Dieses Gemisch kann ein hochgiftiges Gas erzeugen.
- Sämtliche Materialien, die mit Proben und Reagenzien in Berührung gekommen sind, gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sind Laborhandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille zu tragen. Um eine Kontamination zu vermeiden, müssen die Handschuhe zwischen der Handhabung von Proben und den **cobas®** BKV-Kits, der niedrig positiven EBV/BKV-Kontrolle (EBV/BKV L(+))C), der hoch positiven EBV/BKV-Kontrolle (EBV/BKV H(+))C), den **cobas®** Buffer Negative Control Kits und den **cobas® omni** Reagenzien jeweils gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit den Proben und Kontrollen nicht kontaminiert werden.
- Nach Gebrauch der Proben und Kitreagenzien sowie nach dem Ausziehen der Handschuhe gründlich die Hände waschen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,6%igem Natrium- oder Kaliumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren. Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abwischen.
- Wenn Flüssigkeiten auf dem **cobas®** 5800 System oder den **cobas®** 6800/8800 Systems verschüttet wurden, die Oberflächen gemäß den Anweisungen in der Benutzerunterstützung und/oder im Benutzerhandbuch des **cobas®** 5800 Systems bzw. der **cobas®** 6800/8800 Systems reinigen und dekontaminieren.

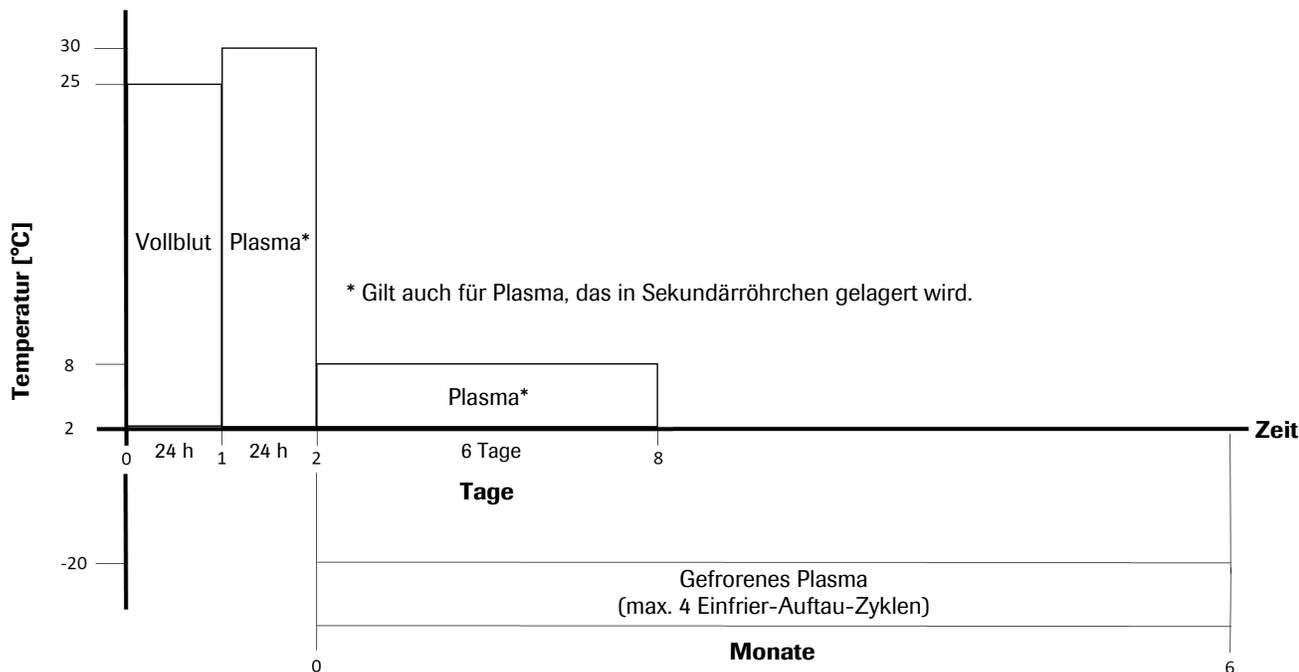
Entnahme, Transport und Lagerung von Proben

Hinweis: Alle Proben und Kontrollen sind wie potenzielle Überträger von Infektionserregern zu behandeln.

EDTA-Plasmaproben

- Alle Proben bei den angegebenen Temperaturen lagern. Erhöhte Umgebungstemperaturen wirken sich auf die Probenstabilität aus.
- Bei Verwendung gefrorener Proben in Sekundärröhrchen die Proben bei Zimmertemperatur (15–30 °C) vollständig auftauen lassen, kurz mischen (z. B. 3 bis 5 Sekunden im Vortexer) und anschließend zentrifugieren, um das gesamte Probenvolumen am Röhrchenboden zu sammeln.
- Das Vollblut ist in BD Vacutainer® PPT™ Plasmavorbereitungsröhrchen für molekulare diagnostische Tests oder in sterilen Röhrchen mit EDTA als Antikoagulans zu sammeln. Die Anweisungen des Probenröhrchen-Herstellers beachten. Siehe Abbildung 1.
- Vollblut, das für molekulardiagnostische Tests in BD Vacutainer® PPT™ Plasmavorbereitungsröhrchen oder in sterilen Röhrchen mit EDTA als Antikoagulans gesammelt wurde, kann vor der Vorbereitung des Plasmas bei 2 bis 25 °C maximal 24 Stunden lang gelagert und/oder transportiert werden. Beim Zentrifugieren die Anweisungen des Geräteherstellers beachten.
- Plasmaproben können nach der Abtrennung 24 Stunden lang bei 2 bis 30 °C in Primär- oder Sekundärröhrchen gelagert werden; außerdem gilt:
 - Lagerung in Primär- oder Sekundärröhrchen für maximal 6 Tage bei 2 bis 8 °C.
 - Lagerung in Sekundärröhrchen für maximal 6 Monate bei ≤ -20 °C.
- Plasmaproben dürfen viermal bei ≤ -20 °C eingefroren und wieder aufgetaut werden.
- Wenn Proben versandt werden sollen, sind sie gemäß den geltenden nationalen und internationalen Vorschriften für den Transport von Proben und Krankheitserregern zu verpacken und zu beschriften.

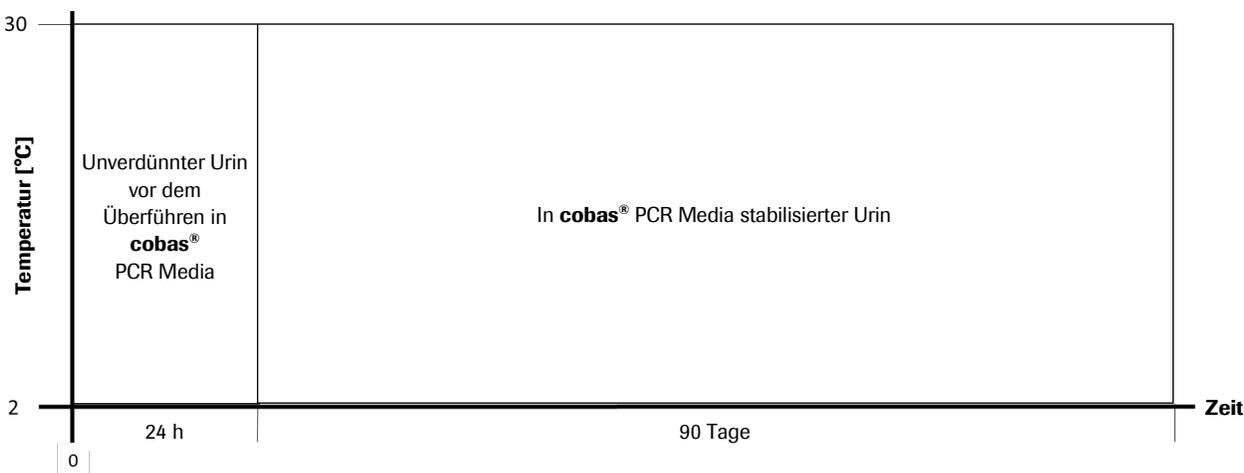
Abbildung 1 Lagerungsbedingungen für Proben in EDTA-Plasma



Urinproben

- Zur Entnahme und Stabilisierung von Urinproben für den **cobas**® BKV-Test ausschließlich das **cobas**® PCR Urine Sample Kit verwenden. Der **cobas**® BKV-Test wurde nicht für andere Urinentnahmesysteme oder Medienarten validiert. Die Verwendung des **cobas**® BKV-Tests mit anderen Urinentnahmesystemen oder Medienarten kann zu falsch-negativen, falsch-positiven und/oder ungültigen Ergebnissen führen.
- Urinproben müssen zur Stabilisierung sofort in das Röhrchen mit **cobas**® PCR Media überführt werden. Können die Proben nicht sofort überführt werden, können sie bei 2 bis 30 °C bis zu 24 Stunden aufbewahrt werden. Nach der Stabilisierung der Urinproben in **cobas**® PCR Media können die Proben bis zu 90 Tage lang bei 2 bis 30 °C gelagert werden. Siehe Abbildung 2.
- Der Füllstand nicht getesteter Urinproben muss in den **cobas**® PCR Media-Röhrchen zwischen den beiden schwarzen Linien liegen. Befindet sich der Füllstand über oder unter diesen Linien, wurde die Probe nicht fachgerecht entnommen und darf für die Tests nicht verwendet werden.
- Ist für die Verdünnung im **cobas**® PCR Urinprobenröhrchen nicht genügend Urin (4,3 ml) vorhanden, kann der Urin auch manuell mit **cobas**® PCR Media verdünnt werden. Vor der Durchführung des **cobas**® BKV-Tests müssen mindestens 0,5 ml von noch unverdünntem Urin manuell mit **cobas**® PCR Media im Verhältnis 1:1 verdünnt werden.
- Um eine Kreuzkontamination verarbeiteter Proben zu verhindern, sollten die Proben nach der Durchführung des Tests mit zusätzlichen Verschlüssen für **cobas**® PCR Media-Röhrchen in einer anderen (neutralen) Farbe wieder verschlossen werden (siehe **Zusätzlich benötigtes Material**).
- Wenn zusätzliche Tests erforderlich sind, ist sicherzustellen, dass in den **cobas**® PCR Media-Röhrchen mindestens 1,2 ml Probe verbleibt.
- Wenn Proben versandt werden sollen, sind sie gemäß den geltenden nationalen und internationalen Vorschriften für den Transport von Proben und Krankheitserregern zu verpacken und zu beschriften.

Abbildung 2 Lagerungsbedingungen für Urin



Gebrauchsanweisung

Hinweise zum Verfahren

- Die **cobas**® BKV-Reagenzien, das **cobas**® EBV/BKV Control Kit, das **cobas**® Buffer Negative Control Kit und die **cobas**® **omni** Reagenzien nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Verbrauchsmaterialien nicht wiederverwenden. Sie sind ausschließlich zum Einmalgebrauch vorgesehen.
- Darauf achten, dass die Barcode-Etiketten auf den Probenröhrchen durch die Öffnungen an der Seite der RD5- bzw. MPA-Probenracks sichtbar sind. Barcode-Spezifikationen und zusätzliche Informationen zum Laden von Probenröhrchen sind in den Benutzerhandbüchern des **cobas**® 5800 Systems bzw. der **cobas**® 6800/8800 Systems enthalten.
- Informationen zur ordnungsgemäßen Wartung der Geräte finden Sie in der Benutzerunterstützung und/oder dem Benutzerhandbuch des **cobas**® 5800 Systems bzw. der **cobas**® 6800/8800 Systems.

Durchführung des **cobas**® BKV-Tests auf dem **cobas**® 5800 System

Zur Durchführung des **cobas**® BKV-Tests ist ein Probenvolumen von mindestens 350 µl für EDTA-Plasma (beim Arbeitsablauf mit 200 µl Probe) bzw. 550 µl für stabilisierte Urinproben (beim Arbeitsablauf mit 400 µl Probe) erforderlich. Der Testablauf ist in der Benutzerunterstützung und/oder im Benutzerhandbuch des **cobas**® 5800 Systems ausführlich beschrieben. In Abbildung 3 ist der Ablauf zusammenfassend dargestellt.

- Proben müssen unverschlossen bleiben und zur Verarbeitung auf dem **cobas**® 5800 System direkt in die Racks geladen werden.
- Ein einzelner Lauf kann eine Kombination aus Proben enthalten (Plasma, stabilisierter Urin).

Für die Bearbeitung des EDTA-Plasmas und der stabilisierten Urinproben muss auf der Benutzeroberfläche für den **cobas**® BKV-Test wie in Abbildung 3, Schritt 2 beschrieben das entsprechende Probenmaterial ausgewählt werden.

Abbildung 3 cobas® BKV-Testablauf auf dem cobas® 5800 System

1	Beim System anmelden. Zum Vorbereiten des Systems „Start“ drücken.
2	Proben in das System laden: <ul style="list-style-type: none">• Probenracks in das System laden.• Vorbereitung erfolgt automatisch durch das System.• Tests auswählen.<ul style="list-style-type: none">○ Für EDTA-Plasmaproben die Option „Plasma“ wählen.○ Für Urinproben, die in cobas® PCR Media entnommen wurden, die Option „Urin“ auswählen.<ul style="list-style-type: none">▪ Den Verschluss vom Röhrchen entfernen.▪ Das Röhrchen direkt in ein Rack stellen.
3	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien auf Anforderung des Systems nachfüllen: <ul style="list-style-type: none">• Testspezifische Reagenzkassette(n) laden.• Kontroll-Miniracks laden.• Probenaufarbeitungsspitzen laden.• Elutionsspitzen laden.• Probenaufarbeitungsplatten laden.• Platten für Flüssigabfall laden.• Amplifikationsplatten laden.• MGP-Kassette laden.• Probenverdünnungslösung nachfüllen.• Lysereagenz nachfüllen.• Waschreagenz nachfüllen.
4	Den Lauf starten, indem Sie in der Benutzeroberfläche die Schaltfläche für den Bearbeitungsstart auswählen; alle nachfolgenden Läufe starten automatisch, sofern sie nicht manuell verschoben werden.
5	Ergebnisse prüfen und exportieren.
6	Probenröhrchen, die die Anforderungen an das Mindestvolumen erfüllen, bei Bedarf für den zukünftigen Gebrauch entnehmen und verschließen. Das Gerät reinigen: <ul style="list-style-type: none">• Leere Kontroll-Miniracks entnehmen.• Leere testspezifische Reagenzkassette(n) entnehmen.• Die Amplifikationsplattenschublade leeren.• Flüssigabfall entsorgen.• Festabfall entsorgen.

Durchführung des cobas® BKV-Tests auf den cobas® 6800/8800 Systems

Zur Durchführung des cobas® BKV-Tests ist ein Probenvolumen von mindestens 350 µl für EDTA-Plasma (beim Arbeitsablauf mit 200 µl Probe) bzw. 550 µl für stabilisierte Urinproben (beim Arbeitsablauf mit 400 µl Probe) erforderlich. Der Testablauf auf dem System ist in der Benutzerunterstützung und/oder im Benutzerhandbuch der cobas® 6800/8800 Systems ausführlich beschrieben. In Abbildung 4 ist der Ablauf zusammenfassend dargestellt.

- Proben müssen unverschlossen bleiben und zur Verarbeitung auf den cobas® 6800/8800 Systems direkt in die Racks geladen werden.
- Ein einzelner Lauf kann eine Kombination aus Proben enthalten (Plasma, stabilisierter Urin).
- Für die Bearbeitung des EDTA-Plasmas und der stabilisierten Urinproben muss auf der Benutzeroberfläche für den cobas® BKV-Test wie in Abbildung 4, Schritt 1 beschrieben das entsprechende Probenmaterial ausgewählt werden.

Abbildung 4 cobas® BKV-Testablauf auf den cobas® 6800/8800 Systems

1	<p>Beim System anmelden. Zum Vorbereiten des Systems „Start“ drücken. Tests auswählen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Für EDTA-Plasmaproben die Option „Plasma“ wählen. • Für Urinproben, die in cobas® PCR Media entnommen wurden, die Option „Urin“ auswählen.
2	<p>Reagenzien und Verbrauchsmaterialien auf Anforderung des Systems nachfüllen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Testspezifische Reagenzkassette laden. • Kontrollkassetten laden. • Pipettierspitzen laden. • Probenaufarbeitungsplatten laden. • MGP-Reagenz laden. • Amplifikationsplatten laden. • Probenverdünnungslösung nachfüllen. • Lysereagenz nachfüllen. • Waschreagenz nachfüllen.
3	<p>Proben in das System laden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Für Primär-Urinproben, die in cobas® PCR Media entnommen wurden: <ul style="list-style-type: none"> ○ Den Verschluss vom Röhrchen entfernen. ○ Das Röhrchen direkt in ein Rack stellen. • Das Probenrack und die Racks für verstopfte Spitzen in das Probenzufuhrmodul laden. • Sicherstellen, dass die Proben im Transfermodul aufgenommen wurden.
4	<p>Lauf mit der Schaltfläche „Manuell starten“ in der Benutzeroberfläche starten oder den automatischen Start des Laufs nach 120 Minuten (oder wenn der Batch vollständig ist) programmieren.</p>
5	<p>Ergebnisse prüfen und exportieren.</p>
6	<p>Probenröhrchen, die die Anforderungen an das Mindestvolumen erfüllen, bei Bedarf für den zukünftigen Gebrauch entnehmen und verschließen.</p> <p>Das Gerät reinigen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leere Kontrollkassetten entnehmen. • Die Amplifikationsplattenschublade leeren. • Flüssigabfall entsorgen. • Festabfall entsorgen.

Ergebnisse

Die cobas® 5800/6800/8800 Systems dienen zur automatischen Bestimmung der BKV-DNA-Konzentration in Proben und Kontrollen. Die BKV-DNA-Konzentration wird in internationalen Einheiten pro Milliliter (IE/ml) angegeben.

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse auf dem cobas® 5800 System

- Mindestens alle 72 Stunden und mit jeder neuen Kitcharge werden eine Negativkontrolle [(-) Ctrl] sowie zwei Positivkontrollen, eine niedrig positive [EBV/BKV L (+) C] und eine hoch positive [EBV/BKV H (+) C], mitgeführt. Positiv- bzw. Negativkontrollen können, wenn dies aufgrund der Laborverfahren und/oder der geltenden Vorschriften erforderlich ist, auch häufiger angesetzt werden.
- Die cobas® 5800 Systemsoftware und/oder den Bericht auf Flags und entsprechende Ergebnisse kontrollieren, um die Gültigkeit der Ergebnisse zu überprüfen.

Die cobas® 5800 Software markiert Ergebnisse bei ausgefallenen Negativ- oder Positivkontrollen automatisch als ungültig.

HINWEIS: Das cobas® 5800 System wird mit der Standardeinstellung ausgeliefert, bei der mit jedem Lauf ein Satz Kontrollen (Positiv- und Negativkontrollen) analysiert wird; es kann aber je nach Laborverfahren und geltenden Vorschriften auch so konfiguriert werden, dass das Intervall bis zu 72 Stunden beträgt. Für weitere Informationen wenden Sie sich an Ihren Roche Servicetechniker und/oder den technischen Kundendienst von Roche.

Kontrollergebnisse auf dem cobas® 5800 System

Die Ergebnisse der Kontrollen werden in der cobas® 5800 Software in der Anwendung „Kontrollen“ angezeigt.

- Kontrollen werden in der Spalte „Kontrollergebnis“ mit „Gültig“ gekennzeichnet, wenn alle Zielsequenzen der Kontrolle als gültig ausgegeben werden. Kontrollen werden in der Spalte „Kontrollergebnis“ mit „Ungültig“ gekennzeichnet, wenn alle oder mindestens eine Zielsequenz der Kontrolle als ungültig ausgegeben werden.
- Bei mit „Ungültig“ gekennzeichneten Kontrollen erscheint in der Spalte „Flags“ ein Hinweis. In der Detailansicht werden weitere Informationen dazu angezeigt, warum die Kontrolle als ungültig ausgegeben wurde und was der Flag bedeutet.
- Ist eine der Kontrollen ungültig, müssen alle Kontrollen und alle zugehörigen Proben erneut getestet werden.

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse auf den cobas® 6800/8800 Systems

- Mit jedem Batch werden eine Negativkontrolle [(-) Ctrl], eine niedrig positive Kontrolle [EBV/BKV L (+) C] und eine hoch positive Kontrolle [EBV/BKV H (+) C] mitgeführt.
- Die cobas® 6800/8800 Software und/oder den Bericht auf Flags und entsprechende Ergebnisse kontrollieren, um die Gültigkeit des Batches zu überprüfen.
- Der Batch ist gültig, wenn für keine der drei Kontrollen Flags ausgegeben wurden, d. h. weder für die Negativkontrolle noch für die beiden Positivkontrollen EBV/BKV L (+) C und EBV/BKV H (+) C. In der Ergebnisübersicht werden die Negativkontrolle als (-) Ctrl und die schwach und hoch positiven Kontrollen als EBV/BKV L (+) C bzw. EBV/BKV H (+) C dargestellt.

Die cobas® 6800/8800 Software markiert Ergebnisse bei ausgefallenen Negativ- und Positivkontrollen automatisch als ungültig.

Kontroll-Flags auf den cobas® 6800/8800 Systems

Tabelle 12 Kontroll-Flags für Negativ- und Positivkontrollen

Negativkontrolle	Flag	Ergebnis	Interpretation
(-) Ctrl	Q02 (Kontrollbatch fehlerhaft)	Ungültig	Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titer für die Negativkontrolle ist nicht negativ.
Positivkontrolle	Flag	Ergebnis	Interpretation
EBV/BKV L (+) C	Q02 (Kontrollbatch fehlerhaft)	Ungültig	Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titerwert für die niedrig positive Kontrolle liegt nicht im Sollbereich.
EBV/BKV H (+) C	Q02 (Kontrollbatch fehlerhaft)	Ungültig	Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titerwert für die hoch positive Kontrolle liegt nicht im Sollbereich.

Wenn der Kontroll-Batch ungültig ist, muss der Test mit allen Proben aus dem betroffenen Batch wiederholt werden.

Interpretation der Ergebnisse

Bei gültigen Batches sind die einzelnen Proben in der Software des **cobas® 5800 Systems** bzw. der **cobas® 6800/8800 Systems** und/oder in den Berichten auf Flags zu kontrollieren. Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

- Ein gültiger Batch kann sowohl gültige als auch ungültige Probenergebnisse enthalten.

Tabelle 13 Interpretation der Ergebnisse für die einzelnen Zielsequenzen

Ergebnisse	Interpretation
Target Not Detected	BKV-DNA nicht nachgewiesen. Ergebnisse als „BKV nicht nachgewiesen“ angeben.
< Titer Min ^a	Der errechnete Titer liegt unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze des Tests. Ergebnisse als „BKV nachgewiesen, unter (Titer Min)“ angeben. EDTA-Plasma Titer min. = 21,5 IE/ml Urin Titer min. = 200 IE/ml
Titer	Der errechnete Titer liegt innerhalb des linearen Bereichs des Tests, d. h. er ist größer oder gleich Titer Min und kleiner oder gleich Titer Max. Ergebnisse als „(Titer) von BKV nachgewiesen“ angeben.
> Titer Max ^b	Der errechnete Titer liegt über der oberen Quantifizierungsgrenze des Tests. Ergebnisse als „BKV nachgewiesen, über (Titer Max)“ angeben. EDTA-Plasma und Urin Titer max. = 1,0E+08 IE/ml

^a Das Probenergebnis „< Titer Min“ (Zielsequenz nachgewiesen unter der unteren Quantifizierungsgrenze) muss im Kontext mit anderen klinischen Daten interpretiert werden und darf nicht als alleinige Grundlage für Therapieentscheidungen herangezogen werden.

^b Das Probenergebnis „> Titer Max“ bezieht sich auf BKV-positive Proben, bei denen BKV mit einem Titer über der oberen Quantifizierungsgrenze nachgewiesen wurde. Wenn ein quantitatives Ergebnis für EDTA-Plasmaproben gewünscht wird, die ursprüngliche Probe mit BKV-negativem EDTA-Humanplasma verdünnen und den Test wiederholen. Das dabei ermittelte Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Interpretation der Ergebnisse auf dem cobas® 5800 System

Die Ergebnisse der Proben werden in der **cobas® 5800 Software** in der Anwendung „Ergebnisse“ angezeigt.

Bei gültigen Kontroll-Batches die einzelnen Proben in der **cobas® 5800 Software** und/oder im Bericht auf Flags kontrollieren. Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

- Einem gültigen Kontroll-Batch zugehörige Proben werden in der Spalte „Kontrollergebnis“ als „Gültig“ angezeigt, wenn für alle Kontrollzielsequenzen das Ergebnis „Gültig“ ausgegeben wurde. Einem fehlgeschlagenen Kontroll-Batch zugehörige Proben werden in der Spalte „Kontrollergebnis“ als „Ungültig“ angezeigt, wenn für alle Kontrollzielsequenzen das Ergebnis „Ungültig“ ausgegeben wurde.
- Wenn die zu einer Probe gehörigen Kontrollen ungültig sind, wird das Probenergebnis mit einem der folgenden Flags versehen:
 - Q05D: Fehler bei der Ergebnisvalidierung infolge einer ungültigen Positivkontrolle
 - Q06D: Fehler bei der Ergebnisvalidierung infolge einer ungültigen Negativkontrolle
- Die Ergebniswerte in der Spalte „Ergebnisse“ zu den einzelnen Zielsequenzen einer Probe sind wie in Tabelle 13 oben dargestellt zu interpretieren.

Wenn mindestens eine Zielsequenz einer Probe als „Ungültig“ gekennzeichnet wurde, zeigt die **cobas® 5800 Software** einen Hinweis in der Spalte „Flags“ an. In der Detailansicht werden weitere Informationen dazu angezeigt, warum die Zielsequenz(en) der Probe als ungültig ausgegeben wurde(n) und was der Flag bedeutet.

Interpretation der Ergebnisse auf den cobas® 6800/8800 Systems

Bei gültigen Batches die einzelnen Proben in der cobas® 6800/8800 Software und/oder im Bericht auf Flags kontrollieren. Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

- Die Proben werden in der Spalte „Gültig“ mit „Ja“ gekennzeichnet, wenn für alle angeforderten Zielregionen gültige Ergebnisse erhalten wurden. Die Proben werden in der Spalte „Gültig“ mit „Nein“ gekennzeichnet, wenn ggf. zusätzliche Interpretationen und Maßnahmen erforderlich sind.
- Die Ergebniswerte zu den einzelnen Zielsequenzen einer Probe sind wie in Tabelle 13 oben dargestellt zu interpretieren.

Verfahrenseinschränkungen

- Der cobas® BKV-Test ist ausschließlich für den Gebrauch mit dem cobas® EBV/BKV Control Kit, cobas® Buffer Negative Control Kit, cobas® omni MGP Reagent, cobas® omni Lysis Reagent, cobas® omni Specimen Diluent und cobas® omni Wash Reagent auf den cobas® 5800/6800/8800 Systems validiert.
- Zuverlässige Ergebnisse hängen von der sachgemäßen Gewinnung, Lagerung und Bearbeitung der Proben ab.
- Dieser Test wurde ausschließlich für die Verwendung mit EDTA-Plasma und stabilisiertem Urin validiert. Wenn mit dem cobas® BKV-Test andere Arten von Proben getestet werden, können falsche Ergebnisse erzielt werden. Messungen der DNA-Werte in Plasma und in stabilisiertem Urin sind weder miteinander noch mit Messungen anderer Probenmaterialien direkt vergleichbar.
- Die Quantifizierung von BKV-DNA kann durch das Probenentnahmeverfahren, patientenbezogene Faktoren (d. h. Alter, Vorhandensein von Symptomen) und/oder das Infektionsstadium beeinflusst werden.
- Die Degradierung von BKV-DNA in unverdünntem Urin kann die Quantifizierung beeinflussen.¹⁷ Die Überführung von Urin in cobas® PCR Media ist erforderlich, um die Stabilität der Proben zu gewährleisten.
- Die quantitative Variabilität von BKV-DNA in Urin wurde in Tests zur Probenstabilität ermittelt, und zwar zu verschiedenen Probenahme-Zeitpunkten (unverdünnter Urin) oder in verschiedenen Aliquots der gleichen Probe (unverdünnter Urin und in cobas® PCR Media stabilisierter Urin).
- Aufgrund dieser Einschränkungen müssen Ergebnisse zur BKV-DNA in Urin mit Vorsicht sowie im Kontext mit klinischen Befunden und anderen Laborwerten interpretiert werden und dürfen nicht als alleinige Grundlage für Therapieentscheidungen herangezogen werden.
- Urin kann hohe Konzentrationen von BKV-DNA enthalten, was mit einem Risiko von Verschleppungen verbunden ist.¹⁸
- Wie bei allen molekularen Tests können Mutationen in den Zielregionen, die durch den cobas® BKV-Test abgedeckt werden, die Primer- und/oder Sondenbindung beeinträchtigen und dadurch zur Unterquantifizierung oder Nichterkennung des Virus führen.
- Bevor Benutzer zwischen verschiedenen Verfahren wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Studien zur Korrelation der Methoden durchführen, um die Unterschiede der Verfahren zu ermitteln. Außerdem sollten Benutzer stets die eigenen Richtlinien und Verfahren beachten.
- Der cobas® BKV-Test ist nicht zur Verwendung als Screening-Test für das Vorliegen von BKV in Blut oder Blutprodukten vorgesehen.

Nichtklinische Leistungsmerkmale

Wichtige Leistungsmerkmale für EDTA-Plasmaproben zu den cobas® 6800/8800 Systems

Nachweisgrenze (LoD): Internationaler WHO-Standard

Die Nachweisgrenze des cobas® BKV-Tests für den internationalen WHO-Standard wurde anhand einer Verdünnungsreihe des 1. internationalen WHO-Standards für BKV (bereitgestellt vom NIBSC: NIBSC 14/212) in BKV-negativem EDTA-Humanplasma bestimmt. Panels mit sechs Konzentrationen und einer Leerprobe wurden mit drei Chargen von cobas® BKV-Reagenzien an mehreren Tagen mit mehreren Läufen, Anwendern und Geräten getestet.

Die Ergebnisse für EDTA-Plasma sind in Tabelle 14 bis Tabelle 16 dargestellt. Die Untersuchungen ergeben, dass bei der am wenigsten empfindlichen Charge die Konzentration 21,5 IE/ml beträgt (gemäß PROBIT wird für die Konzentration bei einem 95 %-Konfidenzintervall zwischen 16,3 und 32,4 IE/ml in EDTA-Plasma eine Trefferquote von 95 % erwartet). Die geringste Konzentration mit einer Trefferquote von ≥ 95 % in EDTA-Plasma beträgt 19,0 IE/ml.

Tabelle 14 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, Charge 1

Ausgangstiterkonzentration (BKV-DNA, IE/ml)	Anzahl der gültigen Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	46	73,0
4,75	63	36	57,1
2,38	63	23	36,5
0	62	0	0,0
LoD gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	21,5 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 16,3–32,4 IE/ml		

Tabelle 15 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, Charge 2

Ausgangstiterkonzentration (BKV-DNA, IE/ml)	Anzahl der gültigen Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
80,0	62	62	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	61	96,8
9,5	63	48	76,2
4,75	63	34	54,0
2,38	62	23	37,1
0	62	0	0,0
LoD gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	19,7 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 15,0–29,2 IE/ml		

Tabelle 16 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma, Charge 3

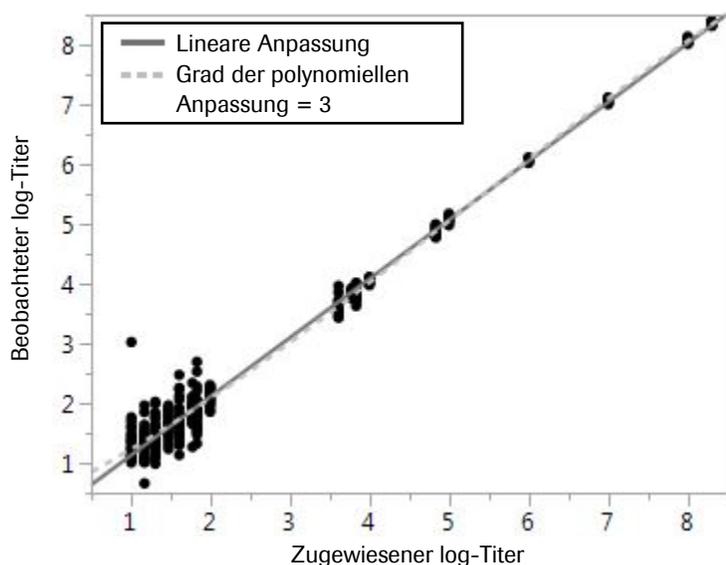
Ausgangstiterkonzentration (BKV-DNA, IE/ml)	Anzahl der gültigen Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	50	79,4
4,75	63	35	55,6
2,38	63	22	35,0
0	63	0	0,0
LoD gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	19,3 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 14,8–28,5 IE/ml		

Linearer Bereich

Die Linearität des **cobas**® BKV-Tests wurde anhand einer Verdünnungsreihe aus 18 Panelproben evaluiert, die BKV-DNA der Subgruppe Ib über den gesamten linearen Bereich des Tests enthielten. 11 Panelproben, die den gesamten linearen Bereich des Tests abdecken, wurden aus einer Lambda-DNA-Stammlösung mit hohem Titer hergestellt. 7 Panelproben, die den unteren und mittleren Bereich des Tests abdecken, wurden aus einer klinischen Probe hergestellt.

Jede Panelprobe wurde mit 36 Replikaten über drei Chargen von **cobas**® BKV-Testreagenzien getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 5 dargestellt.

Es wurde gezeigt, dass der lineare Bereich des **cobas**® BKV-Tests von 1,01E+01 IE/ml bis 1,97E+08 IE/ml reicht und die absolute Abweichung von der nichtlinearen Regression in EDTA-Humanplasma maximal $\pm 0,1 \log_{10}$ beträgt (siehe Abbildung 5). Im gesamten linearen Bereich liegt die Genauigkeit des Tests innerhalb von $\pm 0,2 \log_{10}$.

Abbildung 5 Bestimmung des linearen Bereichs für EDTA-Plasma

Laborinterne Präzision

Die Präzision des **cobas**® BKV-Tests wurde anhand einer Verdünnungsreihe bestimmt, bei der BKV-DNA der Subgruppe Ib mit hohem Titer in BKV-negativem EDTA-Plasma analysiert wurde. Dabei wurden an 12 Tagen unter Verwendung von vier Geräten und zwei Anwendern fünf Verdünnungsstufen mit 72 Replikaten für jede Verdünnung über drei Chargen von **cobas**® BKV-Reagenzien getestet. Alle Proben durchliefen das gesamte **cobas**® BKV-Testverfahren auf vollautomatisierten **cobas**® 6800/8800 Systems. Die hier angegebene Präzision spiegelt daher alle Aspekte des Testverfahrens wider. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Der **cobas**® BKV-Test zeigte für drei Chargen von Reagenzien, die über einen Konzentrationsbereich von 9,83E+01 IE/ml bis 9,83E+05 IE/ml getestet wurden, eine hohe Präzision.

Tabelle 17 Laborinterne Präzision des **cobas**® BKV-Tests*

Nennkonzentration [IE/ml]	Zugewiesene Konzentration [IE/ml]	EDTA-Plasma			
		Charge 1	Charge 2	Charge 3	Alle Chargen
		SD	SD	SD	SD gepoolt
1,00E+06	9,83E+05	0,02	0,02	0,04	0,03
1,00E+05	9,83E+04	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+04	9,83E+03	0,04	0,05	0,03	0,04
6,00E+03	5,90E+03	0,03	0,05	0,03	0,04
1,00E+02	9,83E+01	0,09	0,11	0,11	0,11

* Titerdaten werden als log-normalverteilt betrachtet und nach der \log_{10} -Transformation analysiert. In den Spalten zur Standardabweichung (SD) sind die log-transformierten Gesamttiter für die drei Reagenzchargen angegeben.

Subtypverifizierung

Die Leistung des **cobas**® BKV-Tests hinsichtlich der BKV-Subtypen I (Subgruppen Ia und Ic), II, III und IV wurde wie folgt evaluiert:

- Verifizierung der Nachweisgrenze
- Verifizierung des linearen Bereichs

Verifizierung der Nachweisgrenze für die Subtypen I (Subgruppen Ia und Ic), II, III und IV

Die BKV-DNA der fünf unterschiedlichen Subtypen/Subgruppen (Ia, Ic, II, III und IV) wurde in BKV-negativem EDTA-Plasma auf drei verschiedene Konzentrationen verdünnt. Die Trefferquote wurde mit 63 Replikaten je Konzentration bestimmt. Die Tests wurden mit drei Chargen der **cobas**® BKV-Reagenzien an mehreren Tagen mit mehreren Läufen, Anwendern und Geräten durchgeführt. Diese Ergebnisse belegen, dass mit dem **cobas**® BKV-Test BKV-DNA von fünf unterschiedlichen Subtypen/Subgruppen in Konzentrationen von 21,5 IE/ml mit einer Trefferquote von $\geq 95\%$ nachgewiesen werden kann.

Verifizierung des linearen Bereichs für die Subtypen I (Subgruppen Ia und Ic), II, III und IV

Die zur Verifizierung der Subtypen-/Subgruppenlinearität des **cobas**® BKV-Tests verwendete Verdünnungsreihe umfasste acht Panelproben, die den gesamten linearen Bereich des Tests abdecken. Die Tests wurden mit drei Chargen der **cobas**® BKV-Reagenzien durchgeführt. Es wurden 12 Replikate je Konzentration in EDTA-Plasma getestet.

Der lineare Bereich des **cobas**® BKV-Tests wurde für alle fünf Subtypen/Subgruppen (Ia, Ic, II, III und IV) verifiziert.

Spezifität

Die Spezifität des **cobas**® BKV-Tests wurde durch die Analyse von BKV-negativen EDTA-Plasmaproben von Einzelspendern bestimmt. Dazu wurden 104 EDTA-Plasmaproben mit drei Chargen von **cobas**® BKV-Reagenzien getestet. Alle Proben wurden negativ auf BKV-DNA getestet. Die Spezifität des **cobas**® BKV-Tests betrug im Test-Panel 100 % (unteres einseitiges 95-%-Konfidenzintervall: 97,16 %).

Analytische Spezifität

Zur Evaluierung der analytischen Spezifität des **cobas**® BKV-Tests wurde ein Panel aus Mikroorganismen für Bakterien und Hefe in einer Konzentration von $1,00E+06$ Einheiten/ml (CFU/ml, Zellen/ml, CCU/ml, IFU/ml) und für Viren in einer Konzentration zwischen $1,00E+05$ Einheiten/ml und $1,00E+06$ Einheiten/ml (Kopien/ml, TCID₅₀/ml, IE/ml, Zellen/ml) getestet. Mikroorganismen wurden sowohl mit humanem EDTA-Plasma ohne BKV-DNA als auch mit humanem EDTA-Plasma mit BKV-DNA (100 IE/ml) verdünnt. Die verwendeten Organismen sind in Tabelle 18 aufgeführt. Jede Probe wurde in Replikaten von drei bestimmt. Keines der Nicht-BKV-Pathogene beeinträchtigte in den angegebenen Konzentrationen die Testleistung. Der **cobas**® BKV-Test lieferte für alle Mikroorganismenproben ohne BKV-Zielsequenz negative Ergebnisse und für alle Mikroorganismenproben mit BKV-Zielsequenz positive Ergebnisse. Darüber hinaus lag der mittlere \log_{10} -Titer bei allen BKV-positiven Proben, die potenziell zu Kreuzreaktivität führende Organismen enthielten, innerhalb von $\pm 0,5 \log_{10}$ Abstand zum mittleren \log_{10} -Titer der betreffenden Positivkontrolle.

Tabelle 18 Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität getestete Mikroorganismen

Viren	Bakterien	Hefen
Adenovirus Typ 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Cytomegalievirus	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Epstein-Barr-Virus	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Hepatitis-B-Virus	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Hepatitis-C-Virus	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
Herpes-simplex-Virus Typ 1	<i>Escherichia coli</i>	-
Herpes-simplex-Virus Typ 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Humanes Herpesvirus Typ 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Humanes Herpesvirus Typ 7	<i>Mycobacterium avium</i>	-
Humanes Herpesvirus Typ 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Humanes Immundefizienz-Virus Typ 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Humanes Papillomavirus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
JC-Virus	<i>Salmonella enterica</i>	-
Parvovirus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Simian-Virus 40	-	-
Varicella-Zoster-Virus	-	-

Analytische Spezifität – Störsubstanzen

Es wurden Proben mit erhöhten Werten von Triglyzeriden (33 g/l), konjugiertem Bilirubin (0,2 g/l), unkonjugiertem Bilirubin (0,2 g/l), Albumin (60 g/l), Hämoglobin (2 g/l) und erhöhten Human-DNA-Werten (2 mg/l) mit (100 IE/ml) und ohne BKV-DNA getestet. Die getesteten endogenen potenziellen Störsubstanzen haben nachweislich keinen störenden Einfluss auf die Leistung des cobas® BKV-Tests.

Zusätzlich wurden die in Tabelle 19 aufgeführten Wirkstoffe in dreifacher C_{max} -Konzentration mit und ohne BKV-DNA getestet.

Keine der potenziellen Störsubstanzen führte zu einer Störung der Testleistung. Der cobas® BKV-Test lieferte für alle Proben ohne BKV-Zielsequenz negative Ergebnisse und für alle Proben mit BKV-Zielsequenz positive Ergebnisse. Darüber hinaus lag der mittlere \log_{10} -Titer bei allen BKV-positiven Proben, die potenzielle Störsubstanzen enthielten, innerhalb von $\pm 0,5 \log_{10}$ Abstand zum mittleren \log_{10} -Titer der entsprechenden zugesetzten Positivkontrolle.

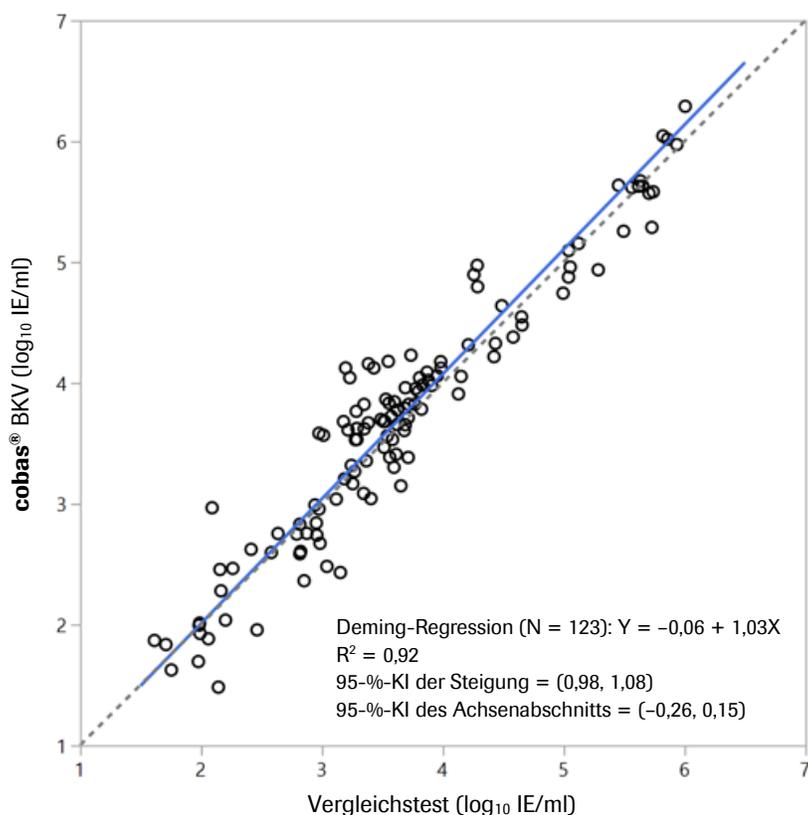
Tabelle 19 Wirkstoffe, die auf einen möglichen störenden Einfluss auf die quantitative Bestimmung von BKV-DNA mit dem cobas® BKV-Test getestet wurden

Wirkstoffklasse	Freiname	
Antimikrobiotikum	Cefotetan	Sulfamethoxazol
	Clavulanat-Kalium	Ticarcillin-Dinatrium
	Fluconazol	Trimethoprim
	Piperacillin	Vancomycin
	Tazobactam-Natrium	Micafungin
Substanzen zur Behandlung von Herpes-Viren	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Acyclovir	Letermovir
Immunsuppressiva	Azathioprin	Prednison
	Ciclosporin	Sirolimus
	Everolimus	Tacrolimus
	Mycophenolat-Mofetil	Mycophenolsäure

Korrelation der Methoden

Die Leistung des cobas® BKV-Tests wurde anhand eines Vergleichstests ermittelt, in dem EDTA-Plasmaproben BKV-infizierter Patienten analysiert wurden. Die EDTA-Plasmaproben lagen bei beiden Tests innerhalb des Quantifizierungsbereichs und wurden in einzelnen Replikaten getestet. Es wurde eine Deming-Regressionsanalyse durchgeführt.

Die Ergebnisse der Deming-Regression sind in Abbildung 6 dargestellt.

Abbildung 6 Regressionsanalyse des cobas® BKV-Tests im Vergleich zum Vergleichstest

Gesamtsystemausfall

Zur Ermittlung der Gesamtsystemausfall-Rate für den cobas® BKV-Test wurden 100 Replikate von EDTA-Plasma getestet, das mit BKV-positiven klinischen Proben versetzt wurde. Diese Proben wurden mit einer Konzentration der 3fachen Nachweisgrenze getestet.

Die Studie ergab, dass alle Replikate gültig und für die BKV-Zielsequenz positiv waren, was einer Gesamtsystemausfall-Rate von 0 % entspricht (oberes einseitiges 95%-Konfidenzintervall: 2,95 %).

Kreuzkontamination

Zur Ermittlung der Kreuzkontaminationsrate des cobas® BKV-Tests wurden 240 Replikate einer normalen BKV-negativen Matrixprobe sowie 225 Replikate einer Probe mit hohem BKV-DNA-Titer von ungefähr $2,00E+07$ IE/ml getestet. Es wurden insgesamt fünf Läufe mit Positiv- und Negativproben in Schachbrettkonfiguration durchgeführt.

Alle 240 Replikate der Negativprobe waren negativ, was einer Kreuzkontaminationsrate von 0 % entspricht (oberes einseitiges 95%-Konfidenzintervall: 1,24 %).

Wichtige Leistungsmerkmale für Urinproben zu den cobas® 6800/8800 Systems

Nachweisgrenze (LoD): Internationaler WHO-Standard

Die Nachweisgrenze des cobas® BKV-Tests für den internationalen WHO-Standard wurde anhand einer Verdünnungsreihe des 1. internationalen WHO-Standards für BKV (bereitgestellt vom NIBSC: NIBSC 14/212) in BKV-negativem, in cobas® PCR Media stabilisiertem, gepoolten Urin bestimmt. Panels mit sechs Konzentrationen und einer Leerprobe wurden mit drei Chargen von cobas® BKV-Reagenzien an mehreren Tagen mit mehreren Läufen, Anwendern und Geräten getestet.

Die Ergebnisse für in cobas® PCR Media stabilisierten, gepoolten Urin sind in Tabelle 20 bis Tabelle 22 aufgeführt. Die Untersuchungen ergeben, dass bei der am wenigsten empfindlichen Charge die Konzentration 12,2 IE/ml beträgt (gemäß PROBIT wird für die Konzentration bei einem 95 %-Konfidenzintervall zwischen 9,2 und 18,3 IE/ml in unverdünntem Urin eine Trefferquote von 95 % erwartet). Die niedrigste Konzentration mit einer Trefferquote von ≥ 95 % in unverdünntem Urin beträgt 10,0 IE/ml.

Tabelle 20 Nachweisgrenze in Urin, Charge 1

Ausgangstiterkonzentration (BKV-DNA, IE/ml)*	Anzahl der gültigen Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	47	74,6
2,5	63	25	39,7
1,25	63	26	41,3
0	63	0	0,0
LoD gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	12,2 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 9,2–18,3 IE/ml		

* In cobas® PCR Media stabilisierte Urinproben. Ausgangstiterkonzentration für Berechnung basiert auf unverdünntem Urin.

Tabelle 21 Nachweisgrenze in Urin, Charge 2

Ausgangstiterkonzentration (BKV-DNA, IE/ml)*	Anzahl der gültigen Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	42	66,7
2,5	63	32	50,8
1,25	63	17	27,0
0	63	0	0,0
LoD gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	11,9 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 9,2–17,3 IE/ml		

* In cobas® PCR Media stabilisierte Urinproben. Ausgangstiterkonzentration für Berechnung basiert auf unverdünntem Urin.

Tabelle 22 Nachweisgrenze in Urin, Charge 3

Ausgangstiterkonzentration (BKV-DNA, IE/ml)*	Anzahl der gültigen Replikate	Anzahl positiver Replikate	Trefferquote in %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	61	96,8
5,0	63	46	73,0
2,5	63	39	61,9
1,25	63	19	30,2
0	63	0	0,0
LoD gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote	10,1 IE/ml 95 %-Konfidenzintervall: 7,8–14,7 IE/ml		

* In cobas® PCR Media stabilisierte Urinproben. Ausgangstiterkonzentration für Berechnung basiert auf unverdünntem Urin.

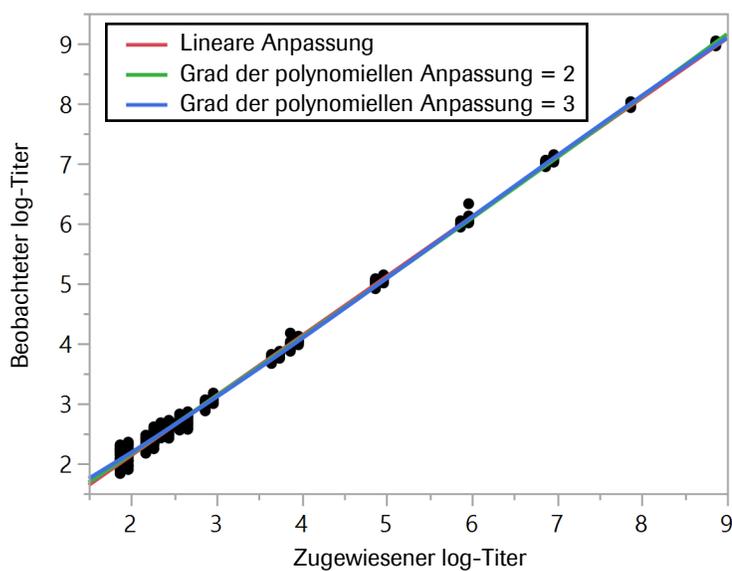
Linearer Bereich

Die Linearität des **cobas**® BKV-Tests wurde anhand einer Verdünnungsreihe aus 10 Panelproben und unter Verwendung einer klinischen Probe (mit BKV der Subgruppe Ib) über den gesamten linearen Bereich des Tests evaluiert. 12 Panelproben, die den gesamten linearen Bereich des Tests abdecken, wurden aus einer Lambda-DNA-Stammlösung mit hohem Titer hergestellt.

Jede Panelprobe wurde mit 36 Replikaten über drei Chargen von **cobas**® BKV-Testreagenzien getestet. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 7 dargestellt.

Es wurde gezeigt, dass der lineare Bereich des **cobas**® BKV-Tests von $7,41E+01$ IE/ml bis $7,41E+08$ IE/ml reicht und die absolute Abweichung von der nichtlinearen Regression in **cobas**® PCR Media stabilisiertem, gepoolten Urin maximal $\pm 0,1 \log_{10}$ beträgt (siehe Abbildung 7). Im gesamten linearen Bereich liegt die Genauigkeit des Tests innerhalb von $\pm 0,2 \log_{10}$.

Abbildung 7 Bestimmung des linearen Bereichs für Urin



Laborinterne Präzision

Die Präzision des **cobas**® BKV-Tests wurde anhand einer Verdünnungsreihe bestimmt, bei der BKV-DNA der Subgruppe Ib mit hohem Titer in BKV-negativem, in **cobas**® PCR Media stabilisiertem, gepoolten Urin analysiert wurde. Dabei wurden an 12 Tagen unter Verwendung von zwei Geräten und zwei Anwendern fünf Verdünnungsstufen mit 72 Replikaten für jede Verdünnung über drei Chargen von **cobas**® BKV-Reagenzien getestet. Alle Proben durchliefen das gesamte **cobas**® BKV-Testverfahren auf vollautomatisierten **cobas**® 6800/8800 Systems. Die hier angegebene Präzision spiegelt daher alle Aspekte des Testverfahrens wider. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Der **cobas**® BKV-Test zeigt für drei Chargen von Reagenzien, die über einen Konzentrationsbereich von $7,41E+02$ IE/ml bis $7,41E+05$ IE/ml getestet wurden, eine hohe Präzision.

Tabelle 23 Laborinterne Präzision des **cobas®** BKV-Tests*

Nennkonzentration [IE/ml]	Zugewiesene Konzentration [IE/ml]	In cobas® PCR Media stabilisierter Urin			
		Charge 1	Charge 2	Charge 3	Alle Chargen
		SD	SD	SD	SD gepoolt
1,00E+06	7,41E+05	0,02	0,02	0,02	0,02
1,00E+05	7,41E+04	0,02	0,03	0,02	0,03
1,00E+04	7,41E+03	0,03	0,03	0,03	0,03
6,00E+03	4,44E+03	0,04	0,03	0,04	0,03
1,00E+03	7,41E+02	0,05	0,05	0,04	0,05

* Titerdaten werden als log-normalverteilt betrachtet und nach der \log_{10} -Transformation analysiert. In den Spalten zur Standardabweichung (SD) sind die log-transformierten Gesamttiter für die drei Reagenzchargen angegeben.

Subtypverifizierung

Die Leistung des **cobas®** BKV-Tests hinsichtlich der BKV-Subtypen I (Subgruppen Ia und Ic), II, III und IV wurde wie folgt evaluiert:

- Verifizierung der Nachweisgrenze
- Verifizierung des linearen Bereichs

Verifizierung der Nachweisgrenze für die Subtypen I (Subgruppen Ia und Ic), II, III und IV

Die BKV-DNA der fünf unterschiedlichen Subtypen/Subgruppen (Ia, Ic, II, III und IV) wurde in BKV-negativem, in **cobas®** PCR Media stabilisiertem, gepooltem Urin auf drei verschiedene Konzentrationen verdünnt. Die Trefferquote wurde mit 63 Replikaten je Konzentration bestimmt. Die Tests wurden mit drei Chargen der **cobas®** BKV-Reagenzien an mehreren Tagen mit mehreren Läufen, Anwendern und Geräten durchgeführt. Diese Ergebnisse belegen, dass mit dem **cobas®** BKV-Test BKV-DNA von fünf unterschiedlichen Subtypen/Subgruppen in Konzentrationen von 12,2 IE/ml mit einer Trefferquote von ≥ 95 % nachgewiesen werden kann.

Verifizierung des linearen Bereichs für die Subtypen I (Subgruppen Ia und Ic), II, III und IV

Die zur Verifizierung der Subtypen-/Subgruppenlinearität des **cobas®** BKV-Tests verwendete Verdünnungsreihe umfasste acht Panelproben, die den gesamten linearen Bereich des Tests abdecken. Die Tests wurden mit drei Chargen der **cobas®** BKV-Reagenzien durchgeführt. Es wurden 12 Replikate je Konzentration in **cobas®** PCR Media stabilisiertem Urin getestet.

Der lineare Bereich des **cobas®** BKV-Tests wurde für alle fünf Subtypen/Subgruppen (Ia, Ic, II, III und IV) verifiziert.

Spezifität

Die Spezifität des **cobas®** BKV-Tests wurde durch die Analyse von BKV-negativen, in **cobas®** PCR Media stabilisierten Urinproben von Einzelspendern bestimmt. Dazu wurden 100 Urinproben mit drei Chargen von **cobas®** BKV-Reagenzien getestet. Alle Proben wurden negativ auf BKV-DNA getestet. Die Spezifität des **cobas®** BKV-Tests betrug im Test-Panel 100 % (unteres einseitiges 95%-Konfidenzintervall: 97,05 %).

Analytische Spezifität

Zur Evaluierung der analytischen Spezifität des **cobas**® BKV-Tests wurde ein Panel aus Mikroorganismen für Bakterien und Hefe in einer Konzentration zwischen 1,00E+06 Einheiten/ml und 2,00E+06 Einheiten/ml (CFU/ml, Zellen/ml, CCU/ml, IFU/ml) und für Viren in einer Konzentration von 1,00E+05 Einheiten/ml (Kopien/ml, TCID₅₀/ml, IE/ml, Zellen/ml) getestet. Mikroorganismen wurden sowohl mit Urin ohne BKV-DNA als auch mit Urin mit BKV-DNA (600 IE/ml) verdünnt. Die verwendeten Organismen sind in Tabelle 24 aufgeführt. Jede Probe wurde in Replikaten von drei bestimmt. Keines der Nicht-BKV-Pathogene beeinträchtigte in den angegebenen Konzentrationen die Testleistung. Der **cobas**® BKV-Test lieferte für alle Mikroorganismenproben ohne BKV-Zielsequenz negative Ergebnisse und für alle Mikroorganismenproben mit BKV-Zielsequenz positive Ergebnisse. Darüber hinaus lag der mittlere log₁₀-Titer bei allen BKV-positiven Proben, die potenziell zu Kreuzreaktivität führende Organismen enthielten, innerhalb von ±0,5 log₁₀ Abstand zum mittleren log₁₀-Titer der betreffenden Positivkontrolle.

Tabelle 24 Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität getestete Mikroorganismen

Viren	Bakterien	Bakterien	Hefen
Herpes-simplex-Virus 2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
Humanes Papillomavirus 16	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida glabrata</i>
-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
-	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Candida tropicalis</i>
-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	-
-	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
-	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus oralis/viridans</i>	-
-	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	-
-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-
-	<i>Treponema pallidum</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-
-	<i>Lactobacillus crispatus</i>	-	-
-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	-
-	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus jensenii</i>	-	-
-	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	-	-
-	<i>Morganella morganii</i>	-	-

Analytische Spezifität – Störsubstanzen

Es wurden Proben mit erhöhten Werten von Albumin (0,5 % Massenvol.-%), konjugiertem Bilirubin (1 % Massenvol.-%), Glukose (1 % Massenvol.-%), mononukleären Zellen des peripheren Blutes (1,00E+06 Zellen/ml), Schleim (mit 1 Schleimhautabstrich pro 4,3 ml Probe), saurem pH (pH-Wert 4), alkalischem pH (pH-Wert 9), Sperma (1 in Sperma getauchter Tupfer pro 4,3 ml Probe), Natrium (300 Äq./l) und Vollblut (10 Vol.-%) mit (600 IE/ml) und ohne BKV-DNA getestet. Die getesteten endogenen potenziellen Störsubstanzen haben nachweislich keinen störenden Einfluss auf die Leistung des **cobas**® BKV-Tests.

Zusätzlich wurden die in Tabelle 25 aufgeführten Wirkstoffe mit und ohne BKV-DNA getestet.

Keine der potenziellen Störsubstanzen mit Ausnahme von Talkum führte zu einer Störung der Testleistung. Auch Talkum führte bei $\leq 0,05$ % nicht zu einer Störung des **cobas**® BKV-Tests. Der **cobas**® BKV-Test lieferte für alle Proben ohne BKV-Zielsequenz negative Ergebnisse und für alle Proben mit BKV-Zielsequenz positive Ergebnisse. Darüber hinaus lag der mittlere \log_{10} -Titer bei allen BKV-positiven Proben, die potenzielle Störsubstanzen enthielten, innerhalb von $\pm 0,5 \log_{10}$ Abstand zum mittleren \log_{10} -Titer der entsprechenden zugesetzten Positivkontrolle.

Tabelle 25 Wirkstoffe, die auf einen möglichen störenden Einfluss auf die quantitative Bestimmung von BKV-DNA mit dem **cobas**® BKV-Test getestet wurden

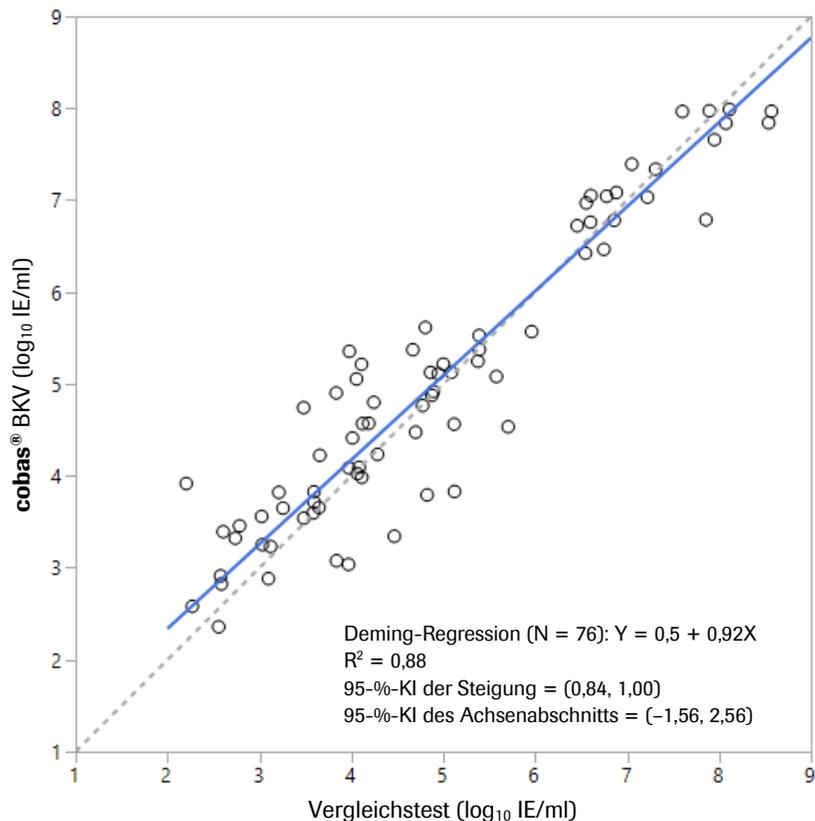
Wirkstoffklasse	Aktiver Bestandteil	Konzentration	Freiname
Antimikrobiotikum	Clotrimazol	100 µg/ml	Gyne-Lotrimin 7 (Antimykotikum)
	Metronidazol	701 µmol/l	Arilin rapid Vaginalsuppositorien Vagi Metro Cream (Vaginaltherapeutikum) Nidazea Gel (anti-entzündliches Gel)
Östrogene Steroidhormone	Estradiol	4,41 nmol/l	Estrace (Östrogenpräparat)
Analgetikum	Phenazopyridinhydrochlorid	200 µg/ml	Azo Standard (Schmerzmittel)
	Acetaminophen	1324 µmol/l	Acetaminophen
Gleitmittel	Propylenglykol	1000 µg/ml	K-Y UltraGel
Nicht-steroidales Antirheumatikum	Acetylsalicylsäure	3,62 mmol/l	Acetylsalicylsäure
	Naproxen	2170 µmol/l	Naproxen
	Ibuprofen	2425 µmol/l	Ibuprofen
Keine Angabe	Talk	0,05 % (Massenvol.-%)	Talkum

Korrelation der Methoden

Die Leistung des **cobas**® BKV-Tests wurde anhand eines Vergleichstests ermittelt, in dem Urinproben BKV-infizierter Patienten analysiert wurden. Die Urinproben lagen bei beiden Tests innerhalb des Quantifizierungsbereichs und wurden in einzelnen Replikaten getestet. Es wurde eine Deming-Regressionsanalyse durchgeführt.

Die Ergebnisse der Deming-Regression sind in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8 Regressionsanalyse des **cobas**® BKV-Tests im Vergleich zum Vergleichstest



Kreuzkontamination

Zur Ermittlung der Kreuzkontaminationsrate des **cobas**® BKV-Tests wurden 240 Replikate einer normalen BKV-negativen Matrixprobe sowie 225 Replikate einer Probe mit hohem BKV-DNA-Titer von ungefähr $1,00E+09$ IE/ml getestet. Es wurden insgesamt fünf Läufe mit Positiv- und Negativproben in Schachbrettkonfiguration durchgeführt.

Alle 240 Replikate der Negativprobe waren negativ, was einer Kreuzkontaminationsrate von 0,0 % entspricht (oberes einseitiges 95-%-Konfidenzintervall: 1,24 %).

Klinische Leistungsmerkmale für die cobas® 6800/8800 Systems

Reproduzierbarkeit des cobas® BKV-Tests für EDTA-Plasmaproben

Die Reproduzierbarkeit des cobas® BKV-Tests wurde unter Einbeziehung von Faktoren (Reagenzcharge, Testzentrum, Batch und Testtag) evaluiert, die sich bei routinemäßigen klinischen Tests darauf auswirken könnten, welche Ergebnisse erzielt werden. Die Untersuchung wurde an 3 Testzentren mit 3 Reagenzchargen eines aus positiven sowie eines aus negativen Proben bestehenden Probenpanels durchgeführt. Daraus ergibt sich eine Gesamtanzahl von 270 Tests pro Konzentration (ohne Kontrollen). Beide Panels wurden mit für das BKV-Kapsidantigen spezifische IgG negativem EDTA-Plasma erstellt, mittels eines Plasma-NAT-Freigabeprotokolls auf BKV getestet und mit einem internationalen WHO-Standard für BKV oder kultivierter Virus-DNA des BKV-Genotyps Ib (häufigster Genotyp) versetzt. Zwei Anwender an jedem Standort testeten jede Reagenzcharge über einen Zeitraum von 5 Tagen. Es wurden 2 Läufe (1 Lauf = 1 Batch; 1 Batch = 1 Panel + 3 Kontrollen) pro Tag durchgeführt, und für jeden Lauf wurden 3 Replikate jeder Panelprobe analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26 Zuordenbarer Prozentsatz der Gesamtvarianz (% TV), Standardabweichung (SD) der Gesamtpräzision und lognormaler VK (%) der BKV-DNA-Konzentration (\log_{10} IE/ml) nach positiver Panelprobe

Erwartungswert der BKV-DNA-Konzentration (\log_{10} IE/ml)	Gemessene mittlere ^a BKV-DNA-Konzentration (\log_{10} IE/ml)	Anzahl der Tests ^b	Charge % TV ^c (VK %) ^d	Testzentrum % TV ^c (VK %) ^d	Tag/Anwender % TV ^c (VK %) ^d	Batch % TV ^c (VK %) ^d	Innerhalb eines Batches % TV ^c (VK %) ^d	Gesamtpräzision SD ^e	Lognormaler VK (%) der Gesamtpräzision ^d
1,81	1,74	270	9 % (20,63)	6 % (17,69)	0 % (0,00)	7 % (19,15)	78 % (68,05)	0,304	79,43
3,70	3,52	270	10 % (9,79)	10 % (9,57)	14 % (11,44)	25 % (15,16)	40 % (19,38)	0,131	30,91
4,70	4,51	270	3 % (4,42)	24 % (13,46)	0 % (0,00)	56 % (20,58)	17 % (11,27)	0,118	27,71
5,70	5,54	270	7 % (5,66)	28 % (11,50)	0 % (0,00)	40 % (13,85)	25 % (10,84)	0,094	21,94
7,70	7,62	269	4 % (3,27)	49 % (11,00)	0 % (0,00)	13 % (5,60)	34 % (9,10)	0,068	15,74

^a Mittels SAS-MIXED-Verfahren berechnet.

^b Anzahl der gültigen Tests mit nachweisbarem DNA-Wert.

^c % TV = Prozentualer Anteil an der Gesamtvarianz.

^d VK % = Lognormaler prozentualer Variationskoeffizient = $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Anhand Gesamtvariabilität aus SAS-MIXED-Verfahren berechnet.

Hinweis: Die Tabelle umfasst nur Ergebnisse mit nachweisbarem DNA-Wert. SD = Standardabweichung. VK = Variationskoeffizient; BKV = BK-Virus.

Der cobas® BKV-Test wies für Konzentrationen innerhalb des gesamten linearen Bereichs eine akzeptable klinische Reproduzierbarkeit auf. Zudem erkannte das System 100 % der Proben mit einer Konzentration der 3fachen LLoQ korrekt. Das cobas® 6800 und das cobas® 8800 System haben den gleichen modularen Aufbau und erwiesen sich bei Verwendung des cobas® BKV-Tests als äquivalent. Alle ermittelten Grenzen der 95-%-Konfidenzintervalle für die Differenz zwischen 2 Messungen für denselben Patienten lagen im Bereich von $\pm 0,84 \log_{10}$ IE/ml. Dies bedeutet, dass der Test als klinisch relevant erachtete Änderungen der BKV-DNA-Konzentration feststellen kann.

Bei den 270 gültigen Tests für die negativen Panelproben, die auf den **cobas**® 6800/8800 Systems durchgeführt wurden, wurde für alle Proben das Ergebnis „Target Not Detected“ ausgegeben. Damit lag die negative Übereinstimmung in Prozent (NPA) bei 100 % mit einem exakten 95-%-KI von 98,6 % bis 100 %.

Leistungsmerkmale des **cobas**® BKV-Tests für EDTA-Plasmaproben

Die klinischen Leistungsmerkmale des **cobas**® BKV-Tests wurden an drei Testzentren näher untersucht. Dazu wurde die BKV-DNA-Konzentration sowohl in klinischen Proben (unverdünnte und verdünnte) von mit BKV infizierten und nicht infizierten Patienten als auch in künstlich hergestellten EDTA-Plasmaproben, die mit einem BK-Kulturvirus versetzt wurden, gemessen. Als Vergleichstest diente ein etablierter laborentwickelter Nukleinsäuretest, hier „Vergleichs-BKV-LDT“ genannt (LDT: Laboratory Developed Test). Von allen mit dem **cobas**® BKV-Test und dem BKV-Vergleichstest getesteten Proben waren 550 (217 unverdünnte und 303 verdünnte klinische Proben von 129 Transplantatempfängern sowie 30 künstlich hergestellte Proben) in beiden Tests gültig und für die Analyse der klinischen Konkordanz auswertbar (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27 Konkordanzanalyse zwischen dem **cobas**® BKV-Test und dem Vergleichs-LDT zu den BKV-DNA-Konzentrationsergebnissen für alle Proben

cobas ® BKV (log ₁₀ IE/ml)	Vergleichs- BKV-LDT (log ₁₀ IE/ml) Target Not Detected	Vergleichs- BKV-LDT (log ₁₀ IE/ml) < LLoQ (< 2,3)	Vergleichs- BKV-LDT (log ₁₀ IE/ml) 2,3 bis < 3,0	Vergleichs- BKV-LDT (log ₁₀ IE/ml) 3,0 bis < 3,7	Vergleichs- BKV-LDT (log ₁₀ IE/ml) 3,7 bis 4,4	Vergleichs- BKV-LDT (log ₁₀ IE/ml) > 4,4	Gesamt
Target Not Detected	107	7	5	0	0	0	119
< LLoQ (< 2,3)	23	51	39	0	0	0	113
2,3 bis < 3,0	0	3	40	62	1	0	106
3,0 bis < 3,7	0	0	1	71	42	0	114
3,7 bis 4,4	0	0	0	0	26	26	52
> 4,4	0	0	0	0	1	45	46
Gesamt	130	61	85	133	70	71	550
Übereinstimmung Spalte (%)	(130/130) 100,0 %	(61/61) 100,0 %	(80/85) 94,1 %	(133/133) 100,0 %	(69/70) 98,6 %	(71/71) 100,0 %	-
(95-%-KI) ^a	(97,1 %, 100 %)	(94,1 %, 100,0 %)	(87,0 %, 97,5 %)	(97,2 %, 100,0 %)	(92,3 %, 99,7 %)	(94,9 %, 100,0 %)	-

Hinweis: KI = Konfidenzintervall; LLoQ = untere Quantifizierungsgrenze des Vergleichs-BKV-LDT (200 IE/ml = 2,3 log₁₀ IE/ml). Für den Vergleichs-BKV-LDT wurde eine Standardabweichung von 0,37 log₁₀ IE/ml ermittelt (Studie der Indiana University zur analytischen Präzision des BKV-LDT). Eine Analytkonzentration von 3,0 log₁₀ IE/ml entsprach der LLoQ + 2σ, 3,7 log₁₀ IE/ml entsprachen der LLoQ + 4σ und 4,4 log₁₀ IE/ml entsprachen der LLoQ + 6σ mit einem Bereichsintervall von 2σ. In diese Tabelle wurden die gepaarten Proben aufgenommen, die für die Analyse der klinischen Konkordanz auswertbar waren.

^a Es wurde angenommen, dass alle Proben voneinander unabhängig sind.

Als nicht übereinstimmend waren Ergebnisse definiert, die weiter als ein Kästchen von der Diagonalen entfernt sind (grau dargestellt). Für „Übereinstimmung Spalte“, in der Spalte „Target Not Detected“ für den Vergleichs-BKV-LDT, wurden die Zahlen für „Target Not Detected“ und „< LLoQ (< 2,3)“ für den **cobas**® BKV-Test zusammengeführt. Der Grund dafür, die Zellen für „< LLoQ“ und „Target Not Detected“ für die Spalte „Target Not Detected“ zusammenzunehmen, ist, dass der Unterschied zwischen keinem nachgewiesenen Ziel und einer Konzentration unterhalb der unteren

Quantifizierungsgrenze klinisch nicht erheblich ist und beide sich aus analytischer Sicht im unteren Messbereich befinden, der anfällig für zufällige Abweichungen ist.

Von den 43 für BKV-DNA negativen Proben, die für die Bestimmung der NPA beim **cobas**® BKV-Test zusammengestellt wurden, waren alle 43 Proben im **cobas**® BKV-Test negativ. Damit lag die NPA bei 100 % mit einem exakten 95%-KI von 91,8 % bis 100 %.

Die Konkordanz zwischen dem **cobas**® BKV-Test und dem Vergleichs-BKV-LDT wurde zudem anhand verschiedener klinischer Schwellenwerte ausgewertet (Tabelle 28).

Tabelle 28 Zusammenfassung der Konkordanz zwischen dem **cobas**® BKV-Test und dem Vergleichs-BKV-LDT für alle Proben anhand verschiedener Schwellenwerte

Schwellenwerte*	Übereinstimmung in Prozent < Schwellenwert	Übereinstimmung in Prozent ≥ Schwellenwert
	95 % KI (n/N)	95 % KI (n/N)
Target Not Detected	82,3 % (107/130) (74,8 %, 87,9 %)	97,1 % (408/420) (95,1 %, 98,4 %)
LLoQ (2,3 log ₁₀ IE/ml)	98,4 % (188/191) (95,5 %, 99,5 %)	87,7 % (315/359) (83,9 %, 90,7 %)
3,0 log ₁₀ IE/ml	99,6 % (275/276) (98,0 %, 99,9 %)	77,0 % (211/274) (71,7 %, 81,6 %)
4,0 log ₁₀ IE/ml	100,0 % (447/447) (99,1 %, 100,0 %)	67,0 % (69/103) (57,4 %, 75,3 %)

Hinweis: Proben mit dem Ergebnis „Target Not Detected“ wurden als „< Schwellenwert in IE/ml“ eingestuft.

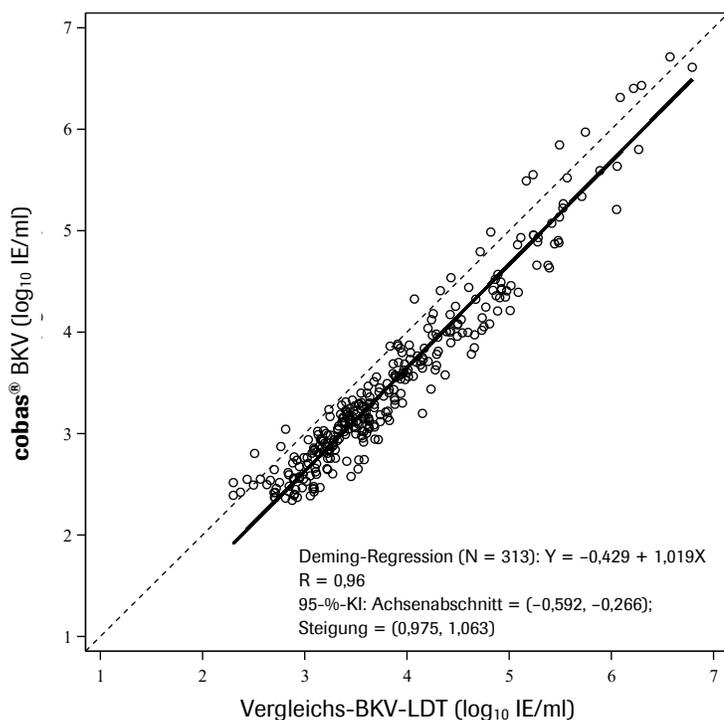
LLoQ = untere Quantifizierungsgrenze des Vergleichs-BKV-LDT (200 IE/ml = 2,3 log₁₀ IE/ml).

Das 95%-Konfidenzintervall (KI) wurde anhand des Wilson-Intervalls berechnet. Dabei wurde angenommen, dass alle Proben voneinander unabhängig sind.

* Schwellenwert von 1000 IE/ml = 3,0 log₁₀ IE/ml und von 10.000 IE/ml = 4,0 log₁₀ IE/ml.

Von allen mit dem **cobas**® BKV-Test getesteten Proben, die im Vergleichs-BKV-Test BKV-positiv waren, waren insgesamt 313 (133 unverdünnte und 159 verdünnte klinische Proben von 68 Transplantatempfängern sowie 21 künstlich hergestellte Proben) für die Korrelationsanalyse an den drei Testzentren auswertbar (siehe Abbildung 9).

Abbildung 9 Korrelation zwischen dem **cobas®** BKV-Test und dem Vergleichs-BKV-LDT für alle Proben: Diagramm der linearen Deming-Regression der DNA-Konzentration (\log_{10} IE/ml)



Eine zusätzlich durchgeführte Diagrammanalyse zu Abweichungen bei der DNA-Konzentration zeigte eine systematische Abweichung zwischen den beiden Tests, die für den gesamten überlappenden linearen Bereich konstant ist. Das 95-%-KI für den Achsenabschnitt der angelegten Gerade in den analysierten Diagrammen lag bei (-0,404 bis -0,168) und damit im Bereich von $\pm 0,74 \log_{10}$ IE/ml (± 2 -mal die Standardabweichung für die analytische Präzision des Vergleichs-BKV-LDT). Des Weiteren wurde eine mittlere systematische Abweichung von $-0,357 \log_{10}$ IE/ml ermittelt, und bei Verwendung der Gleichung für die angelegte Gerade betrug die systematische Abweichung zwischen den beiden Tests $-0,343 \log_{10}$ IE/ml und $-0,362 \log_{10}$ IE/ml für Proben mit einer DNA-Konzentration von 3 bzw. $4 \log_{10}$ IE/ml.

Reproduzierbarkeit des **cobas®** BKV-Tests für stabilisierte Urinproben

Die Reproduzierbarkeit des **cobas®** BKV-Tests wurde unter Einbeziehung von Faktoren (Reagenzcharge, Testzentrum, Batch und Testtag) evaluiert, die sich bei routinemäßigen klinischen Tests darauf auswirken könnten, welche Ergebnisse erzielt werden. Die Untersuchung wurde an 3 Testzentren mit 3 Reagenzchargen eines aus positiven sowie eines aus negativen Proben bestehenden Probenpanels durchgeführt. Daraus ergibt sich eine Gesamtanzahl von 270 Tests pro Konzentration (ohne Kontrollen). Die Panels bestanden aus in **cobas®** PCR Media stabilisierten Urinproben, die anhand eines Urin-Nukleinsäuretests (NAT) als negativ für BKV-DNA bestätigt wurden, und mit einem internationalen WHO-Standard für BKV oder kultivierter Virus-DNA des BKV-Genotyps Ia versetzt waren. Zwei Anwender an jedem Standort testeten jede Reagenzcharge über einen Zeitraum von 5 Tagen. Es wurden 2 Läufe (1 Lauf = 1 Batch; 1 Batch = 1 Panel + 3 Kontrollen) pro Tag durchgeführt, und für jeden Lauf wurden 3 Replikate jeder Panelprobe analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29 Zuordenbarer Prozentsatz der Gesamtvarianz (% TV), Standardabweichung (SD) der Gesamtpräzision und lognormaler VK (%) der BKV-DNA-Konzentration (\log_{10} IE/ml) nach positiver Panelprobe (stabilisierter Urin)

Erwartete BKV-DNA-Konzentration	Gemessene mittlere ^a BKV-DNA-Konzentration	Anzahl der Tests ^b	Charge % TV ^c (VK %) ^d	Testzentrum % TV ^c (VK %) ^d	Tag/Anwender % TV ^c (VK %) ^d	Batch % TV ^c (VK %) ^d	Innerhalb eines Batches % TV ^c (VK %) ^d	Gesamtpräzision SD ^e	Gesamtpräzision VK (%) ^d
2,78	2,92	270	59 % (12,64)	0 % (1,15)	0 % (0,00)	0 % (0,00)	40 % (10,41)	0,071	16,47
3,70	3,78	270	47 % (8,14)	2 % (1,62)	8 % (3,31)	0 % (0,00)	43 % (7,72)	0,051	11,83
4,70	4,80	270	38 % (5,02)	2 % (1,28)	6 % (2,07)	0 % (0,00)	53 % (5,96)	0,035	8,17
5,70	5,70	270	21 % (3,12)	0 % (0,00)	0 % (0,00)	0 % (0,00)	79 % (6,12)	0,030	6,87
7,70	7,69	270	2 % (1,51)	19 % (4,84)	6 % (2,79)	0 % (0,00)	73 % (9,53)	0,048	11,17

Hinweis: Die Tabelle umfasst nur Ergebnisse mit nachweisbarem DNA-Wert. SD = Standardabweichung; VK (%) = prozentualer Variationskoeffizient; BKV = BK-Virus.

^a Mittels SAS-MIXED-Verfahren berechnet.

^b Anzahl der gültigen Tests mit nachweisbarem DNA-Wert.

^c % TV = Prozentualer Anteil an der Gesamtvarianz.

^d VK % = Lognormaler prozentualer Variationskoeffizient = $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Anhand Gesamtvariabilität aus SAS-MIXED-Verfahren berechnet.

Der **cobas®** BKV-Test wies für Konzentrationen innerhalb des gesamten linearen Bereichs eine akzeptable klinische Reproduzierbarkeit auf. Zudem erkannte das System 100 % der Proben mit einer Konzentration der 3fachen LLoQ korrekt. Das **cobas®** 6800 und das **cobas®** 8800 System haben den gleichen modularen Aufbau und erwiesen sich bei Verwendung des **cobas®** BKV-Tests als äquivalent. Alle ermittelten Grenzen der 95-%-Konfidenzintervalle für die Differenz zwischen 2 Messungen für denselben Patienten lagen im Bereich von $\pm 0,20 \log_{10}$ IE/ml. Dies bedeutet, dass der Test als klinisch relevant erachtete Änderungen der BKV-DNA-Konzentration feststellen kann. Das System wies eine negative Übereinstimmung in Prozent von 99,26 % bei einem KI von 97,3 % bis 99,9 % auf. Bei den 270 gültigen Tests mit den negativen Panelproben wurde bei 2 Proben (0,74 %) ein positives Ergebnis bei einer DNA-Konzentration < LLoQ ermittelt. Nähere Untersuchungen ergaben, dass diese Ergebnisse nicht mit einem bestimmten Gerät/Zentrum oder einer bestimmten Reagenzcharge in Zusammenhang standen. Eine zusätzlich durchgeführte DNA-Sequenzierung bestätigte das Vorliegen von BKV. Die identifizierten BKV-Sequenzen unterschieden sich von denen der Positivkontrolle und von dem BKV-Stamm, der für die Zusammenstellung des Panels verwendet worden war, wodurch eine Kontamination während der Panelerstellung ausgeschlossen werden kann und eine spurenhafte Virurie in einer der 25 Urinproben des Urinpools nahelegt, der für die Erstellung des negativen Panels verwendet wurde.

Leistungsmerkmale des **cobas®** BKV-Tests für stabilisierte Urinproben

Die klinischen Leistungsmerkmale des **cobas®** BKV-Tests wurden an drei Testzentren näher untersucht. Dazu wurde die BKV-DNA-Konzentration in klinischen Urinproben gemessen, die von mit BKV infizierten sowie nicht infizierten Patienten stammten und in **cobas®** PCR Media stabilisiert wurden. Als Vergleichstest diente ein etablierter LDT („Vergleichs-BKV-LDT“).

Von allen mit dem **cobas**® BKV-Test und dem BKV-Vergleichstest getesteten Proben waren 308 unverdünnte, in **cobas**® PCR Media stabilisierte Urinproben von 84 Transplantatempfängern in beiden Tests gültig und für eine Analyse der klinischen Konkordanz auswertbar (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30 Konkordanzanalyse zwischen dem **cobas**® BKV-Test und dem Vergleichs-LDT zu den BKV-DNA-Konzentrationsergebnissen (\log_{10} IE/ml) für alle Proben (stabilisierter Urin)

cobas ® BKV (\log_{10} IE/ml)	Vergleichs- BKV-LDT Target Not Detected	Vergleichs- BKV-LDT < LLoQ (< 3,0)	Vergleichs- BKV-LDT 3,0 bis < 3,3	Vergleichs- BKV-LDT 3,3 bis < 3,6	Vergleichs- BKV-LDT 3,6 bis 3,9	Vergleichs- BKV-LDT > 3,9	Gesamt
Target Not Detected	62	6	0	0	0	0	68
< LLoQ (< 3,0)	4	22	0	0	0	1	27
3,0 bis < 3,3	0	2	0	0	0	0	2
3,3 bis < 3,6	0	0	6	3	0	0	9
3,6 bis 3,9	0	0	2	11	10	0	23
> 3,9	0	0	0	2	8	169	179
Gesamt	66	30	8	16	18	170	308
Übereinstimmung Spalte (%)	(66/66) 100,0 %	(30/30) 100,0 %	(6/8) 75,0 %	(14/16) 87,5 %	(18/18) 100,0 %	(169/170) 99,4 %	-
(95-%-KI) ^a	(94,5 %, 100,0 %)	(88,6 %, 100,0 %)	(40,9 %, 92,9 %)	(64,0 %, 96,5 %)	(82,4 %, 100,0 %)	(96,7 %, 99,9 %)	-

Hinweis: KI = Konfidenzintervall; LLoQ = untere Quantifizierungsgrenze des Vergleichs-BKV-LDT (1000 IE/ml = 3,0 \log_{10} IE/ml); LDT = laborentwickelter Test; BKV = BK-Virus.

Für den Vergleichs-BKV-LDT wurde eine Standardabweichung von 0,15 \log_{10} IE/ml ermittelt (Bewertungsstudie zu Vergleichs-BKV-LDT).

Eine Analytkonzentration von 3,3 \log_{10} IE/ml entsprach der LLoQ + 2 σ , 3,6 \log_{10} IE/ml entsprachen der LLoQ + 4 σ und 3,9 \log_{10} IE/ml entsprachen der LLoQ + 6 σ mit einem Bereichsintervall von 2 σ .

In diese Tabelle wurden die gepaarten Proben aufgenommen, die für die Analyse der klinischen Konkordanz auswertbar waren.

^a Es wurde angenommen, dass alle Proben voneinander unabhängig sind.

Eine DNA-Sequenzierung repräsentativer Proben von Patienten mit durchgängig um mehr als 1 \log_{10} IE/ml des DNA-Werts versetzten Ergebnissen ergab für keine Primer- oder Sondenzielregion des **cobas**® BKV-Tests eine Sequenz-Fehlpaarung. Als nicht übereinstimmend waren Ergebnisse definiert, die weiter als ein Kästchen von der Diagonalen entfernt sind (grau dargestellt). Für „Übereinstimmung Spalte“, in der Spalte „Target Not Detected“ für den Vergleichs-BKV-LDT, wurden die Zahlen für „Target Not Detected“ und „< LLoQ (< 3,0)“ für den **cobas**® BKV-Test zusammengeführt. Der Grund dafür, die Zellen für „< LLoQ“ und „Target Not Detected“ für die Spalte „Target Not Detected“ zusammenzunehmen, ist, dass der Unterschied zwischen keinem nachgewiesenen Ziel und einer Konzentration unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze klinisch nicht erheblich ist und beide sich aus analytischer Sicht im unteren Messbereich befinden, der anfällig für zufällige Abweichungen ist. Von den 66 für BKV-DNA negativen Proben, die für die Bestimmung der NPA beim **cobas**® BKV-Test zusammengestellt wurden, lieferten 61 gültige Ergebnisse, und von diesen 61 Proben waren alle im **cobas**® BKV-Test negativ. Damit lag die NPA bei 100 % mit einem exakten 95-%-KI von 94,1 % bis 100 %.

Die Konkordanz zwischen dem **cobas**® BKV-Test und dem Vergleichs-BKV-LDT wurde zudem anhand verschiedener klinischer Schwellenwerte ausgewertet (Tabelle 31).

Tabelle 31 Zusammenfassung der Konkordanz zwischen dem **cobas**® BKV-Test und dem Vergleichs-BKV-LDT für alle Proben anhand verschiedener Schwellenwerte (stabilisierter Urin)

Schwellenwert*	Übereinstimmung in Prozent < Schwellenwert 95-%-KI (n/N)	Übereinstimmung in Prozent ≥ Schwellenwert 95-%-KI (n/N)
Target Not Detected	93,9 % (62/66) (85,4 %, 97,6 %)	97,5 % (236/242) (94,7 %, 98,9 %)
LLoQ (3,0 log ₁₀ IE/ml)	97,9 % (94/96) (92,7 %, 99,4 %)	99,5 % (211/212) (97,4 %, 99,9 %)
4,0 log ₁₀ IE/ml	90,9 % (130/143) (85,1 %, 94,6 %)	99,4 % (164/165) (96,6 %, 99,9 %)
7,0 log ₁₀ IE/ml	97,2 % (242/249) (94,3 %, 98,6 %)	94,9 % (56/59) (86,1 %, 98,3 %)

Hinweis: Proben mit dem Ergebnis „Target Not Detected“ wurden als „< Schwellenwert in IE/ml“ eingestuft.

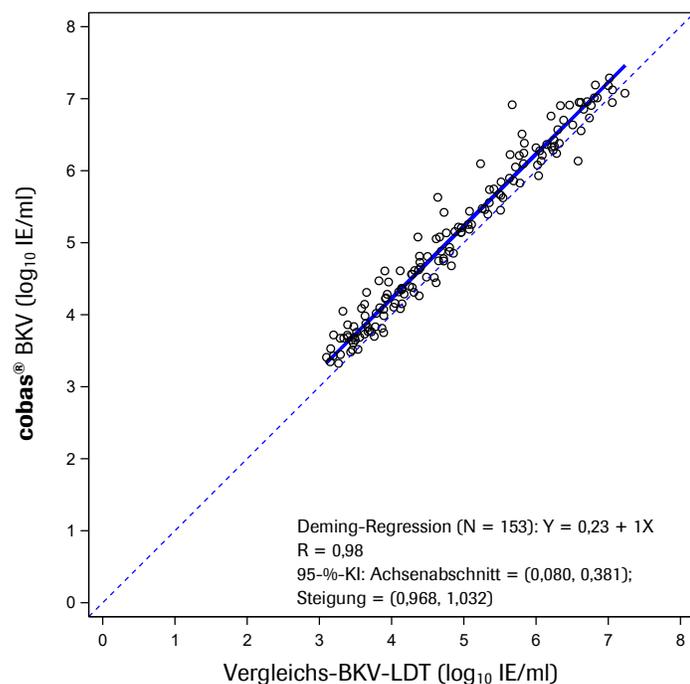
LLoQ = untere Quantifizierungsgrenze des Vergleichs-BKV-LDT (1000 IE/ml = 3,0 log₁₀ IE/ml).

Das 95-%-Konfidenzintervall (KI) wurde anhand des Wilson-Intervalls berechnet. Dabei wurde angenommen, dass alle Proben voneinander unabhängig sind.

* Schwellenwert von 10.000 IE/ml = 4,0 log₁₀ IE/ml und von 10.000.000 IE/ml = 7,0 log₁₀ IE/ml.

Von allen mit dem **cobas**® BKV-Test getesteten Proben, die im Vergleichs-BKV-Test BKV-positiv waren, waren insgesamt 153 unverdünnte, in **cobas**® PCR Media stabilisierte Urinproben von 55 Transplantatempfängern für die Korrelationsanalyse an den drei Testzentren auswertbar (siehe Abbildung 10).

Abbildung 10 Korrelation zwischen dem **cobas**® BKV-Test und dem Vergleichs-BKV-LDT für alle Proben: Diagramm der linearen Deming-Regression der DNA-Konzentration (log₁₀ IE/ml) (stabilisierter Urin)



Eine zusätzlich durchgeführte Diagrammanalyse zu Abweichungen bei der DNA-Konzentration zeigte eine systematische Abweichung zwischen den beiden Tests, die für den gesamten überlappenden linearen Bereich konstant ist. Das 95-%-KI für den Achsenabschnitt der angelegten Gerade in den analysierten Diagrammen lag bei (0,168 bis 0,488) und damit im Bereich von $\pm 0,5 \log_{10}$ IE/ml. Des Weiteren wurde eine mittlere systematische Abweichung von $0,231 \log_{10}$ IE/ml ermittelt, und bei Verwendung der Gleichung für die angelegte Gerade betrug die systematische Abweichung zwischen den beiden Tests $0,248 \log_{10}$ IE/ml und $0,188 \log_{10}$ IE/ml für Proben mit einer DNA-Konzentration von $4 \log_{10}$ IE/ml bzw. $7 \log_{10}$ IE/ml.

Systemäquivalenz und -vergleich

Die Systemäquivalenz der cobas® 5800, cobas® 6800 und cobas® 8800 Systems wurde anhand von Leistungsstudien belegt. Die in der Gebrauchsanweisung aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die Leistungsmerkmale für alle Systeme gleich sind.

Weitere Informationen

Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests

Probenmaterial	EDTA-Plasma	In cobas ® PCR Media stabilisierter Urin
Erforderliche Probenmindestmenge	350 µl*	550 µl*
Probenverarbeitungsvolumen	200 µl	400 µl
Analytische Sensitivität	21,5 IE/ml (zweiseitiges 95%-Konfidenzintervall: 16,3–32,4 IE/ml)	12,2 IE/ml (zweiseitiges 95%-Konfidenzintervall: 9,2–18,3 IE/ml)
Linearer Bereich	21,5 IE/ml bis 1E+08 IE/ml	200 IE/ml bis 1E+08 IE/ml
Spezifität	100 %	100 %
Untersuchte Subtypen	BKV-Subtypen I (Subgruppen Ia, Ib und Ic), II, III und IV	

* Für die **cobas**® **omni** Sekundärrohrchen wurde ein Totvolumen von 150 µl ermittelt. Andere Testrohrchen können ein anderes Totvolumen aufweisen und mehr oder weniger Volumen erfordern. Für weitere Informationen wenden Sie sich an den zuständigen Servicemitarbeiter von Roche Diagnostics.

Symbole

Die folgenden Symbole werden bei der Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten verwendet.

Tabelle 32 Symbole zur Kennzeichnung von Roche PCR-Diagnostikprodukten

 Alter oder Geburtsdatum	 Produkt nicht für patientennahe Tests geeignet	 Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Internationalen Einheiten pro PCR-Reaktion
 Zusatz-Software	 Produkt nicht zur Eigenanwendung geeignet	 Seriennummer
 Sollbereich (Kopien/ml)	 Vertrieb (Hinweis: ggf. Angabe von Land/Region unter dem Symbol)	 Zentrum, Labor
 Sollbereich (IE/ml)	 Nicht wiederverwenden	 Standardverfahren
 Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft	 Frauen, weiblich	 Mit Ethylenoxid sterilisiert
 Barcode-Datenblatt	 Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung	 Im Dunkeln lagern
 Chargenbezeichnung	 Globale Artikelnummer GTIN	 Temperaturbegrenzung
 Biogefährdung	 Import	 Datei mit Testdefinitionen
 Bestellnummer	 <i>In-vitro</i> -Diagnostikum	 Diese Seite oben
 CE-Kennzeichnung für Konformität; dieses Produkt entspricht den geltenden Vorschriften für die CE-Kennzeichnung für <i>In-vitro</i> -Diagnostika.	 Unterer Grenzwert des Sollbereichs	 Ultrasensitives Verfahren
 Entnahmedatum	 Männer, männlich	 Einmalige Produktkennung
 Gebrauchsanweisung beachten	 Hersteller	 Oberer Grenzwert des Sollbereichs
 Ausreichend für <n> Tests	 Negativkontrolle	 Fülllinie für Urin
 Inhalt der Packung	 Nicht steril	 Nur für die USA: In den USA darf dieser Test nach den gesetzlichen Vorschriften nur durch einen Arzt oder auf ärztliche Verschreibung abgegeben werden.
 Kontrolle	 Patientennamen	 Verwendbar bis
 Herstellungsdatum	 Patienten-ID	
 Produkt für patientennahe Tests	 Hier abziehen	
 Produkt zur Eigenanwendung	 Positivkontrolle	
	 Quantifizierungsstandard zur Berechnung der Ergebnisse, in Kopien pro PCR-Reaktion	

Technischer Support

Für technischen Support wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Hersteller und Importeur

Tabelle 33 Hersteller und Importeur



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

Hergestellt in den USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marken und Patente

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

Copyright

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Literatur

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:453-5. PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. PMID: 23464993.
3. Morel V, Martin E, Francois C, et al. A Simple and Reliable Strategy for BK Virus Subtyping and Subgrouping. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1177-85. PMID: 28151406.
4. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009;199:837-46. PMID: 19434930.
5. Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *J Infect*. 2014;68 Suppl 1:S2-8. PMID: 24119828.
6. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:e13528. PMID: 30859620.
7. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:503-28. PMID: 28298471.
8. Yamada Y, Tsuchiya T, Inagaki I, Seishima M, Deguchi T. Prediction of Early BK Virus Infection in Kidney Transplant Recipients by the Number of Cells With Intranuclear Inclusion Bodies (Decoy Cells). *Transplant Direct*. 2018;4:e340. PMID: 29464201.
9. Nিকেleit V, Singh HK. Polyomaviruses and disease: is there more to know than viremia and viruria? *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20:348-58. PMID: 25933251.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
11. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PMID: 7845459.
12. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78. PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Centers for Disease Control and Preventions, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.
17. Goetsch HE, Zhao L, Gnegy M, et al. Fate of the Urinary Tract Virus BK Human Polyomavirus in Source-Separated Urine. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84. PMID: 29374036.
18. Boan P, Hewison C, Swaminathan R, et al. Optimal use of plasma and urine BK viral loads for screening and predicting BK nephropathy. *BMC Infect Dis*. 2016;16:342. PMID: 27448566.

Dokumentversion

Dokumentversionsübersicht	
Doc Rev. 2.0 09/2022	<p>Auf der Titelseite sowie in Tabelle 2 und 3 wurden die Bestellnummern für die Kontrollkits hinzugefügt.</p> <p>Der Abschnitt Marken und Patente einschließlich des darin enthaltenen Links wurde aktualisiert.</p> <p>Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort.</p>
Doc Rev. 3.0 05/2023	<p>In den Abschnitten Gebrauchsanweisung und Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests wurde die erforderliche Probenmindestmenge auf den ursprünglichen Wert zurückgesetzt.</p> <p>Die Angabe zur Meldung schwerwiegender Vorkommnissen an die zuständigen Behörden wurde aktualisiert.</p> <p>In Tabelle 20 wurde eine fehlende Fußnote ergänzt.</p> <p>Es wurden geringfügige Formulierungsänderungen vorgenommen.</p> <p>Die Marke cobas® wurde aktualisiert.</p> <p>Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort.</p>

Unter dem folgenden Link finden Sie eine Zusammenfassung des Berichts zu Sicherheit und Leistung:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>