HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG

Bộ IVD xét nghiệm định lượng DNA vi rút BK

Tên Trang thiết bị y tế	Chủng loại	Mã sản phẩm	Quy cách đóng gói
Thuốc thử xét nghiệm định lượng DNA vi rút BK	**cobas**® BKV	09040960190	Hộp 192 xét nghiệm
Để sử dụng trên hệ thống cobas® 5800			
Vật liệu kiểm soát dương tính xét nghiệm định lượng DNA vi rút BK, DNA vi rút Epstein-Barr	**cobas**® EBV/BKV Control Kit	09040951190	Hộp 8 xét nghiệm (2 loại mẫu chứng x 8 ống x 0.5 mL)
Vật liệu kiểm soát âm tính xét nghiệm định tính, định lượng DNA/RNA 14 thông số	**cobas**® Buffer Negative Control Kit	09051953190	Hộp 16 xét nghiệm (4 giá x 4 ống x 1 mL)
Để sử dụng trên hệ thống cobas® 6800/8800			
Vật liệu kiểm soát dương tính xét nghiệm định lượng DNA vi rút BK, DNA vi rút Epstein-Barr	**cobas**® EBV/BKV Control Kit	08688214190 Hoặc 09040951190	Hộp 8 xét nghiệm (2 loại mẫu chứng x 8 ống x 0.5 mL)
Vật liệu kiểm soát âm tính xét nghiệm định tính, định lượng DNA/RNA 12 thông số Hoặc Vật liệu kiểm soát âm tính xét nghiệm định tính, định lượng DNA/RNA 14 thông số	**cobas**® Buffer Negative Control Kit	07002238190 Hoặc 09051953190	Hộp 16 xét nghiệm (4 giá x 4 ống x 1 mL)

Lưu ý: Luôn sử dụng một dấu chấm (dấu chấm câu/dấu chấm hết) trong tờ hướng dẫn sử dụng để ngăn cách phần nguyên và phần thập phân của một số thập phân. Không sử dụng dấu phân cách cho hàng nghìn.
Lưu ý: Trong tài liệu này, vật liệu kiểm soát còn được gọi là chứng/mẫu chứng.

Rx Only

cobas® BKV

Xét nghiệm định lượng axit nucleic sử dụng trên hệ thống cobas® 5800/6800/8800

Dùng trong chẩn đoán *in vitro*

cobas® BKV	P/N: 09040960190
Dùng trên hệ thống cobas® 5800	
cobas® EBV/BKV Control Kit	P/N: 09040951190
cobas® Buffer Negative Control Kit	P/N: 09051953190
Dùng trên hệ thống cobas® 6800/8800	
cobas® EBV/BKV Control Kit	P/N: 08688214190 hoặc P/N: 09040951190
cobas® Buffer Negative Control Kit	P/N: 07002238190 hoặc P/N: 09051953190

Mục Lục

Mục đích sử dụng **4**
Tóm tắt và diễn giải xét nghiệm **4**
Thuốc thử và vật liệu **7**
Thuốc thử và vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) **cobas**® BKV 7
Thuốc thử **cobas**® **omni** để chuẩn bị mẫu 10
Yêu cầu về bảo quản và thao tác thuốc thử 11
Yêu cầu thao tác thuốc thử cho hệ thống **cobas**® 5800 12
Yêu cầu thao tác thuốc thử cho hệ thống **cobas**® 6800/8800 13
Vật liệu yêu cầu thêm cho hệ thống **cobas**® 5800 14
Vật liệu yêu cầu thêm cho hệ thống **cobas**® 6800/8800 15
Thiết bị và phần mềm yêu cầu 16
Yêu cầu về thận trọng và thao tác **17**
Cảnh báo và thận trọng 17
Thao tác với thuốc thử 17
Thực hành tốt phòng xét nghiệm 18
Lấy mẫu, vận chuyển và bảo quản mẫu **18**
Mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA 18
Mẫu nước tiểu 19
Hướng dẫn sử dụng **20**
Những lưu ý quy trình 20
Chạy xét nghiệm **cobas**® BKV trên hệ thống **cobas**® 5800 21
Chạy xét nghiệm **cobas**® BKV trên hệ thống **cobas**® 6800/8800 22
Kết quả **23**
Kiểm tra chất lượng và tính hợp lệ của kết quả trên hệ thống **cobas**® 5800 23
Kiểm tra kết quả trên hệ thống **cobas**® 5800 23
Kiểm tra chất lượng và tính hợp lệ của kết quả trên hệ thống **cobas**® 6800/8800 23
Cờ hiệu kiểm soát trên hệ thống **cobas**® 6800/8800 24
Biện luận kết quả 25
Biện luận kết quả trên hệ thống **cobas**® 5800 25
Biện luận kết quả trên hệ thống **cobas**® 6800/8800 26
Giới hạn về quy trình 26
Đánh giá hiệu năng cận lâm sàng **27**
Đặc tính hiệu năng chính được thực hiện với mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA trên hệ thống **cobas**® 6800/8800 27
Giới hạn phát hiện (LoD) theo mẫu chuẩn quốc tế WHO 27

Khoảng tuyến tính 28
Độ chụm – trong phòng xét nghiệm 29
Thẩm định các kiểu gen 30
Độ đặc hiệu 30
Độ đặc hiệu phân tích 30
Độ đặc hiệu phân tích – chất gây nhiễu 31
Mối tương quan giữa các phương pháp 32
Sai số hệ thống 33
Nhiễm chéo 33
Đặc tính hiệu năng trên mẫu nước tiểu được thực hiện trên hệ thống **cobas**® 6800/8800 34
Giới hạn phát hiện (LoD) theo mẫu chuẩn quốc tế WHO 34
Khoảng tuyến tính 35
Độ chụm – trong phòng xét nghiệm 36
Thẩm định các kiểu gen 37
Độ đặc hiệu 37
Độ đặc hiệu phân tích 37
Độ đặc hiệu phân tích - chất gây nhiễu 38
Mối tương quan giữa các phương pháp 39
Nhiễm chéo 40
Đánh giá hiệu năng lâm sàng được thực hiện trên hệ thống cobas® 6800/8800 41
Độ tái lặp của xét nghiệm **cobas**® BKV trên mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA 41
Hiệu năng của xét nghiệm **cobas**® BKV trên mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA 42
Độ tái lặp của xét nghiệm **cobas**® BKV trên mẫu nước tiểu ổn định 44
Hiệu năng của xét nghiệm **cobas**® BKV trên mẫu nước tiểu ổn định 45
Sự tương đương giữa các hệ thống / so sánh hệ thống 48
Thông tin bổ sung 49
Tính năng chính của xét nghiệm 49
Ký hiệu 50
Hỗ trợ kĩ thuật 51
Chủ sở hữu và cơ sở sản xuất 51
Thương hiệu và sáng chế 51
Bản quyền 51
Tài liệu tham khảo 52
Sửa đổi tài liệu 53

Mục đích sử dụng

Xét nghiệm **cobas**® BKV là một xét nghiệm khuếch đại axit nucleic in vitro để định lượng DNA của vi rút BK (BKV) trong huyết tương chống đông bằng EDTA và mẫu nước tiểu ổn định trong môi trường **cobas**® PCR Media.

Đối với mẫu huyết tương chống đông EDTA, xét nghiệm **cobas**® BKV được chỉ định cho mục đích chẩn đoán và quản lý bệnh nhân nhiễm BKV trong các bệnh nhân ghép tạng. Ở những bệnh nhân đang được theo dõi BKV trong huyết tương EDTA, các kết quả định lượng DNA liên tiếp có thể được sử dụng để xác định sự cần thiết cửa việc thay đổi phương pháp điều trị và để đánh giá đáp ứng của vi rút đối với phương pháp điều trị.

Đối với mẫu nước tiểu ổn định trong môi trường **cobas**® PCR Media, xét nghiệm **cobas**® BKV được chỉ định cho mục đích chẩn đoán và quản lý bệnh nhân nhiễm BKV trong các bệnh nhân ghép tạng.

Kết quả từ xét nghiệm **cobas**® BKV phải được biện luận trong bối cảnh tất cả các kết quả lâm sàng và xét nghiệm có liên quan.

cobas® BKV không được chỉ định cho xét nghiệm sàng lọc máu và các chế phẩm từ máu.

Tóm tắt và diễn giải xét nghiệm

Tổng quan

Những bệnh nhân ghép tạng có nguy cơ cao nhiễm nhiều loại vi rút và vi khuẩn cũng như có nhiều khả năng bị những hội chứng suy giảm miễn dịch cấp tính dẫn đến các biến cố bất lợi sức khỏe nhiêm trọng so với nhóm dân số khỏe mạnh nói chung. Nguy cơ gia tăng này một phần là do chức năng hệ thống miễn dịch bị suy giảm do các thuốc ức chế miễn dịch mà bệnh nhân ghép tạng dùng để giảm khả năng thải ghép.[1,2]

Vi rút BK (BKV) là một loại vi rút axit deoxyribonucleic (DNA) nhỏ (~5kb), không có vỏ bọc thuộc họ polyomavirus. Có bốn phân nhóm BKV chính, trong đó phân nhóm I được phát hiện phổ biến nhất (80%), tiếp theo là phân nhóm IV (15%).[3] Tỉ lệ nhiễm BKV trong huyết thanh người là > 80% trong quần thể người trưởng thành nói chung.[4] Ở những người có khả năng miễn dịch bình thường, BKV không liên quan đến bệnh lý quan trọng. Tuy nhiên, nhiễm BKV có thể gây ra bệnh lâm sàng nghiêm trọng ở những người bị suy giảm miễn dịch, bao gồm cả những người được ghép tạng.[5]

Nhiễm trùng BKV thường biểu hiện nhất ở thận và đường tiết niệu. Sau khi xâm nhiễm ban đầu, vi rút tồn tại ở dạng thể ẩn trong biểu mô ống thận và biểu mô niệu quản, và có thể tái hoạt động ở những người bị suy giảm miễn dịch. Bệnh nhân ghép thận có nguy cơ mắc các biến chứng liên quan đến BKV cao hơn so với những bệnh nhân ghép loại tạng khác, bao gồm bệnh thận do vi rút polyoma (PVN) và hẹp niệu quản. PVN xảy ra ở tối đa 10% số người được ghép thận và khoảng 50% bệnh nhân bị ảnh hưởng bởi PVN sẽ gặp thất bại trong ghép thận. Ngoài ra, khoảng 3% người được ghép thận phát triển hẹp niệu quản liên quan đến BKV.[5] Cấy ghép tế bào gốc tạo máu (HSCT) cũng gặp các biến chứng liên quan đến BKV với tần suất cao hơn, phổ biến nhất là ở dạng viêm bàng quang xuất huyết (HC). Từ 5 đến 15% bệnh nhân HSCT bị HC.[1]

Các hướng dẫn khuyến cáo theo dõi thường xuyên BKV ở bệnh nhân ghép thận trong tối đa 5 năm sau ghép.[6] Phương pháp giám sát này có thể xác định 80-90% bệnh nhân có nguy cơ mắc PVN. Xét nghiệm huyết tương để tìm vi rút BK trong máu được khuyến cáo như một phần của chiến lược xác định bệnh nhân có nguy cơ cao mắc phải biến chứng PVN hoặc là xét nghiệm xác nhận cho những bệnh nhân được phát hiện vi rút BK trong nước tiểu hoặc là phương thức xét nghiệm chính để sàng lọc định kỳ.[6] Hiện tại không có khuyến cáo nào về theo dõi BKV định kỳ cho bệnh nhân HSCT và xét nghiệm được khuyến cáo chủ yếu để đánh giá bệnh nhân tiểu máu và các triệu chứng lâm sàng của viêm bàng quang. Tuy nhiên, mức BKV DNA lớn hơn 10000 bản sao/mL có liên quan đến nguy cơ HC cao hơn ở bệnh nhân cấy ghép.[7]

Đối với những bệnh nhân ghép thận có nồng độ BKV DNA trong huyết tương cao liên tục, thường được xác định ở mức tải lượng 10000 bản sao/mL, nên xét nghiệm BKV huyết tương 1-2 tuần một lần cho đến khi nồng độ DNA ở mức không thể phát hiện trong hai lần đo liên tiếp.

Nhiều xét nghiệm định lượng BKV trong phòng xét nghiệm không được chuẩn hóa, dẫn đến sự khác biệt cao giữa các phòng xét nghiệm và giữa các xét nghiệm. [6,7] Ngoài ra, các thành phần trong nước tiểu có thể gây ra sự kết cụm với vi rút BKV, điều này cũng có thể ảnh hưởng đến sự thay đổi về số lượng.[8,9] Đánh giá chính thức về độ tái lặp và hợp chuẩn của các mức BKV DNA là rất quan trọng để đảm bảo kết quả nhất quán (bất kể xét nghiệm được thực hiện ở phòng xét nghiệm nào) để quản lý bệnh nhân mắc các bệnh liên quan đến BKV.
Mặc dù ngưỡng vi rút chính xác có ý nghĩa lâm sàng vẫn là một chủ đề tranh luận do tính biến thiên giữa các xét nghiệm, nhưng khái niệm ngưỡng tới hạn có tồn tại và đã được báo cáo trong các nghiên cứu lịch sử tự nhiên cho thấy mức DNA BKV cao hơn có liên quan đến rủi ro gia tăng đối với biến chứng của PVN và HC.[6,7]

Cơ sở của xét nghiệm NAT

Xét nghiệm huyết thanh học polyomavirus không được sử dụng thường xuyên trong môi trường lâm sàng; nó chỉ có giá trị xác định xem bệnh nhân đã từng nhiễm BKV hay chưa và có nguy cơ tái hoạt hay không. Các phương pháp nuôi cấy vi rút có thời gian thực hiện lâu, và vì chúng là phương pháp bán định lượng nên được sử dụng chủ yếu ở những bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch, do thường có lượng vi rút thấp. Phát hiện trực tiếp DNA BKV bằng phương pháp PCR thời gian thực có khả năng cung cấp khoảng đo rộng, độ chụm, độ nhạy và độ đặc hiệu tối ưu để sử dụng cho bệnh nhân cấy ghép.

Diễn giải xét nghiệm

cobas® BKV là xét nghiệm định lượng chạy trên hệ thống **cobas**® 5800/6800/8800. Xét nghiệm **cobas**® BKV cho phép phát hiện và định lượng BKV DNA trong huyết tương chống đông bằng EDTA và nước tiểu được ổn định bằng môi trường **cobas**® PCR Media của những bệnh nhân bị lây nhiễm. Tải lượng BKV DNA được xác định dựa theo mẫu chuẩn định lượng là DNA không phải vi rút BKV (DNA-QS), được thêm vào từng mẫu trong quá trình xử lý mẫu. DNA-QS cũng có chức năng giám sát toàn bộ quá trình chuẩn bị mẫu và khuếch đại PCR. Ngoài ra, xét nghiệm sử dụng ba mẫu chứng kiểm soát đi kèm trong bộ kit: mẫu chứng dương tính nồng độ cao, mẫu chứng dương tính nồng độ thấp và mẫu chứng âm tính. Các mẫu chứng dương tính cao và dương tính thấp được sản xuất bằng cách pha loãng từ nguyên liệu gốc với hiệu giá có thể truy nguyên theo bộ mẫu chuẩn Quốc tế BKV của WHO. Mỗi lô bộ Khuếch đại/Phát hiện đều được hiệu chuẩn có thể truy nguyên theo Mẫu chuẩn Quốc tế BKV của WHO.

Nguyên lý xét nghiệm

cobas® BKV dựa trên quá trình chuẩn bị mẫu hoàn toàn tự động (tách chiết và tinh sạch axit nucleic), sau đó là khuếch đại và phát hiện PCR. Hệ thống **cobas**® 5800 được thiết kế như một thiết bị tích hợp. Hệ thống **cobas**® 6800/8800 bao gồm mô-đun nạp mẫu, mô-đun chuyển mẫu, mô-đun xử lý, và mô-đun phân tích. Quản lý dữ liệu tự động được thực hiện bởi phần mềm Hệ thống **cobas**® 5800 hoặc **cobas**® 6800/8800. Phần mềm này chỉ định kết quả xét nghiệm cho tất cả các xét nghiệm là không phát hiện mục tiêu, phát hiện DNA BKV < LLoQ (giới hạn định lượng dưới), phát hiện DNA BKV > ULoQ (giới hạn định lượng trên), hoặc một giá trị trong khoảng tuyến tính LLoQ < x< ULoQ. Kết quả có thể được xem lại trực tiếp trên màn hình hệ thống, xuất, hoặc in dưới dạng báo cáo.
Axit nucleic từ các mẫu bệnh phẩm và các phân tử lambda DNA-QS thêm vào được tách chiết đồng thời. Tóm lại, axit nucleic của vi rút được giải phóng bằng cách bổ sung proteinase và thuốc thử ly giải vào mẫu. Axit nucleic được giải phóng liên kết với bề mặt silica của các hạt thủy tinh từ tính được thêm vào. Các chất và tạp chất không liên kết, chẳng hạn như protein biến tính, mảnh vụn tế bào và chất ức chế PCR tiềm năng được loại bỏ bằng các bước thuốc thử rửa tiếp theo và axit nucleic tinh sạch được rửa giải khỏi các hạt thủy tinh bằng dung dịch đệm thu hồi dưới tác động của nhiệt độ cao.

Quá trình khuếch đại có chọn lọc axit nucleic đích từ mẫu đạt được bằng cách sử dụng đích kép đặc hiệu với vi rút từ vùng trình tự bảo tồn cao của BKV nằm trong vùng nhỏ kháng nguyên t của vi rút BKV và vùng BKV VP2. Quá trình khuếch đại có chọn lọc của DNA-QS đạt được bằng cách sử dụng các đoạn mồi xuôi và ngược theo trình tự được chọn để không tương đồng với bộ gen BKV. Một enzyme DNA polymerase bền nhiệt được sử dụng để khuếch đại. Các trình tự đích và DNA-QS được khuếch đại đồng thời bằng cách sử dụng chu trình khuếch đại PCR phổ quát với các bước nhiệt độ và số chu kỳ được xác định trước. Master mix có chứa sản phẩm deoxyuridine triphosphate (dUTP), thay vì deoxythimidine triphosphate (dTTP), được tích hợp vào DNA mới được tổng hợp (amplicon).[10-12] Bất kỳ bản sao tạo thành nhiễm vào mẫu từ các lần chạy PCR trước đó đều bị loại bỏ bởi enzym AmpErase, enzyme này có trong hỗn hợp PCR, khi được làm nóng trong bước chu kỳ nhiệt đầu tiên. Tuy nhiên, sản phẩm khuếch đại mới hình thành không bị loại bỏ do enzyme AmpErase bị bất hoạt khi tiếp xúc với nhiệt độ trên 55°C.

Hỗn hợp phản ứng **cobas**® BKV chứa hai mẫu dò phát hiện dành riêng cho trình tự mục tiêu BKV và một mẫu dò cho DNA-QS. Các mẫu dò được đánh dấu bằng chất phát huỳnh quang đặc hiệu cho mục tiêu cho phép phát hiện đồng thời mục tiêu BKV và DNA-QS trong hai kênh màu khác nhau.[13,14] Tín hiệu huỳnh quang của các mẫu dò còn nguyên vẹn bị triệt tiêu bởi chất dập huỳnh quang. Trong bước khuếch đại PCR, việc lai mẫu dò với các mẫu DNA sợi đơn đặc hiệu tương ứng dẫn đến sự phân cắt bởi hoạt động nuclease 5'-to-3' của DNA polymerase dẫn đến sự phân tách của chất phát và chất dập huỳnh quang và tạo ra một tín hiệu huỳnh quang. Với mỗi chu kỳ PCR, số lượng mẫu dò bị cắt tăng lên và tín hiệu tích lũy của chất chỉ thị huỳnh quang cũng đồng thời tăng lên. Việc phát hiện và phân biệt các sản phẩm PCR theo thời gian thực được thực hiện bằng cách đo huỳnh quang của chất phát huỳnh quang được giải phóng cho các bản sao mục tiêu của vi rút BKV vùng nhỏ kháng nguyên t của vi rút và DNA-QS.

Thuốc thử và vật liệu

Thuốc thử và vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) cobas® BKV

Tất cả các vật liệu cần thiết cho xét nghiệm **cobas**® BKV được tìm thấy trong Bảng 1. Các vật liệu yêu cầu khác, nhưng không cung cấp có thể tìm từ Bảng 2 đến Bảng 4, và từ Bảng 8 đến Bảng 10.

Phần thuốc thử và vật liệu và phần Yêu cầu về thận trọng và thao tác để biết thông tin nguy hiểm đối với sản phẩm.

Bảng 1 cobas® BKV

cobas® BKV

Bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C

Hộp cassette 192 xét nghiệm (P/N 09040960190)

Thành phần hộp thuốc thử	Thành phần thuốc thử	Số lượng cho mỗi hộp thuốc thử 192 xét nghiệm
Dung dịch Proteinase Solution (PASE)	Đệm Tris, EDTA < 0.05%, canxi chloride, canxi acetate, proteinase 8%, glycerol EUH210: Bảng dữ liệu an toàn hóa chất có sẵn khi có yêu cầu. EUH208: Có chứa Subtilisin từ vi khuẩn Bacillus subtilis. Có thể gây phản ứng dị ứng.	22.3 mL
Chuẩn định lượng DNA (DNA QS)	Đệm Tris, EDTA< 0.05%, cấu trúc DNA không BKV chứa đoạn mồi gắn kết không BKV và một vùng duy nhất cho đoạn dò (DNA không nhiễm) < 0.001%, Poly rA RNA (tổng hợp) < 0.002%, natri azide < 0.1%	21.2 mL
Đệm thu hồi (EB)	Đệm Tris, methyl-4 hydroxybenzoate 0.2%	21.2 mL
Thuốc thử Master Mix Reagent 1 (MMX-R1)	Mangan acetate, kali hydroxide, natri azide <0.1%	7.5 mL
Thuốc thử BKV Master Mix Reagent 2 (BKV MMX-R2)	Đệm Tricine, kali acetate, dimethyl sulfoxide, glycerol < 18%, Tween 20 < 0.1%, EDTA, dATP, dCTP, dGTP, dUTP < 0.12%, các đoạn mồi xuôi và mồi ngược BKV < 0.01%, các đoạn mồi xuôi và mồi ngược Chuẩn định lượng < 0.01%, các đoạn dò oligonucleotide đánh dấu huỳnh quang đặc hiệu cho BKV và Chuẩn định lượng BKV < 0.01%, oligonucleotide aptamer < 0.01%, Z05D DNA polymerase < 0.01%, AmpErase (uracil-N-glycosylase) enzyme (microbial) < 0.10%, natri azide < 0.1%	9.7 mL

Bảng 2 cobas® EBV/BKV Control Kit
cobas® EBV/BKV Control Kit
Bảo quản ở 2–8°C
Sử dụng trên hệ thống **cobas**® 5800 (P/N 09040951190)
Sử dụng trên hệ thống **cobas**® 6800/8800 (P/N 08688214190 hoặc P/N 09040951190)

Thành phần hộp thuốc thử	Thành phần thuốc thử	Số lượng cho mỗi hộp thuốc thử	Ký hiệu an toàn và cảnh báo*
Vật liệu kiểm soát dương tính nồng độ thấp EBV/BKV (EBV/BKV L(+)C)	DNA BKV tổng hợp (plasmid) đóng gói trong thực khuẩn thể Lambda phủ protein < 0.001%, huyết tương người bình thường, không có phản ứng với các phương pháp PCR phát hiện BKV DNA đã được cấp phép. chất bảo quản ProClin® 300 0.1%**	4 mL (8 x 0.5 mL)	 **CẢNH BÁO** H317: Có thể gây phản ứng dị ứng da. H412: Độc hại với sinh vật thủy sinh với hậu quả lâu dài. P261: Tránh hít bụi/hơi khói/khí/sương mù/hơi/bụi phun. P273: Tránh thải ra môi trường. P280: Đeo găng tay bảo vệ. P333 + P313: Nếu bị kích ứng da hoặc phát ban: Tìm tư vấn y tế/chăm sóc y tế. P362 + P364: Cởi bỏ trang phục bị nhiễm và giặt sạch trước khi sử dụng lại. P501: Xử lý các thành phần/dụng cụ chứa ở cơ sở xử lý chất thải đã được chấp thuận. 55965-84-9 Sản phẩm phản ứng của: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one và 2-methyl-2H -isothiazol-3- one (3:1)
Vật liệu kiểm soát dương tính nồng độ cao EBV/BKV (EBV/BKV H(+)C)	DNA BKV tổng hợp (plasmid) đóng gói trong thực khuẩn thể Lambda phủ protein < 0.001%, huyết tương người bình thường, không có phản ứng với các phương pháp PCR phát hiện BKV DNA đã được cấp phép. chất bảo quản ProClin® 300 0.1%**	4 mL (8 x 0.5 mL)	 **CẢNH BÁO** H317: Có thể gây phản ứng dị ứng da. H412: Độc hại với sinh vật thủy sinh với hậu quả lâu dài. P261: Tránh hít bụi/hơi khói/khí/sương mù/hơi/bụi phun. P273: Tránh thải ra môi trường. P280: Đeo găng tay bảo vệ. P333 + P313: Nếu bị kích ứng da hoặc phát ban: Tìm tư vấn y tế/chăm sóc y tế. P362 + P364: Cởi bỏ trang phục bị nhiễm và giặt sạch trước khi sử dụng lại. P501: Xử lý các thành phần/dụng cụ chứa ở cơ sở xử lý chất thải đã được chấp thuận. 55965-84-9 Sản phẩm phản ứng của: 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one và 2-methyl-2H -isothiazol-3- one (3:1)

*Nhãn an toàn sản phẩm chủ yếu theo hướng dẫn của GHS Châu Âu
** Chất hoặc hỗn hợp nguy hiểm

Bảng 3 cobas® Buffer Negative Control Kit
cobas® Buffer Negative Control Kit
Bảo quản ở 2-8°C
Sử dụng trên hệ thống **cobas**® 5800 (P/N 09051953190)
Sử dụng trên hệ thống **cobas**® 6800/8800 (P/N 07002238190 hoặc P/N 09051953190)

Thành phần hộp thuốc thử	Thành phần thuốc thử	Số lượng cho mỗi hộp thuốc thử
cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)	Đệm Tris, natri azide < 0.1%, EDTA, Poly rA RNA (tổng hợp) 0.002%	16 mL (16 x 1mL)

Thuốc thử cobas® omni để chuẩn bị mẫu

Bảng 4 Thuốc thử **cobas® omni** để chuẩn bị mẫu

Thuốc thử	Thành phần thuốc thử	Số lượng cho mỗi hộp thuốc thử	Ký hiệu an toàn và cảnh báo*
cobas® omni MGP Reagent (MGP) Bảo quản ở 2–8°C (P/N 06997546190)	Hạt thủy tinh từ tính, Đệm Tris, methyl-4 hydroxybenzoate 0.1%, natri azide <0.1%	480 xét nghiệm	Không áp dụng
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Bảo quản ở 2–8°C (P/N 06997511190)	Đệm Tris, methyl-4 hydroxybenzoate 0.1%, natri azide <0.1%	4 x 875 mL	Không áp dụng
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) Bảo quản ở 2–8°C (P/N 06997538190)	guanidine thiocyanate 43% (kl/kl)**, polydocanol 5% (kl/tt)**, dithiothreitol 2% (kl/tt)**, dihydro natri citrate EUH032:Phản ứng với axit tạo ra khí rất độc	4 x 875 mL	 **NGUY HIỂM** H302 + H332: Có hại nếu nuốt phải hoặc hít phải. H314: Có thể gây bỏng da nặng và tổn thương mắt. H411: Độc hại với sinh vật thủy sinh với hậu quả lâu dài. P273: Tránh thải ra môi trường. P280: Mang găng tay bảo hộ/ quần áo bảo hộ/ dụng cụ bảo vệ mắt/ dụng cụ bảo vệ mặt. P303 + P361 + P353: NẾU TRÊN DA (hoặc tóc): Cởi bỏ ngay lập tức tất cả quần áo bị nhiễm. Rửa sạch da bằng nước. P304 + P340 + P310: NẾU HÍT PHẢI: Chuyển nạn nhân đến khu vực có không khí sạch và giữ ở tư thế thoải mái để thở. Ngay lập tức gọi TRUNG TÂM CHỐNG ĐỘC/ bác sĩ. P305 + P351 + P338 + P310: NẾU VÀO MẮT: Rửa cẩn thận bằng nước trong vài phút. Gỡ kính áp tròng, nếu có và dễ thực hiện. Tiếp tục rửa. Ngay lập tức gọi TRUNG TÂM CHỐNG ĐỘC/ bác sĩ. P391: Thu gom phần tràn 593-84-0 Guanidinium thiocyanate 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutane-2,3-diol
cobas® omni Wash Reagent (WASH) Bảo quản ở 15–30°C (P/N 06997503190)	Natri citrate dihydrate, methyl-4 hydroxybenzoate	4.2 L	Không áp dụng

* Nhãn an toàn sản phẩm chủ yếu theo hướng dẫn của GHS Châu Âu

** Chất hoặc hỗn hợp nguy hiểm

Yêu cầu về bảo quản và thao tác thuốc thử

Thuốc thử nên được bảo quản và xử lý như quy định trong Bảng 5, Bảng 6 và Bảng 7.
Khi thuốc thử không được nạp trên hệ thống **cobas**® 5800 hoặc **cobas**® 6800/8800, bảo quản chúng ở nhiệt độ tương ứng quy định trong Bảng 5.

Bảng 5 Bảo quản thuốc thử (khi thuốc thử không ở trên hệ thống)

Thuốc thử	**Nhiệt độ bảo quản**
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

Yêu cầu thao tác thuốc thử cho hệ thống cobas® 5800

Thuốc thử nạp trên hệ thống **cobas**® 5800 được bảo quản ở nhiệt độ thích hợp và hạn dùng của thuốc thử được giám sát bởi hệ thống. Hệ thống chỉ cho phép sử dụng thuốc thử khi thỏa tất cả các điều kiện trong Bảng 6. Hệ thống tự động ngăn chặn việc sử dụng các thuốc thử quá hạn sử dụng. Bảng 6 cho phép người sử dụng hiểu các điều kiện xử lý thuốc thử được tuân thủ bởi hệ thống **cobas**® 5800.

Bảng 6 Điều kiện hết hạn sử dụng của thuốc thử được tuân thủ bởi hệ thống **cobas**® 5800

Thuốc thử	**Ngày hết hạn của hộp thuốc thử**	**Độ ổn định hộp thuốc thử đã mở nắp**	**Số mẻ chạy mà hộp thuốc thử có thể được sử dụng**	**Độ ổn định trên máy**
cobas® BKV	Không quá hạn dùng	90 ngày kể từ ngày đầu tiên sử dụng	Tối đa 40 lần chạy	Tối đa 36 ngày **
cobas® EBV/BKV Control Kit	Không quá hạn dùng	Không áp dụng*	Không áp dụng	Tối đa 36 ngày **
cobas® Buffer Negative Control Kit	Không quá hạn dùng	Không áp dụng*	Không áp dụng	Tối đa 36 ngày **
cobas® **omni** Lysis Reagent	Không quá hạn dùng	30 ngày kể từ khi nạp lên máy**	Không áp dụng	Không áp dụng
cobas® **omni** MGP Reagent	Không quá hạn dùng	30 ngày kể từ khi nạp lên máy**	Không áp dụng	Không áp dụng
cobas® **omni** Specimen Diluent	Không quá hạn dùng	30 ngày kể từ khi nạp lên máy**	Không áp dụng	Không áp dụng
cobas® **omni** Wash Reagent	Không quá hạn dùng	30 ngày kể từ khi nạp lên máy**	Không áp dụng	Không áp dụng

* Thuốc thử sử dụng một lần

** Thời gian được đo kể từ lần đầu tiên nạp thuốc thử lên hệ thống **cobas**® 5800.

Yêu cầu thao tác thuốc thử cho hệ thống cobas® 6800/8800

Thuốc thử được nạp lên hệ thống **cobas**® 6800/8800 được bảo quản ở nhiệt độ thích hợp và hạn dùng của thuốc thử được giám sát bởi hệ thống. Hệ thống **cobas**® 6800/8800 chỉ cho phép sử dụng thuốc thử khi thỏa tất cả các điều kiện trong Bảng 7. Hệ thống tự động ngăn chặn việc sử dụng các thuốc thử quá hạn sử dụng. Bảng 7 cho phép người sử dụng hiểu các điều kiện xử lý thuốc thử được tuân thủ bởi hệ thống **cobas**® 6800/8800.

Bảng 7 Điều kiện hết hạn sử dụng của thuốc thử được tuân thủ bởi hệ thống **cobas**® 6800/8800

Thuốc thử	**Ngày hết hạn của hộp thuốc thử**	**Độ ổn định hộp thuốc thử đã mở nắp**	**Số mẻ chạy mà hộp thuốc thử có thể được sử dụng**	**Độ ổn định trên máy (thời gian tích lũy trên máy bên ngoài tủ lạnh)**
cobas® BKV	Không quá hạn dùng	90 ngày kể từ ngày đầu tiên sử dụng	Tối đa 40 lần chạy	Tối đa 40 giờ
cobas® EBV/BKV Control Kit	Không quá hạn dùng	Không áp dụng*	Không áp dụng	Tối đa 8 giờ
cobas® Buffer Negative Control Kit	Không quá hạn dùng	Không áp dụng*	Không áp dụng	Tối đa 10 giờ
cobas® **omni** Lysis Reagent	Không quá hạn dùng	30 ngày kể từ khi nạp lên máy*	Không áp dụng	Không áp dụng
cobas® **omni** MGP Reagent	Không quá hạn dùng	30 ngày kể từ khi nạp lên máy**	Không áp dụng	Không áp dụng
cobas® **omni** Specimen Diluent	Không quá hạn dùng	30 ngày kể từ khi nạp lên máy**	Không áp dụng	Không áp dụng
cobas® **omni** Wash Reagent	Không quá hạn dùng	30 ngày kể từ khi nạp lên máy**	Không áp dụng	Không áp dụng

* Thuốc thử sử dụng một lần

Thời gian được đo kể từ lần đầu tiên nạp thuốc thử lên hệ thống **cobas® 6800/8800.

Hạn dùng:

cobas® BKV (P/N 09040960190)	Tuổi thọ theo nghiên cứu độ ổn định: 24 tháng Hạn dùng của từng lô: xem trên nhãn gốc
cobas® EBV/BKV Control Kit (P/N 08688214190 hoặc P/N 09040951190)	Tuổi thọ theo nghiên cứu độ ổn định: 24 tháng Hạn dùng của từng lô: xem trên nhãn gốc
cobas® Buffer Negative Control Kit (P/N 07002238190 hoặc P/N 09051953190)	Tuổi thọ theo nghiên cứu độ ổn định: 25 tháng Hạn dùng của từng lô: xem trên nhãn gốc

Vật liệu yêu cầu thêm cho hệ thống cobas® 5800

Bảng 8 Vật liệu và vật tư tiêu hao được sử dụng trên hệ thống **cobas**® 5800

Vật liệu	P/N
cobas® **omni** Processing Plate 24	08413975001
cobas® **omni** Amplification Plate 24	08499853001
cobas® **omni** Liquid Waste Plate 24	08413983001
Tip CORE TIPS with Filter, 1mL	04639642001
Tip CORE TIPS with Filter, 300µL	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
Solid Waste Bag hoặc Solid Waste Bag With Insert	07435967001 hoặc 08030073001
cobas® **omni** Secondary Tubes 13x75 (tùy chọn)	06438776001
cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
cobas® PCR Media Disposable Tube Stand (tùy chọn)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050*,**	03143449001
RD5 RACK – RD Standard rack 0001-0050 LR*,**	11902997001
Khay mang 16 ống*	09224319001
Khay mang 5 ống*	09224475001

* Liên hệ văn phòng đại diện của Roche tại địa phương để biết danh sách đặt hàng chi tiết cho khay đựng mẫu.

** Khay MPA 16mm hoặc khay mang 16 ống là các khay được ưu tiên sử dụng hơn với các mẫu được thu thập trong **cobas**® PCR Media tube.

Vật liệu yêu cầu thêm cho hệ thống cobas® 6800/8800

Bảng 9 Vật liệu và vật tư tiêu hao được sử dụng trên hệ thống **cobas**® 6800/8800

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
Solid Waste Bag và Solid Waste Container hoặc Solid Waste Bag With Insert và Kit Drawer Solid Waste Update	07435967001 và 07094361001 hoặc 08030073001 và 08387281001
cobas® **omni** Secondary Tubes 13x75 (tùy chọn)	06438776001
cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
cobas® PCR Media Disposable Tube Stand (tùy chọn)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050*,**	03143449001

* Liên hệ văn phòng đại diện của Roche tại địa phương để biết danh sách đặt hàng chi tiết cho giá đựng mẫu, giá đựng các đầu típ có vón cục và khay đựng giá được chấp nhận trên thiết bị

** Khay mang MPA 16mm là các khay được ưu tiên sử dụng hơn với các mẫu được thu thập trong **cobas**® PCR Media tube.

Bảng 10 Bộ thu mẫu nước tiểu cho xét nghiệm **cobas**® BKV

Bộ thu mẫu	**P/N**
cobas® PCR Urine Sample Kit	05170486190
cobas® PCR Media Kit	06466281190

Lưu ý: Bộ thu mẫu **cobas**® PCR Urine Sample Kit được sử dụng để thu mẫu và vận chuyển mẫu nước tiểu. Mỗi bộ thu mẫu **cobas**® PCR Urine Sample Kit có chứa 100 gói **cobas**® PCR Urine Sample. Mỗi gói có chứa 1 pipet vô trùng và 1 ống môi trường **cobas**® PCR Media tube, chứa 4.3 mL dung dịch **cobas**® PCR Media. Bộ lấy mẫu **cobas**® PCR Media giúp ổn định axit nucleic trong quá trình vận chuyển và bảo quản mẫu nước tiểu.
Đối với mẫu nước tiểu gửi trực tiếp đến phòng xét nghiệm mà không dùng bộ lấy mẫu **cobas**® PCR Urine Sample Kit trong khi thu mẫu, bộ lấy mẫu **cobas**® PCR Media kit có chứa 100 ống **cobas**® PCR Media (không có pipet vô trùng) có thể được sử dụng như một giải pháp thay thế, nhưng mẫu nước tiểu phải được thu thập và gửi đến phòng xét nghiệm trong vòng 24 giờ.

Thiết bị và phần mềm yêu cầu

Phần mềm hệ thống **cobas**® 5800 và bộ phân tích **cobas**® BKV cho hệ thống **cobas**® 5800 phải được cài đặt trên máy **cobas**® 5800. Phần mềm x800 Data Manager và máy tính cho hệ thống **cobas**® 5800 được cung cấp cùng với hệ thống.
Phần mềm hệ thống **cobas**® 6800/8800 và bộ phân tích **cobas**® BKV phải được cài đặt trên máy. Instrument Gateway (IG) server được cung cấp cùng với hệ thống.

Bảng 11 Thiết bị

Thiết bị	**P/N**
Hệ thống **cobas**® 5800	08707464001
Hệ thống **cobas**® 6800 (Tùy chọn có di chuyển)	05524245001 và 06379672001
Hệ thống **cobas**® 6800 (Cố định)	05524245001 và 06379664001
Hệ thống **cobas**® 8800	05412722001
Sample Supply Module	06301037001

Tham khảo Hướng dẫn vận hành hệ thống **cobas**® 5800 hoặc **cobas**® 6800/8800 để biết thêm thông tin.
Lưu ý: Liên hệ văn phòng đại diện của Roche tại địa phương để biết danh sách đặt hàng chi tiết cho ống mẫu sơ cấp và thứ cấp, giá đựng mẫu, giá đựng các đầu típ có vón cục và khay đựng giá được chấp nhận trên thiết bị.
cobas® BKV chấp nhận ống sơ cấp thu mẫu nước tiểu là môi trường **cobas**® PCR Media.

Yêu cầu về thận trọng và thao tác

Cảnh báo và thận trọng

Như bất kỳ quy trình xét nghiệm nào, thực hành tốt phòng xét nghiệm cần thiết để đảm bảo cho hiệu năng xét nghiệm. Do độ nhạy cao của xét nghiệm này, nên thận trọng giữ cho các thuốc thử và hỗn hợp khuếch đại không bị nhiễm.

- Chỉ dùng trong chẩn đoán in vitro.
- Xét nghiệm **cobas**® BKV chưa được đánh giá để sử dụng như là một xét nghiệm sàng lọc sự hiện diện của BKV trong máu hay các sản phẩm từ máu.
- Tất cả các mẫu bệnh phẩm nên được xử lý như vật liệu có nguy cơ lây nhiễm, sử dụng quy trình thực hành tốt phòng xét nghiệm như các quy trình được nêu trong An toàn sinh học trong Phòng xét nghiệm Vi sinh và Y sinh và trong Tài liệu CLSI M29-A4.[19,20] Chỉ có nhân viên thành thạo trong việc xử lý vật liệu lây nhiễm và sử dụng xét nghiệm **cobas**® BKV và hệ thống **cobas**® 5800/6800/8800 mới thực hiện quy trình này.
- Tất cả vật liệu có nguồn gốc từ người nên được xem là có khả năng lây nhiễm và nên được xử lý với các thận trọng chung. Nếu xảy ra tràn đổ, khử trùng ngay với dung dịch 0.6% natri hoặc kali hypochlorite mới pha trong nước cất hoặc nước khử ion hoặc theo quy trình thích hợp tại chỗ.
- **cobas**® EBV/BKV Control Kit chứa huyết tương từ máu người. Nguyên vật liệu đã được xét nghiệm bởi các phương pháp PCR hiện hành có kết quả không phản ứng đối với mẫu nồng độ thấp BKV DNA. Không có phương pháp xét nghiệm nào có thể đảm bảo tuyệt đối khả năng không lây nhiễm từ các sản phẩm lấy từ máu người.
- **Không đông lạnh mẫu máu toàn phần hoặc mẫu nước tiểu được bảo quản trong các ống sơ cấp**
- Chỉ sử dụng các vật tư tiêu hao được cung cấp hoặc yêu cầu rõ để đảm bảo hiệu năng xét nghiệm tối ưu.
- Bảng dữ liệu an toàn hóa chất (SDS) có sẵn khi có yêu cầu, liên hệ văn phòng đại diện Roche tại địa phương.
- Tuân thủ chặt chẽ các quy trình và hướng dẫn được cung cấp để đảm bảo xét nghiệm được thực hiện một cách chính xác. Bất kỳ sai lệch nào so với quy trình và hướng dẫn có thể ảnh hưởng đến hiệu năng xét nghiệm tối ưu.
- Có thể xảy ra kết quả dương tính giả nếu không kiểm soát nhiễm chéo mẫu thích hợp trong quá trình thao tác và xử lý mẫu.
- Môi trường **cobas**® PCR Media (từ ống lấy mẫu sơ cấp) có chứa guanidine hydrochloride. **Không để phản ứng trực tiếp giữa guanidine hydrochloride và natri hypochlorite (dung dịch tẩy rửa) hoặc các thuốc thử phản ứng mạnh như axit hoặc bazơ. Hỗn hợp phản ứng có thể tạo ra khí độc.** Nếu dung dịch có chứa guanidine hydrochloride bị tràn đổ, làm sạch ngay bằng các chất tẩy rửa phòng xét nghiệm và nước. Nếu dung dịch có chứa các tác nhân lây nhiễm, **TRƯỚC TIÊN** cần làm sạch khu vực phòng thí nghiệm với các chất tẩy rửa và nước, sau đó là dung dịch 0.6% natri hoặc kali hypochlorite.
- Thông báo cho cơ quan có thẩm quyền tại địa phương và nhà sản xuất về bất kỳ sự cố nghiêm trọng nào có thể xảy ra khi sử dụng xét nghiệm này.

Thao tác với thuốc thử

- Thao tác với tất cả thuốc thử, mẫu vật liệu kiểm soát (mẫu chứng), và mẫu thử theo nguyên tắc thực hành tốt phòng xét nghiệm nhằm tránh nhiễm chéo giữa mẫu thử hoặc mẫu vật liệu kiểm soát.
- Trước khi sử dụng, kiểm tra cảm quan mỗi hộp cassette thuốc thử, chất pha loãng, thuốc thử ly giải, và dung dịch rửa để đảm bảo không có dấu hiệu rò rỉ. Nếu có bất kỳ dấu hiệu rò rỉ nào, không sử dụng vật liệu đó để xét nghiệm.

- **cobas**® **omni** Lysis Reagent chứa guanidine thiocyanate, một chất hóa học có khả năng gây hại. Tránh để những thuốc thử tiếp xúc với da, mắt hoặc niêm mạc. Nếu có sự cố xảy ra, rửa ngay lập tức với thật nhiều nước; nếu không, có thể gây bỏng.
- Hộp thuốc thử xét nghiệm **cobas**® BKV, **cobas**® **omni** MGP Reagent, và **cobas**® **omni** Specimen Diluent có chứa natri azide chứa natri azide làm chất bảo quản. Tránh để những thuốc thử tiếp xúc với da, mắt hoặc niêm mạc. Nếu có sự cố xảy ra, rửa ngay lập tức với thật nhiều nước; nếu không, có thể gây bỏng. Nếu các thuốc thử này bị tràn, pha loãng với nước trước khi lau khô.
- Không được cho **cobas**® **omni** Lysis Reagent, chứa guanidine thiocyanate, tiếp xúc với dung dịch natri hypochlorite (dung dịch tẩy rửa). Hỗn hợp này có thể tạo ra khí rất độc.
- Vứt bỏ tất cả các vật liệu đã tiếp xúc với các mẫu và thuốc thử theo quy định của quốc gia, nhà nước, và địa phương.

Thực hành tốt phòng xét nghiệm

- Không được hút pipet bằng miệng.
- Không được ăn, uống, hoặc hút thuốc trong khu vực làm việc được chỉ định.
- Mang găng tay dùng cho phòng xét nghiệm, mặc áo khoác dùng cho phòng xét nghiệm, và mang kính bảo vệ mắt khi thao tác với mẫu thử và thuốc thử. Phải thay đổi găng tay giữa những lần làm việc với mẫu và hộp thuốc thử xét nghiệm **cobas**® BKV, EBV/BKV Low Positive Control (EBV/BKV L (+)C), EBV/BKV High Positive Control (EBV/BKV H(+)C), **cobas**® Buffer Negative Control Kit và thuốc thử **cobas**® **omni** để tránh nhiễm. Tránh làm dính vào găng tay khi thao tác với mẫu và mẫu vật liệu kiểm soát (mẫu chứng).
- Rửa tay kỹ sau khi thao tác trên mẫu và bộ thuốc thử, và sau khi tháo găng tay.
- Rửa kỹ và tẩy trùng tất cả các bề mặt tại khu vực làm việc trong phòng xét nghiệm với dung dịch natri hoặc kali hypochlorite 0.6% mới pha trong nước cất hoặc nước khử ion. Sau đó lau bề mặt với ethanol 70%.
- Nếu tràn đổ trên thiết bị **cobas**® 5800 hoặc **cobas**® 6800/8800, làm theo hướng dẫn trong Hướng dẫn vận hành Hệ thống **cobas**® 5800 hoặc **cobas**® 6800/8800– Hỗ trợ người dùng và/ hoặc Hướng dẫn người dùng để vệ sinh và khử nhiễm bề mặt các thiết bị đúng cách.

Lấy mẫu, vận chuyển và bảo quản mẫu

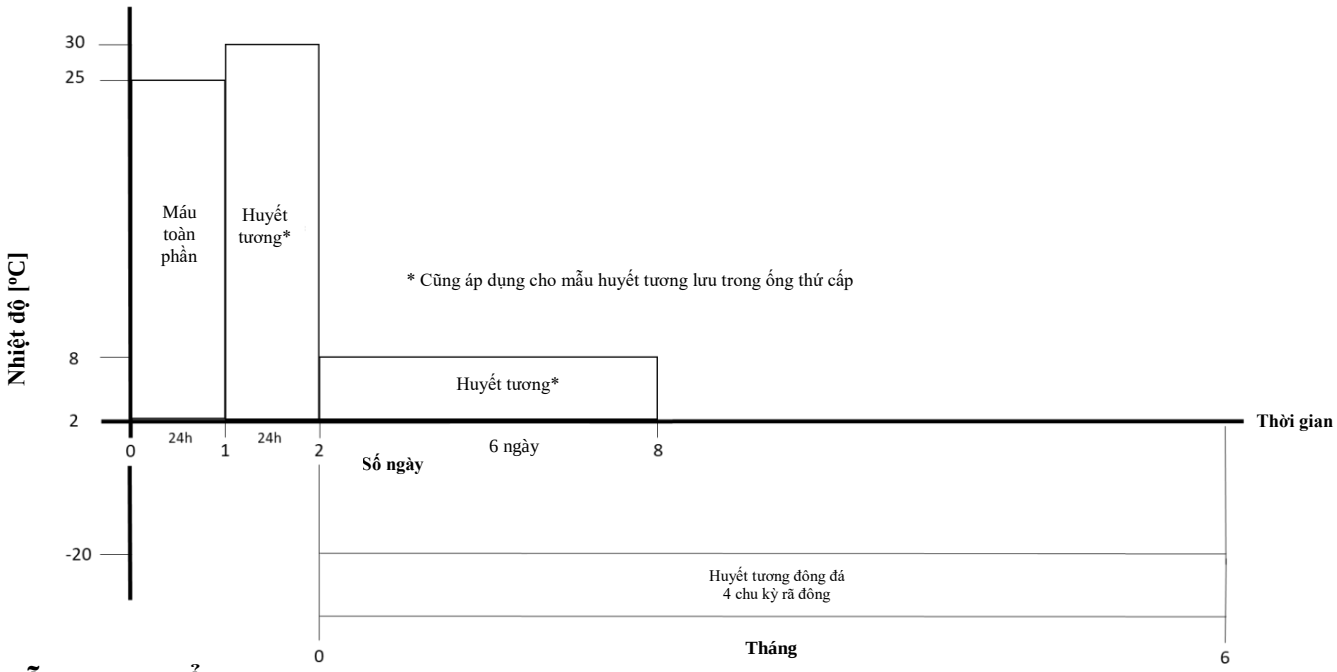
Lưu ý: Thao tác trên tất cả các mẫu xét nghiệm và vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) như là mẫu bệnh phẩm có khả năng lây nhiễm.

Mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA

- Bảo quản tất cả các mẫu ở nhiệt độ quy định. Độ ổn định của mẫu bị ảnh hưởng bởi nhiệt độ cao.
- Nếu sử dụng mẫu đông lạnh trong ống thứ cấp, đặt mẫu ở nhiệt độ phòng (15-30°C) cho đến khi rã đông hoàn toàn rồi trộn nhanh (ví dụ vortex trong 3-5 giây) và ly tâm để thu toàn bộ thể tích mẫu ở đáy ống.
- Máu toàn phần nên được thu nhận trong Ống Chuẩn bị Huyết tương BD Vacutainer® PPT™ cho các Phương pháp Xét nghiệm Chẩn đoán Phân tử hoặc trong các ống vô trùng sử dụng EDTA làm chất chống đông máu. Làm theo hướng dẫn của nhà sản xuất ống lấy mẫu. Tham khảo Hình 1.
- Máu toàn phần được thu nhận trong Ống Chuẩn bị Huyết tương BD Vacutainer® PPT™ cho các Phương pháp Xét nghiệm Chẩn đoán Phân tử hoặc trong các ống vô trùng sử dụng EDTA làm chất chống đông máu có thể được bảo quản và/hoặc vận chuyển trong tối đa 24 giờ ở 2-25°C trước khi chuẩn bị huyết tương. Quá trình ly tâm nên được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Các mẫu huyết tương sau khi tách có thể được bảo quản trong 24 giờ ở 2-30°C trong các ống sơ cấp hoặc thứ cấp, và có thể là:
    - Bảo quản trong ống sơ cấp hoặc thứ cấp tối đa 6 ngày ở 2-8°C.

  - Bảo quản trong ống thứ cấp lên đến 6 tháng ở ≤ -20°C.
- Các mẫu huyết tương ổn định trong tối đa 4 chu kỳ đông/rã đông khi đông lạnh ở ≤ -20°C.
- Nếu các mẫu được vận chuyển, chúng phải được đóng gói và dán nhãn tuân thủ các quy định hiện hành của quốc gia và/hoặc quốc tế về vận chuyển mẫu và tác nhân gây bệnh.

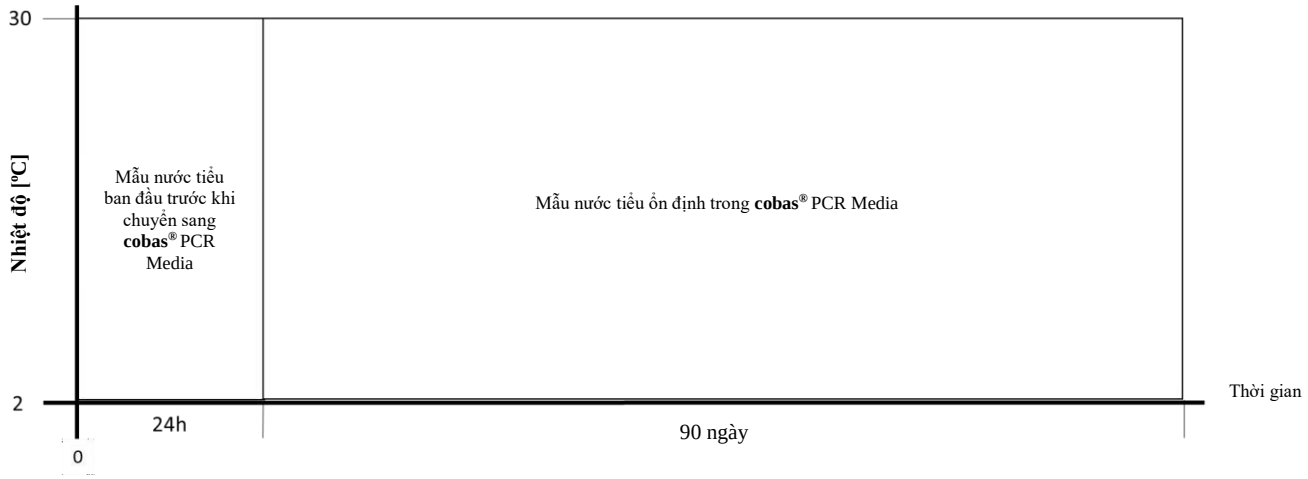
Hình 1 Điều kiện bảo quản cho mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA



Mẫu nước tiểu

- Chỉ sử dụng **cobas**® PCR Urine Sample Kit để thu nhận và ổn định mẫu nước tiểu cho xét nghiệm **cobas**® BKV. Xét nghiệm **cobas**® BKV chưa được kiểm chứng để sử dụng với môi trường và dụng cụ thu nhận nước tiểu khác. Sử dụng xét nghiệm **cobas**® BKV với các môi trường và dụng cụ thu nhận nước khác có thể dẫn đến kết quả âm tính giả, dương tính giả và/hoặc không hợp lệ.
- Mẫu nước tiểu phải được chuyển ngay vào ống **cobas**® PCR Media tube (đã ổn định). Nếu không thể chuyển mẫu ngay lập tức, chúng có thể được bảo quản ở 2°C đến 30°C trong tối đa 24 giờ.
- Khi các mẫu nước tiểu được ổn định trong môi trường **cobas**® PCR media, các mẫu có thể được bảo quản trong tối đa 90 ngày ở 2-30°C. Tham khảo Hình 2.
- Các mẫu nước tiểu chưa xét nghiệm phải có mực chất lỏng giữa hai vạch màu đen trên nhãn ống chứa môi trường cobas PCR **cobas**®. Nếu mức chất lỏng cao hơn hoặc thấp hơn các vạch này, mẫu thử chưa được lấy đúng cách và không thể được sử dụng để xét nghiệm.
- Nếu không có đủ thể tích nước tiểu (4.3 mL) để pha loãng trong ống **cobas**® PCR Urine Sample, nước tiểu có thể được pha loãng thủ công bằng **cobas**® PCR media. Trước khi xét nghiệm với **cobas**® BKV, ít nhất 0.5 mL nước tiểu nguyên bản phải được pha loãng thủ công trong Môi trường **cobas**® PCR Media (tỷ lệ 1:1).
- Để tránh nhiễm chéo các mẫu đã xử lý, nên sử dụng các nắp bổ sung cho các ống **cobas**® PCR Media tube có màu khác (trung tính; xem **Vật liệu bổ sung**) để đậy các mẫu sau khi xét nghiệm.
- Nếu cần xét nghiệm bổ sung, đảm bảo rằng còn lại ít nhất 1.2 mL mẫu trong ống chứa dung dịch **cobas**® PCR media.
- Nếu các mẫu được vận chuyển, chúng phải được đóng gói và dán nhãn tuân thủ các quy định hiện hành của quốc gia và/hoặc quốc tế về vận chuyển mẫu và tác nhân gây bệnh.

Hình 2 Điều kiện bảo quản cho mẫu nước tiểu



Hướng dẫn sử dụng

Những lưu ý quy trình

- Không sử dụng thuốc thử xét nghiệm **cobas**® BKV, **cobas**® EBV/BKV Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit, hoặc **cobas**® **omni** reagents sau ngày hết hạn sử dụng.
- Không sử dụng lại vật tư tiêu hao. Chúng chỉ được sử dụng một lần.
- Đảm bảo rằng mã vạch của ống mẫu được nhìn rõ ở khe hở của mỗi vị trí đặt ống mẫu trên khay mẫu RD5 hoặc MPA. Tham khảo Hướng dẫn vận hành hệ thống **cobas**® 5800 hoặc **cobas**® 6800/8800 để có thông số về mã vạch thích hợp và các thông tin thêm về các loại ống mẫu có thể nạp trên hệ thống.
- Tham khảo Hướng dẫn vận hành hệ thống **cobas**® 5800 hoặc **cobas**® 6800/8800 để bảo trì các thiết bị thích hợp.

Chạy xét nghiệm cobas® BKV trên hệ thống cobas® 5800

Xét nghiệm **cobas**® BKV có thể được chạy với thể tích mẫu yêu cầu tối thiểu là 350 µL mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA (cho quy trình mẫu thử 200 µL) và tối thiểu 550 µL cho mẫu nước tiểu ổn định (cho quy trình mẫu thử 400 µL). Quy trình xét nghiệm được mô tả chi tiết trong Hướng dẫn vận hành hệ thống **cobas**® 5800. Hình 3 dưới đây tóm tắt quy trình xét nghiệm.

- Mẫu phải được mở nắp và nạp trực tiếp lên khay mẫu cho quy trình chuẩn bị mẫu trên hệ thống **cobas**® 5800.
- Một mẻ chạy lẻ có thể kết hợp các loại mẫu khác nhau (huyết tương, nước tiểu ổn định).

Mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA và mẫu nước tiểu ổn định nên được chỉ định quy trình chuẩn bị theo loại mẫu tương ứng được lựa chọn trên màn hình giao diện người dùng (UI) của xét nghiệm **cobas**® BKV được mô tả trong Hình 3, bước 2.

Hình 3 Quy trình xét nghiệm **cobas**® **BKV** trên hệ thống **cobas**® 5800

1 Đăng nhập hệ thống
Nhấn Start để chuẩn bị

2 Nạp mẫu lên hệ thống
- Nạp khay mẫu thử vào hệ thống
- Hệ thống tự động chuẩn bị
- Đăng kí xét nghiệm cho mẫu
  - Chọn “Plasma” cho mẫu huyết tương EDTA
  - Chọn “Urine” cho mẫu nước tiểu thu trong ống cobas PCR Media
    - Mở nắp ống
    - Gắn ống trực tiếp lên khay mẫu thử

3 Thêm thuốc thử và vật tư tiêu hao theo yêu cầu của hệ thống
- Nạp đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm
- Nạp giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng)
- Nạp các đầu típ xử lý
- Nạp các đầu típ rửa giải
- Nạp các đĩa xử lý
- Nạp các đĩa chất thải lỏng
- Nạp các đĩa khuếch đại
- Nạp hộp cassette MGP
- Thêm chất pha loãng mẫu
- Thêm thuốc thử ly giải
- Thêm đệm rửa

4 Bắt đầu chạy xét nghiệm bằng cách chọn nút Start processing trên giao diện người sử dụng, tất cả các mẻ chạy sau đó sẽ được tự động bắt đầu nếu không bị hoãn thủ công bởi người sử dụng.

5 Kiểm tra và xuất kết quả

6 Lấy ra và đậy nắp bất kỳ ống mẫu nào đáp ứng yêu cầu thể tích tối thiểu để sử dụng thêm nếu cần
Vệ sinh thiết bị
- Lấy giá mini vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) đã hết ra khỏi máy
- Lấy hộp cassette thuốc thử xét nghiệm đặc hiệu đã hết ra khỏi máy
- Dọn khay đựng các đĩa khuếch đại
- Đổ bỏ chất thải lỏng
- Đổ bỏ chất thải rắn

Chạy xét nghiệm cobas® BKV trên hệ thống cobas® 6800/8800

Xét nghiệm **cobas**® BKV có thể được chạy với thể tích mẫu yêu cầu tối thiểu là 350 µL mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA (cho quy trình mẫu thử 200 µL) và tối thiểu 550 µL cho mẫu nước tiểu ổn định (cho quy trình mẫu thử 400 µL). Quy trình xét nghiệm được mô tả chi tiết trong Hướng dẫn vận hành hệ thống **cobas**® 6800/8800. Hình 4 dưới đây tóm tắt quy trình xét nghiệm.

- Mẫu phải được mở nắp và nạp trực tiếp lên khay mẫu cho quy trình chuẩn bị mẫu trên hệ thống **cobas**® 6800/8800.
- Một mẻ chạy lẻ có thể kết hợp các loại mẫu khác nhau (huyết tương, nước tiểu ổn định).
- Mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA và mẫu nước tiểu ổn định nên được chỉ định quy trình chuẩn bị theo loại mẫu tương ứng được lựa chọn trên màn hình giao diện người dùng (UI) của xét nghiệm **cobas**® BKV được mô tả trong Hình 4, bước 1.

Hình 4 Quy trình xét nghiệm **cobas**® BKV trên hệ thống **cobas**® 6800/8800

1	Đăng nhập hệ thống Nhấn Start để chuẩn bị hệ thống Đăng kí xét nghiệm cho từng mẫu ● Chọn "Plasma" cho mẫu huyết tương EDTA specimens ● Chọn "Urine" cho mẫu nước tiểu thu bằng ống **cobas**® PCR Media
2	Thêm thuốc thử và vật tư tiêu hao theo yêu cầu của hệ thống ● Nạp đúng hộp cassette thuốc thử xét nghiệm ● Nạp hộp cassette vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) ● Nạp các đầu típ pipet ● Nạp các đĩa xử lý ● Nạp thuốc thử MGP ● Nạp các đĩa khuếch đại ● Thêm chất pha loãng mẫu ● Thêm thuốc thử ly giải ● Thêm đệm rửa
3	Nạp mẫu lên hệ thống ● Đối với mẫu nước tiểu thu trong ống **cobas**® PCR Media o Mở nắp ống o Gắn ống trực tiếp lên khay mẫu ● Nạp giá mẫu thử và giá đựng các đầu típ vón cục vào môđun cung cấp mẫu ● Xác nhận mẫu đã được chấp nhận chỉ định vào môđun chuyển mẫu
4	Bắt đầu chạy xét nghiệm bằng cách chọn nút Start manually trên giao diện người sử dụng hoặc để máy tự động chạy sau 120 phút hoặc khi mẻ xét nghiệm đã có đủ mẫu
5	Kiểm tra và xuất kết quả
6	Lấy ra và đậy nắp bất kỳ ống mẫu nào đáp ứng yêu cầu thể tích tối thiểu để sử dụng thêm nếu cần Vệ sinh thiết bị ● Lấy các hộp cassette mẫu chứng đã hết ra ● Dọn khay đựng các đĩa khuếch đại ● Đổ bỏ chất thải lỏng ● Đổ bỏ chất thải rắn

Kết quả

Hệ thống **cobas**® 5800/6800/8800 tự động xác định nồng độ DNA BKV cho mẫu thử và mẫu vật liệu kiểm soát (mẫu chứng). Nồng độ DNA BKV được thể hiện với Đơn vị quốc tế trong mỗi mL (IU/mL).

Kiểm tra chất lượng và tính hợp lệ của kết quả trên hệ thống cobas® 5800

- Một mẫu vật liệu kiểm soát âm tính (mẫu chứng âm) [(–) Ctrl] và hai mẫu vật liệu kiểm soát dương tính (mẫu chứng dương), gồm một mẫu vật liệu kiểm soát dương tính nồng độ thấp [EBV/BKV L (+) C] và một mẫu vật liệu kiểm soát dương tính nồng độ cao [EBV/BKV H (+) C], được xử lý ít nhất mỗi 72 giờ hoặc với mỗi lô bộ kit mới. Mẫu vật liệu kiểm soát dương tính và/hoặc âm tính có thể được chạy thường xuyên hơn tuân theo quy trình của phòng xét nghiệm và/hoặc quy định của địa phương.
- Trong phần mềm hệ thống **cobas**® 5800 và/hoặc báo cáo, kiểm tra cờ hiệu và các kết quả liên quan để đảm bảo tính hợp lệ của mẻ.

Kết quả được tự động gán là không hợp lệ bởi phần mềm **cobas**® 5800 khi kết quả của mẫu vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) âm tính hoặc dương tính không đạt.

LƯU Ý: Hệ thống **cobas**® 5800 được cung cấp với cài đặt tiêu chuẩn là chạy một bộ các mẫu vật liệu kiểm soát (âm tính và dương tính) trong mỗi mẻ chạy, tuy nhiên cài đặt này có thể được điều chỉnh ít thường xuyên hơn, thành mỗi 72 giờ tuân theo quy trình của phòng xét nghiệm và/hoặc quy định của địa phương. Vui lòng liên hệ với đại diện Roche tại địa phương để biết thêm thông tin.

Kiểm tra kết quả trên hệ thống cobas® 5800

Các kết quả của mẫu vật liệu kiểm soát được hiển thị trên phần mềm **cobas**® 5800 trong ứng dụng "Controls".

- Mẫu vật liệu kiểm soát được hiển thị "Valid" ở cột "Control result" nếu tất cả các đích của mẫu vật liệu kiểm soát được báo cáo là hợp lệ. Mẫu vật liệu kiểm soát được hiển thị "Invalid" ở cột "Control result" nếu tất cả hoặc một trong các đích của mẫu vật liệu kiểm soát được báo cáo là không hợp lệ.
- Mẫu vật liệu kiểm soát được hiển thị 'Invalid' sẽ xuất hiện cờ hiệu ở cột "Flags". Thông tin thêm về lý do mẫu vật liệu kiểm soát được báo cáo là không hợp lệ, bao gồm cả thông tin cờ hiệu được hiển thị trong chế độ xem thông tin chi tiết.
- Nếu một trong các mẫu vật liệu kiểm soát là không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm cho tất cả các mẫu vật liệu kiểm soát và mẫu có liên quan.

Kiểm tra chất lượng và tính hợp lệ của kết quả trên hệ thống cobas® 6800/8800

- Một mẫu vật liệu kiểm soát âm tính (mẫu chứng âm) [(–) Ctrl] và hai mẫu vật liệu kiểm soát dương tính (mẫu chứng dương), gồm một mẫu vật liệu kiểm soát dương tính nồng độ thấp [EBV/BKV L (+) C] và một mẫu vật liệu kiểm soát dương tính nồng độ cao [EBV/BKV H (+) C], được xử lý trong mỗi mẻ xét nghiệm.
- Trong phần mềm hệ thống **cobas**® 6800/8800 và/hoặc báo cáo, kiểm tra cờ hiệu và các kết quả liên quan để đảm bảo tính hợp lệ của mẻ.
- Mẻ xét nghiệm hợp lệ nếu không xuất hiện cờ hiệu cho tất cả ba mẫu vật liệu kiểm soát, gồm một mẫu vật liệu kiểm soát âm tính và hai mẫu vật liệu kiểm soát dương tính: EBV/BKV L (+) C, EBV/BKV H (+) C. Kết quả mẫu vật liệu kiểm soát âm tính được hiển thị là (–) Ctrl và kết quả mẫu vật liệu kiểm soát dương tính nồng độ thấp và cao được hiển thị là EBV/BKV L (+) C và EBV/BKV H (+) C.

Kết quả được tự động gán là không hợp lệ bởi phần mềm **cobas**® 6800/8800 khi kết quả của mẫu vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) âm tính và dương tính không đạt.

Cờ hiệu kiểm soát trên hệ thống cobas® 6800/8800

Bảng 12 Cờ hiệu kiểm soát cho mẫu vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) âm tính và dương tính

Vật liệu kiểm soát âm tính (Mẫu chứng âm)	**Cờ hiệu**	**Kết quả**	**Biện luận**
(–) Ctrl	Q02 (Mẻ vật liệu kiểm soát không đạt)	Không hợp lệ	Một kết quả không hợp lệ hoặc kết quả tính nồng độ cho mẫu vật liệu kiểm soát (mẫu chứng) âm tính nhưng không âm tính.
Vật liệu kiểm soát dương tính (Mẫu chứng dương)	**Cờ hiệu**	**Kết quả**	**Biện luận**
EBV/BKV L (+) C	Q02 (Mẻ vật liệu kiểm soát không đạt)	Không hợp lệ	Một kết quả không hợp lệ hoặc kết quả tính nồng độ cho mẫu vật liệu kiểm soát dương tính nồng độ thấp không nằm trong khoảng giá trị chỉ định
EBV/BKV H (+) C	Q02 (Mẻ vật liệu kiểm soát không đạt)	Không hợp lệ	Một kết quả không hợp lệ hoặc kết quả tính nồng độ cho mẫu vật liệu kiểm soát dương tính nồng độ cao không nằm trong khoảng giá trị chỉ định.

Nếu mẻ xét nghiệm không hợp lệ, lặp lại xét nghiệm của toàn bộ mẻ bao gồm mẫu và mẫu vật liệu kiểm soát (mẫu chứng)

Biện luận kết quả

Đối với một mẻ vật liệu kiểm soát hợp lệ, kiểm tra từng mẫu riêng lẻ về cờ hiệu trong phần mềm hệ thống **cobas**® 5800 và **cobas**® 6800/8800 và/hoặc báo cáo. Biện luận kết quả nên được thực hiện như sau:

- Một mẻ xét nghiệm hợp lệ có thể bao gồm kết quả mẫu hợp lệ và không hợp lệ.

Bảng 13 Biện luận kết quả đích cho từng kết quả đích riêng lẻ

Kết quả	Biện luận
Target Not Detected	Không phát hiện DNA BKV Báo cáo kết quả là "không phát hiện BKV".
< Titer Min[a]	Nồng độ tính nằm dưới Giới hạn định lượng dưới (LLoQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là "Phát hiện BKV, thấp hơn (Nồng độ tối thiểu Titer Min)." Nồng độ tối thiểu của mẫu huyết tương EDTA = 21.5 IU/mL Nồng độ tối thiểu của mẫu nước tiểu = 200 IU/mL
Titer	Nồng độ tính nằm trong Khoảng tuyến tính của xét nghiệm - lớn hơn hoặc bằng Nồng độ tối thiểu và nhỏ hơn hoặc bằng Nồng độ tối đa Titer Max. Báo cáo kết quả là "Phát hiện (Nồng độ) BKV".
> Titer Max[b]	Nồng độ tính nằm trên Giới hạn định lượng trên (ULoQ) của xét nghiệm. Báo cáo kết quả là "Phát hiện BKV, cao hơn (Nồng độ tối đa Titer Max)." Nồng độ tối đa BKV phát hiện trong mẫu huyết tương EDTA và mẫu nước tiểu là = 1.0E+08 IU/mL

[a] Kết quả mẫu < Titer min (Nồng độ mẫu phát hiện BKV < LLoQ) nên được biện luận cùng với các dữ liệu lâm sàng khác và không nên chỉ dựa vào mình nó để làm cơ sở đưa đến các quyết định điều trị.\

[b] Kết quả mẫu > Titer max là do những mẫu dương tính với BKV được phát hiện với nồng độ nằm trên giới hạn định lượng trên (ULoQ). Nếu muốn thu được kết quả định lượng, phải pha loãng mẫu ban đầu với huyết tương chống đông bằng EDTA âm tính với BKV và mẫu nên được làm lặp lại. Nhân kết quả xét nghiệm thu được với hệ số pha loãng.

Biện luận kết quả trên hệ thống cobas® 5800

Các kết quả của mẫu thử được hiển thị trên phần mềm **cobas**® 5800 trong ứng dụng "Results".

Đối với một mẻ chạy hợp lệ, kiểm tra từng mẫu riêng lẻ về cờ hiệu trong phần mềm **cobas**® 5800 và/hoặc báo cáo. Biện luận kết quả nên được thực hiện như sau:

- Nếu tất cả kết quả đích của mẫu vật liệu kiểm soát đều được báo cáo hợp lệ, các mẫu thử có liên quan đến mẻ chạy hợp lệ sẽ được hiển thị là 'Valid' ở cột "Control result". Nếu tất cả kết quả đích của mẫu vật liệu kiểm soát đều được báo cáo không hợp lệ, các mẫu thử có liên quan đến mẻ chạy không đạt sẽ được hiển thị là 'Invalid' ở cột "Control result".
- Nếu các mẫu vật liệu kiểm soát có liên quan của một kết quả mẫu thử là không hợp lệ, một cờ hiệu đặc biệt sẽ xuất hiện trong kết quả mẫu thử như sau:
    - Q05D : Thẩm định kết quả không đạt do vật liệu kiểm soát dương tính (mẫu chứng dương) không hợp lệ
    - Q06D :Thẩm định kết quả không đạt do vật liệu kiểm soát âm tính (mẫu chứng âm) không hợp lệ.
- Các giá trị trong cột "Results" cho kết quả đích của mỗi mẫu thử riêng lẻ phải được biện luận như Bảng 13 ở trên.

Nếu có một hoặc nhiều hơn đích mẫu thử được đánh dấu là "Invalid", phần mềm **cobas**® 5800 sẽ báo cờ hiệu ở cột "Flags". Thông tin thêm về lý do đích xét nghiệm của mẫu được báo cáo là không hợp lệ, bao gồm cả thông tin cờ hiệu được hiển thị trong chế độ xem thông tin chi tiết.

Biện luận kết quả trên hệ thống cobas® 6800/8800

Đối với một mẻ xét nghiệm hợp lệ, kiểm tra từng mẫu thử riêng lẻ về cờ hiệu trong phần mềm hệ thống **cobas**® 6800/8800 và/hoặc báo cáo. Biện luận kết quả nên được thực hiện như sau:

- Các mẫu được đánh dấu "Yes" ở cột 'Valid' nếu tất cả Kết quả đích yêu cầu được báo cáo là kết quả hợp lệ. Các mẫu được đánh dấu "No" ở cột 'Valid' có thể cần thao tác và biện luận thêm.
- Các giá trị cho kết quả đích của mỗi mẫu thử riêng lẻ phải được biện luận như Bảng 13 ở trên.

Giới hạn về quy trình

- Xét nghiệm **cobas**® BKV chỉ được đánh giá để sử dụng kết hợp với **cobas**® EBV/BKV Control Kit, **cobas**® buffer Negative Control Kit, **cobas**® **omni** MGP Reagent, **cobas**® **omni** Lysis Reagent, **cobas**® **omni** Specimen Diluent, và **cobas**® **omni** Wash Reagent để sử dụng trên hệ thống **cobas**® 5800/6800/8800.
- Các kết quả đáng tin cậy phụ thuộc vào quy trình lấy mẫu, bảo quản và xử lý mẫu đúng cách.
- Xét nghiệm **cobas**® BKV này đã được thẩm định chỉ sử dụng cho huyết tương chống đông bằng EDTA và mẫu nước tiểu ổn định. Xét nghiệm **cobas**® BKV trên các loại mẫu khác có thể cho kết quả không chính xác. Nồng độ DNA trong mẫu huyết tương và nước tiểu ổn định không so sánh trực tiếp được với nhau trên cùng một mẫu bệnh và với các loại mẫu bệnh phẩm khác.
- Việc định lượng DNA BKV phụ thuộc vào số hạt vi rút hiện diện trong mẫu và có thể bị ảnh hưởng bởi các phương pháp lấy mẫu, các yếu tố bệnh nhân (nghĩa là tuổi, sự hiện diện các triệu chứng), và/hoặc giai đoạn nhiễm.
- Sự phân hủy BKV DNA trong mẫu nước tiểu nguyên bản ban đầu có thể ảnh hưởng đến việc định lượng.[17] Chuyển ngay nước tiểu sang môi trường **cobas**® PCR Media là yêu cầu bắt buộc để đạt được độ bền vững của mẫu.
- Sự thay đổi định lượng của DNA BKV vốn có trong nước tiểu đã được quan sát thấy trong các thí nghiệm ổn định mẫu vật ở các mốc thời gian lấy mẫu khác nhau (nước tiểu nguyên bản) hoặc trong các phần khác nhau của cùng một mẫu (mẫu nước tiểu nguyên bản hoặc mẫu nước tiểu ổn định trong môi trường **cobas**® PCR Media).
- Với những hạn chế này, kết quả DNA BKV nước tiểu nên được giải thích một cách thận trọng trong bối cảnh lâm sàng và các kết quả xét nghiệm khác và không nên là cơ sở duy nhất cho các quyết định điều trị.
- Mẫu nước tiểu có thể chứa nồng độ cao BKV DNA, dẫn đến nguy cơ nhiễm chéo giữa các mẫu.[18]
- Mặc dù hiếm, các đột biến trong vùng bảo tồn cao của bộ gen vi rút thuộc xét nghiệm **cobas**® BKV có thể ảnh hưởng đến sự gắn kết các đoạn mồi và/hoặc mẫu dò dẫn đến kết quả định lượng thấp hơn hoặc thất bại trong việc phát hiện vi rút.
- Do khác biệt vốn có giữa các kỹ thuật, khuyến cáo rằng trước khi chuyển từ công nghệ này sang công nghệ khác, người sử dụng thực hiện các nghiên cứu tương quan của phương pháp trong phòng xét nghiệm của mình để đánh giá sự khác biệt công nghệ. Người sử dụng phải tuân theo quy định/quy trình riêng của mình.
- Xét nghiệm **cobas**® BKV không được sử dụng như là một xét nghiệm sàng lọc sự hiện diện của BKV trong máu hay các sản phẩm từ máu.

Đánh giá hiệu năng cận lâm sàng

Đặc tính hiệu năng chính được thực hiện với mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA trên hệ thống cobas® 6800/8800

Giới hạn phát hiện (LoD) theo mẫu chuẩn quốc tế WHO

Giới hạn phát hiện của xét nghiệm **cobas**® BKV sử dụng bộ mẫu chuẩn quốc tế WHO được xác định bằng cách phân tích các bậc pha loãng nối tiếp của bộ mẫu chuẩn quốc tế sơ cấp BKV của WHO được lấy từ NIBSC (NIBSC 14/212), trong huyết tương người chông đông bằng EDTA âm tính với vi rút BKV. Các dàn mẫu bao gồm 6 nồng độ dương tính khác nhau kèm theo một mẫu trắng (mẫu blank) được thử nghiệm trên ba lô thuốc thử **cobas**® BKV, nhiều lần chạy, qua nhiều ngày, nhiều người vận hành và thiết bị khác nhau.

Kết quả thu được đối với huyết tương EDTA được thể hiện trong Bảng 14 đến Bảng 16. Nghiên cứu chứng minh rằng với lô ít nhạy cảm nhất, nồng độ mong đợi dự kiến với tỷ lệ đạt 95% là 21.5 IU/mL với khoảng tin cậy 95% trong thống kê PROBIT là 16.3 – 32.4 IU/mL trong mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA. Nồng độ thấp nhất với tỷ lệ đạt ≥ 95% là 19.0 IU/mL trong huyết tương chống đông EDTA.

Bảng 14 Giới hạn phát hiện của xét nghiệm đối với mẫu huyết tương chống đông EDTA, Lô 1

Nồng độ đầu vào (BKV DNA IU/mL)	**Số lần lặp lại hợp lệ**	**Số lượng kết quả dương tính**	**Tỷ lệ đạt theo %**
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 bằng PROBIT với tỷ lệ đạt 95%	21.5 IU/mL Khoảng tin cậy 95%: 16.3 – 32.4 IU/mL		

Bảng 15 Giới hạn phát hiện của xét nghiệm đối với mẫu huyết tương chống đông EDTA, Lô 2

Nồng độ đầu vào (BKV DNA IU/mL)	Số lần lặp lại hợp lệ	Số lượng kết quả dương tính	Tỷ lệ đạt theo %
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 bằng PROBIT với tỷ lệ đạt 95%	19.7 IU/mL Khoảng tin cậy 95%: 15.0 – 29.2 IU/mL		

Bảng 16 Giới hạn phát hiện của xét nghiệm đối với mẫu huyết tương chống đông EDTA, Lô 3

Nồng độ đầu vào (BKV DNA IU/mL)	Số lần lặp lại hợp lệ	Số lượng kết quả dương tính	Tỷ lệ đạt theo %
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 bằng PROBIT với tỷ lệ đạt 95%	19.3 IU/mL Khoảng tin cậy 95%: 14.8 – 28.5 IU/mL		

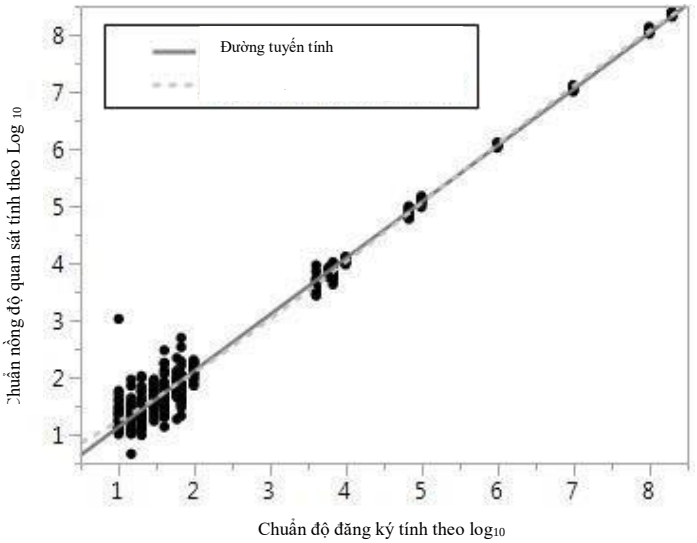
Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính của xét nghiệm **cobas**® BKV được đánh giá bằng cách sử dụng một chuỗi pha loãng bao gồm bộ 18 mẫu chuẩn dương tính với phân nhóm BKV DNA Ib có nồng độ bao phủ toàn bộ khoảng tuyến tính của xét nghiệm. Mẫu gốc DNA lambda chuẩn độ cao đã được sử dụng để chuẩn bị cho bộ 11 mẫu có nồng độ bao phủ toàn bộ khoảng tuyến tính. Một mẫu bệnh phẩm đã được sử dụng để chuẩn bị cho bộ 7 mẫu khác bao gồm các mức nồng độ trung bình – và nồng độ thấp của khoảng tuyến tính.

Mỗi mẫu trong dàn mẫu được thử nghiệm 36 lần lặp lại trên ba lô thuốc thử **cobas**® BKV và kết quả nghiên cứu được trình bày trong Hình 5.

cobas® BKV đã được chứng minh là tuyến tính từ nồng độ 1.01E+01 cho đến 1.97E+08 IU/mL và cho thấy độ lệch tuyệt đối so với hồi quy phi tuyến tính phù hợp hơn nhỏ hơn hoặc bằng ± 0.1 $\log_{10}$ trong huyết tương người chống đông bằng EDTA (xem Hình 5). Trên khoảng tuyến tính, Độ chính xác của phép thử nằm trong khoảng ± 0.2 $\log_{10}$.

Hình 5 Xác định khoảng tuyến tính trong mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA



Độ chụm – trong phòng xét nghiệm

Độ chụm của **cobas**® BKV được xác định bằng cách phân tích các bậc nồng độ pha loãng nối tiếp sử dụng nồng độ cao DNA BKV (phân nhóm Ib) trong huyết tương chống đông bằng EDTA âm tính với BKV. Năm mức pha loãng đã được thử nghiệm với 72 lần lặp lại cho mỗi mức trên ba lô thuốc thử **cobas**® BKV sử dụng bốn thiết bị và hai người vận hành trong 12 ngày. Mỗi mẫu được thực hiện theo toàn bộ quy trình **cobas**® BKV trên Hệ thống **cobas**® 6800/8800 hoàn toàn tự động. Do đó, Độ chụm được báo cáo ở đây đại diện cho tất cả các khía cạnh của quy trình thử nghiệm. Kết quả được thể hiện trong Bảng 17.
cobas® BKV cho thấy Độ chụm cao đối với ba lô thuốc thử được thử nghiệm trong khoảng nồng độ từ 9.83E+01 IU/mL đến 9.83E+05 IU/mL.

Bảng 17 Độ chụm - trong phòng xét nghiệm của **cobas**® BKV*

Nồng độ làm tròn [IU/mL]	Nồng độ được chỉ định [IU/mL]	Mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA			
		Lô 1	Lô 2	Lô 3	Tất cả các lô
		SD	SD	SD	SD gộp
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

* Dữ liệu của nồng độ được coi là phân phối chuẩn log và được phân tích sau khi chuyển đổi từ nồng độ sang log_{10}. Các cột độ lệch chuẩn (SD) thể hiện tổng nồng độ được chuyển đổi sang log cho từng lô trong số ba lô thuốc thử.

Thẩm định các kiểu gen

Hiệu năng của xét nghiệm **cobas**® BKV trên BKV Kiểu gen I (với phân nhóm Ia và Ic), II, III và IV được đánh giá bởi:

- Xác nhận lại giới hạn phát hiện
- Xác nhận lại khoảng tuyến tính

Xác nhận lại giới hạn phát hiện cho Kiểu gen I (với phân nhóm Ia và Ic), II, III và IV

BKV DNA được chia ra làm năm Kiểu gen/phân nhóm khác nhau (Ia, Ic, II, III và IV) được pha loãng thành ba mức nồng độ khác nhau trong huyết tương chống đông bằng EDTA âm tính với BKV. Việc xác định tỷ lệ đạt được thực hiện với 63 lần lặp lại cho mỗi mức nồng độ. Thử nghiệm được tiến hành với ba lô thuốc thử **cobas**® BKV, nhiều lần chạy, nhiều ngày, nhiều người vận hành và các thiết bị khác nhau. Những kết quả này xác minh rằng **cobas**® BKV đã phát hiện BKV DNA cho năm Kiểu gen/phân nhóm khác nhau ở nồng độ 21.5 IU/mL với tỷ lệ đạt ≥ 95%.

Xác nhận lại khoảng tuyến tính cho Kiểu gen I (với phân nhóm Ia và Ic), II, III và IV

Các chuỗi pha loãng được sử dụng trong nghiên cứu xác nhận lại khoảng tuyến tính của Kiểu gen/phân nhóm của **cobas**® BKV bao gồm bộ 8 mẫu bao phủ toàn bộ khoảng tuyến tính của xét nghiệm. Thử nghiệm được tiến hành với ba lô thuốc thử **cobas**® BKV, 12 lần lặp lại cho mỗi mức nồng độ đã được kiểm tra trong huyết tương chống đông bằng EDTA.

Khoảng tuyến tính của **cobas**® BKV đã được xác nhận lại cho tất cả năm Kiểu gen/phân nhóm (Ia, Ic, II, III và IV).

Độ đặc hiệu

Tính đặc hiệu của **cobas**® BKV được xác định bằng cách phân tích các mẫu huyết tương chống đông EDTA âm tính với BKV từ từng người hiến tặng. 104 mẫu đơn huyết tương chống đông EDTA đã được thử nghiệm với ba lô thuốc thử **cobas**® BKV. Tất cả các mẫu xét nghiệm đều âm tính với BKV DNA. Trong dàn mẫu xác nhận độ đặc hiệu của **cobas**® BKV là 100% (khoảng tin cậy 95% một phía thấp hơn: 97.16%).

Độ đặc hiệu phân tích

Độ đặc hiệu phân tích của **cobas**® BKV được đánh giá bằng cách thử nghiệm một bộ mẫu chứa các nhóm vi sinh vật ở nồng độ 1.00E+06 đơn vị/mL (CFU/mL, tế bào/mL, CCU/mL, IFU/mL) đối với vi khuẩn và nấm men và trong khoảng 1.00 E+05 đơn vị/mL và 1.00E+06 đơn vị/mL (bản sao/mL, $TCID_{50}$ /mL, IU/mL, tế bào/mL) đối với vi rút. Các vi sinh vật được pha loãng vào huyết tương EDTA của người âm tính với DNA BKV cũng như huyết tương chống đông EDTA của người chứa (100 IU/mL) DNA BKV. Các sinh vật cụ thể được thử nghiệm được liệt kê trong Bảng 18. Mỗi mẫu được thử nghiệm lặp lại ba lần. Không có tác nhân không phải BKV nào ảnh hưởng đến hiệu năng của xét nghiệm ở các nồng độ được thử nghiệm. Kết quả âm tính thu được với **cobas**® BKV cho tất cả các mẫu vi sinh vật không chứa BKV và kết quả dương tính thu được đối với tất cả các mẫu vi sinh vật có chứa BKV. Hơn nữa, nồng độ trung bình $\log_{10}$ của mỗi mẫu BKV dương tính chứa các sinh vật có khả năng gây phản ứng chéo nằm trong khoảng ± 0.5 $\log_{10}$ của nồng độ trung bình $\log_{10}$ của mẫu chứng dương tính nhân tạo tương ứng.

Bảng 18 Các vi sinh vật được kiểm tra phản ứng chéo

Vi rút	**Vi khuẩn**	**Nấm men**
Adenovirus Type 5	*Propionibacterium acnes*	*Aspergillus niger*
Cytomegalovirus	*Staphylococcus aureus*	*Candida albicans*
Epstein-Barr Virus	*Chlamydia trachomatis*	*Cryptococcus neoformans*
Hepatitis B Virus	*Clostridium perfringens*	-
Hepatitis C Virus	*Enterococcus faecalis*	-
Herpes Simplex Virus Type1	*Escherichia coli*	-
Herpes Simplex Virus Type 2	*Klebsiella pneumoniae*	-
Human Herpes Virus Type 6	*Listeria monocytogenes*	-
Human Herpes Virus Type 7	*Mycobacterium avium*	-
Human Herpes Virus Type 8	*Neisseria gonorrhoeae*	-
Human Immunodeficiency Virus-1	*Staphylococcus epidermidis*	-
Human Immunodeficiency Virus-2	*Streptococcus pyogenes*	-
Human Papillomavirus	*Mycoplasma pneumoniae*	-
JC virus	*Salmonella enterica*	-
Parvovirus B19	*Streptococcus pneumoniae*	-
Simian Virus 40	-	-
Varicella-Zoster Virus	-	-

Độ đặc hiệu phân tích – chất gây nhiễu

Nồng độ cao triglyceride (33 g/L), bilirubin liên hợp (0.2 g/L), bilirubin không liên hợp (0.2 g/L), albumin (60 g/L), hemoglobin (2 g/L) và DNA của người (2 mg/L) trong mẫu đã được kiểm tra đối với mẫu dương tính BKV (100 IU/mL) và mẫu âm tính BKV DNA. Các chất gây nhiễu nội sinh được thử nghiệm được cho thấy là không gây nhiễu lên hiệu năng của xét nghiệm **cobas**® BKV.

Ngoài ra, các hợp chất thuốc được liệt kê trong Bảng 19 đã được kiểm nghiệm 3 lần với nồng độ tối đa (max) thuốc trong mẫu có và không có BKV DNA.

Tất cả các chất có nguy cơ gây nhiễu đã được chứng minh là không ảnh hưởng đến hiệu năng của xét nghiệm. Kết quả âm tính thu được với **cobas**® BKV đối với tất cả các mẫu không có đích BKV và kết quả dương tính thu được trên tất cả các mẫu có đích BKV. Hơn nữa, nồng độ trung bình $\log_{10}$ của mỗi mẫu BKV dương tính có chứa các chất có nguy cơ gây nhiễu nằm trong khoảng ± 0.5 $\log_{10}$ so với nồng độ chuẩn trung bình $\log_{10}$ của mẫu đối chứng kiểm soát nhiễu dương tính tương ứng.

Bảng 19 Các hợp chất thuốc được kiểm tra tính gây nhiễu lên việc định lượng BKV DNA bằng **cobas**® BKV

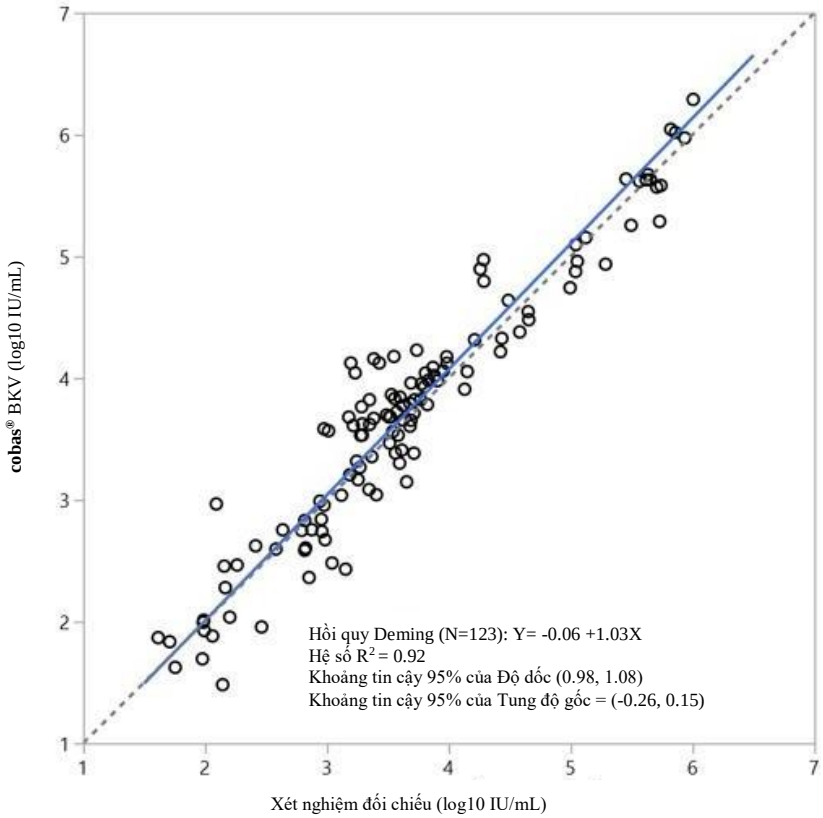
Phân loại thuốc	**Tên thuốc gốc**	
Thuốc kháng khuẩn	Cefotetan	Sulfamethoxazole
	Clavulanate kali	Ticarcillin dinatri
	Fluconazole	Trimethoprim
	Piperacillin	Vancomycin
	Tazobactam natri	Micafungin
Hợp chất điều trị Herpes Viruses	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Acyclovir	Letermovir
Thuốc ức chế miễn dịch	Azathioprine	Prednisone
	Cyclosporine	Sirolimus
	Everolimus	Tacrolimus
	Mycophenolate mofetil	Mycophenolic axit

Mối tương quan giữa các phương pháp

Hiệu năng của xét nghiệm **cobas**® BKV được đánh giá dựa trên một xét nghiệm so sánh bằng cách phân tích mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA của bệnh nhân nhiễm BKV. Mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA được định lượng bằng cả hai xét nghiệm, được xét nghiệm dưới dạng các mẫu lặp đơn lẻ. Phân tích hồi quy Deming đã được thực hiện.

Kết quả hồi quy Deming được thể hiện trong Hình 6.

Hình 6 Phân tích hồi quy của **cobas**® BKV so với xét nghiệm so sánh



Sai số hệ thống

Tỉ lệ sai số hệ thống của **cobas**® BKV được khảo sát bằng việc kiểm tra 100 lần lặp của mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA giả lập pha với mẫu lâm sàng dương tính với BKV. Các mẫu này được kiểm tra ở nồng độ 3 x LoD.

Kết quả của thử nghiệm này khẳng định rằng tất cả các lần lặp đều hợp lệ và dương tính với gen đích BKV, kết quả tỉ lệ sai số hệ thống là 0% (khoảng tin cậy 95% một phía trên là 2.95%).

Nhiễm chéo

Tỷ lệ nhiễm chéo đối với **cobas**® BKV được xác định bằng cách thử nghiệm 240 lần lặp lại mẫu nền âm tính với BKV và 225 lần lặp lại mẫu DNA BKV có nồng độ cao ở khoảng 2.00E+07 IU/mL. Tổng cộng, năm lần chạy đã được thực hiện với các mẫu dương tính và âm tính theo sơ đồ bàn cờ.

Tất cả 240 lần lặp lại của mẫu âm tính đều âm tính, dẫn đến tỷ lệ lây nhiễm chéo là 0% (khoảng tin cậy 95% một phía trên 1.24%).

Đặc tính hiệu năng trên mẫu nước tiểu được thực hiện trên hệ thống cobas® 6800/8800

Giới hạn phát hiện (LoD) theo mẫu chuẩn quốc tế WHO

Giới hạn phát hiện của **cobas**® BKV theo Mẫu chuẩn quốc tế WHO được xác định trên chuỗi pha loãng mẫu chuẩn sơ cấp WHO (1st WHO BKV International Standard) trong thư viện NIBSC (NIBSC 14/212), hòa trong mẫu nước tiểu gộp âm tính BKV ổn định trong môi trường **cobas**® PCR Media. Bộ mẫu 6 mức nồng độ cộng thêm một mẫu trắng (mẫu blank) được kiểm tra qua 3 Lô thuốc thử **cobas**® BKV, nhiều lần chạy khác nhau, trong nhiều ngày, nhiều người vận hành và các thiết bị khác nhau.

Kết quả đối với nước tiểu gộp được ổn định trong Môi trường **cobas**® PCR Media được thể hiện trong Bảng 20 đến Bảng 22. Nghiên cứu chứng minh rằng với lô ít nhạy cảm nhất, nồng độ mà PROBIT dự kiến tỷ lệ đạt 95% là 12.2 IU/mL với khoảng tin cậy 95% là từ 9.2 – 18.3 IU/mL trong nước tiểu nguyên bản. Nồng độ thấp nhất với tỷ lệ đạt ≥ 95% là 10.0 IU/mL trong nước tiểu nguyên bản.

Bảng 20 Giới hạn phát hiện trong mẫu nước tiểu, Lô 1

Nồng độ đầu vào (BKV DNA IU/mL)*	Số lần lặp lại hợp lệ	Số lượng kết quả dương tính	Tỷ lệ đạt theo %
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 bởi PROBIT với tỷ lệ đạt 95%	12.2 IU/mL Khoảng tin cậy 95%: 9.2 – 18.3 IU/mL		

* Mẫu nước tiểu được khảo sát là mẫu ổn định trong môi trường **cobas**® PCR Media. Nồng độ đầu vào được sử dụng để tính toán dựa trên mẫu nước tiểu nguyên bản.

Bảng 21 Giới hạn phát hiện trong mẫu nước tiểu, Lô 2

Nồng độ đầu vào (BKV DNA IU/mL)*	Số lần lặp lại hợp lệ	Số lượng kết quả dương tính	Tỷ lệ đạt theo %
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 bởi PROBIT với tỷ lệ đạt 95%	11.9 IU/mL Khoảng tin cậy 95%: 9.2 – 17.3 IU/mL		

* Mẫu nước tiểu được khảo sát là mẫu ổn định trong môi trường **cobas**® PCR Media. Nồng độ đầu vào được sử dụng để tính toán dựa trên mẫu nước tiểu nguyên bản.

Bảng 22 Giới hạn phát hiện trong mẫu nước tiểu, Lô 3

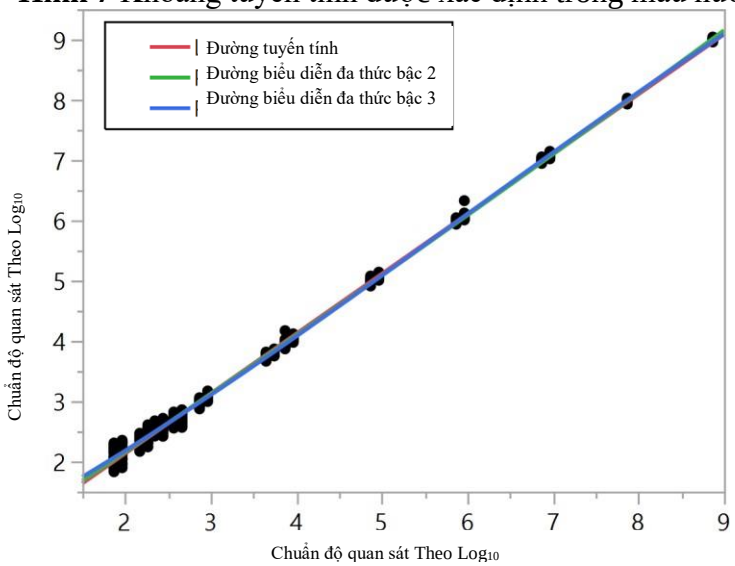
Nồng độ đầu vào (BKV DNA IU/mL)*	Số lần lặp lại hợp lệ	Số lượng kết quả dương tính	Tỷ lệ đạt theo %
40.0	63	63	100.0
20.0	63	63	100.0
10.0	63	61	96.8
5.0	63	46	73.0
2.5	63	39	61.9
1.25	63	19	30.2
0	63	0	0.0
LoD bởi PROBIT với tỷ lệ đạt 95%	10.1 IU/mL Khoảng tin cậy 95%: 7.8 – 14.7 IU/mL		

* Mẫu nước tiểu được khảo sát là mẫu ổn định trong môi trường **cobas**® PCR Media. Nồng độ đầu vào được sử dụng để tính toàn dựa trên mẫu nước tiểu nguyên bản.

Khoảng tuyến tính

Khoảng tuyến tính của **cobas**® BKV được đánh giá bằng cách sử dụng một chuỗi pha loãng bao gồm bộ 10 mẫu sử dụng một mẫu lâm sàng (phân nhóm BKV Ib) bao phủ toàn bộ khoảng tuyến tính của xét nghiệm. Mẫu gốc DNA lambda nồng độ cao đã được sử dụng để chuẩn bị cho bộ 12 mẫu bao trùm toàn bộ khoảng tuyến tính.
Mỗi mẫu trong dàn mẫu được thử nghiệm 36 lần lặp lại trên ba lô thuốc thử **cobas**® BKV và kết quả của nghiên cứu được trình bày trong Hình 7.
cobas® BKV đã được chứng minh là tuyến tính từ nồng độ 7.41E+01 IU/mL đến 7.41E+08 IU/mL và cho thấy độ lệch tuyệt đối so với hồi quy phi tuyến tính phù hợp hơn nhỏ hơn hoặc bằng ± 0.1 $\log_{10}$ trong nước tiểu gộp ổn định trong Môi trường **cobas**® PCR Media (xem Hình 7). Trên khoảng tuyến tính, Độ chính xác của phép thử nằm trong khoảng ± 0.2 $\log_{10}$.

Hình 7 Khoảng tuyến tính được xác định trong mẫu nước tiểu



Độ chụm – trong phòng xét nghiệm

Độ chụm của **cobas®** BKV được xác định bằng cách phân tích các chuỗi pha loãng nối tiếp của DNA BKV nồng độ cao (phân nhóm Ib) trong nước tiểu gộp âm tính với BKV được ổn định trong Môi trường **cobas®** PCR Media. Năm mức pha loãng đã được thử nghiệm trong 72 lần lặp lại cho mỗi mức trên ba lô thuốc thử **cobas®** BKV bằng cách sử dụng hai thiết bị và hai người vận hành trong 12 ngày. Mỗi mẫu được thực hiện theo toàn bộ quy trình **cobas®** BKV trên Hệ thống **cobas®** 6800/8800 hoàn toàn tự động. Do đó, độ chụm được báo cáo ở đây đại diện cho tất cả các khía cạnh của quy trình thử nghiệm. Kết quả được thể hiện trong Bảng 23.
cobas® BKV cho thấy độ chụm cao đối với ba lô thuốc thử được thử nghiệm trong khoảng nồng độ từ 7.41E+02 IU/mL đến 7.41E+05 IU/mL.

Bảng 23 Độ chụm - trong phòng xét nghiệm của **cobas®** BKV*

Nồng độ làm tròn [IU/mL]	Nồng độ được chỉ định [IU/mL]	Mẫu nước tiểu ổn định trong môi trường cobas® PCR Media			
		Lô 1	Lô 2	Lô 3	Tất cả các lô
		SD	SD	SD	SD gộp
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

* Dữ liệu của nồng độ được coi là phân phối chuẩn log và được phân tích sau khi chuyển đổi nồng độ sang $\log_{10}$. Các cột độ lệch chuẩn (SD) thể hiện tổng độ lệch của nồng độ được chuyển đổi log cho từng lô trong số ba lô thuốc thử.

Thẩm định các kiểu gen

Hiệu năng của **cobas**® BKV trên Kiểu gen BKV I (với các phân nhóm Ia và Ic), II, III và IV được đánh giá bởi:

- Xác nhận lại giới hạn phát hiện
- Xác nhận lại khoảng tuyến tính

Xác nhận lại Giới hạn phát hiện cho Kiểu gen I (với các phân nhóm Ia và Ic), II, III và IV

DNA của BKV chia ra thành năm Kiểu gen/phân nhóm khác nhau (Ia, Ic, II, III và IV) được pha loãng thành ba mức nồng độ khác nhau trong mẫu nước tiểu gộp âm tính với BKV được ổn định trong môi trường **cobas**® PCR Media. Việc xác định tỷ lệ đạt được thực hiện với 63 lần lặp lại cho mỗi nồng độ. Thử nghiệm được tiến hành với ba lô thuốc thử **cobas**® BKV, nhiều lần chạy, nhiều ngày, người vận hành và thiết bị khác nhau. Các kết quả này xác nhận rằng **cobas**® BKV đã phát hiện BKV DNA cho năm Kiểu gen/phân nhóm khác nhau ở nồng độ 12.2 IU/mL với tỷ lệ đạt ≥ 95%.

Xác nhận lại khoảng tuyến tính với Kiểu gen I (với các phân nhóm Ia và Ic), II, III và IV

Các chuỗi pha loãng được sử dụng trong nghiên cứu xác nhận lại khoảng tuyến tính của Kiểu gen/phân nhóm của **cobas**® BKV bao gồm bộ 8 mẫu bao trùm khoảng tuyến tính của xét nghiệm. Thử nghiệm được tiến hành với ba lô thuốc thử **cobas**® BKV, 12 lần lặp lại cho mỗi nồng độ đã được thử nghiệm trong mẫu nước tiểu được ổn định trong Môi trường **cobas**® PCR Media.

Khoảng tuyến tính của **cobas**® BKV đã được xác nhận lại cho tất cả năm Kiểu gen/phân nhóm (Ia, Ic, II, III và IV).

Độ đặc hiệu

Độ đặc hiệu của **cobas**® BKV được xác định bằng cách phân tích các mẫu đơn nước tiểu âm tính với BKV được ổn định trong Môi trường **cobas**® PCR Media từ từng người hiến tặng. Một trăm mẫu đơn nước tiểu đã được thử nghiệm với ba lô thuốc thử **cobas**® BKV. Tất cả các mẫu xét nghiệm âm tính với BKV DNA. Trong bảng thử nghiệm, độ đặc hiệu của **cobas**® BKV là 100% (khoảng tin cậy 95% một phía sau: 97.05%).

Độ đặc hiệu phân tích

Độ đặc hiệu phân tích của **cobas**® BKV được đánh giá bằng cách kiểm tra một nhóm vi sinh vật với nồng độ từ 1.00E+06 đơn vị/mL đến 2.00E+06 đơn vị/mL (CFU/mL, tế bào/mL, CCU/mL, IFU/mL) đối với vi khuẩn và nấm men và ở mức 1.00E+05 đơn vị/mL (bản sao/mL, $TCID_{50}$ /mL, IU/mL, tế bào/mL) đối với vi rút. Các vi sinh vật được pha loãng vào mẫu nước tiểu âm tính DNA BKV cũng như nước tiểu chứa (600 IU/mL) DNA BKV. Các sinh vật cụ thể được thử nghiệm được liệt kê trong Bảng 24. Mỗi mẫu được thử nghiệm lặp lại ba lần. Không có mẫu âm tính BKV nào bị ảnh hưởng tới hiệu năng của xét nghiệm ở các nồng độ được thử nghiệm. Kết quả âm tính thu được với **cobas**® BKV cho tất cả các mẫu vi sinh vật không có chứa BKV và kết quả dương tính thu được đối với tất cả các mẫu vi sinh vật có chứa BKV. Hơn nữa, nồng độ trung bình log_{10} của từng mẫu BKV dương tính chứa các sinh vật có nguy cơ gây phản ứng chéo nằm trong khoảng ± 0.5 log_{10} so với nồng độ trung bình log_{10} của mẫu kiểm soát dương tính nhân tạo tương ứng.

Bảng 24 Các vi sinh vật được kiểm tra phản ứng chéo

Vi rút	Vi khuẩn	Vi khuẩn	Nấm men
Herpes Simplex Virus-2	*Bacillus cereus*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Candida albicans*
Human Papillomavirus 16	*Bacillus subtilis*	*Staphylococcus aureus*	*Candida glabrata*
-	*Neisseria gonorrhoeae*	*Staphylococcus saphrophyticus*	*Candida parapsilosis*
-	*Corynebacterium diphteriae*	*Streptococcus agalactiae*	*Candida tropicalis*
-	*Escherichia coli*	*Streptococcus bovis*	-
-	*Enterobacter cloacae*	*Streptococcus pneumoniae*	-
-	*Enterococcus faecalis*	*Streptococcus oralis/viridans*	-
-	*Enterococcus faecium*	*Proteus mirabilis*	-
-	*Klebsiella pneumoniae*	*Staphylococcus epidermidis*	-
-	*Lactobacillus axitophilus*	*Ureaplasma urealyticum*	-
-	*Treponema pallidum*	*Mycoplasma genitalium*	-
-	*Lactobacillus crispatus*	-	-
-	*Trichomonas vaginalis*	-	-
-	*Chlamydia trachomatis*	-	-
-	*Lactobacillus jensenii*	-	-
-	*Lactobacillus vaginalis*	-	-
-	*Morganella morganii*	-	-

Độ đặc hiệu phân tích - chất gây nhiễu

Nồng độ cao của albumin (0.5% kl/tt), bilirubin liên hợp (1% kl/tt) , glucose (1% kl/tt), tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi (1.00E+06 tế bào/mL), chất nhầy (có trong 1 tăm bông chứa chất nhầy hòa tan trong 4.3mL mẫu), pH axit (pH 4), pH kiềm (pH 9), tinh dịch (1 que tăm bông nhúng vào tinh dịch trong 4.3mL mẫu), natri (300 mEq/L) và máu tổng số (10% v/v) có trong mẫu thử nghiệm dương tính BKV DNA (600 IU/mL) và mẫu âm tính BKV DNA. Các chất gây nhiễu nội sinh trong khảo sát đã được chứng minh là không gây nhiễu lên hiệu năng của xét nghiệm **cobas**® BKV.

Ngoài ra, các hợp chất thuốc được liệt kê trong Bảng 25 đã được kiểm nghiệm với mẫu có và không có BKV DNA.

Tất cả các chất có nguy cơ gây nhiễu đã được chứng minh là không ảnh hưởng đến hiệu năng của xét nghiệm ngoại trừ bột talc. Bột talc ở nồng độ ≤ 0.05% thì không ảnh hưởng đến xét nghiệm **cobas**® BKV. Kết quả âm tính thu được với **cobas**® BKV đối với tất cả các mẫu không chứa BKV và kết quả dương tính thu được trên tất cả các mẫu có chứa BKV. Hơn nữa, nồng độ trung bình $\log_{10}$ của mỗi mẫu BKV dương tính có chứa các chất có nguy cơ gây nhiễu nằm trong khoảng ± 0.5 $\log_{10}$ so với nồng độ chuẩn trung bình $\log_{10}$ của mẫu đối chứng kiểm soát nhiễu dương tính tương ứng.

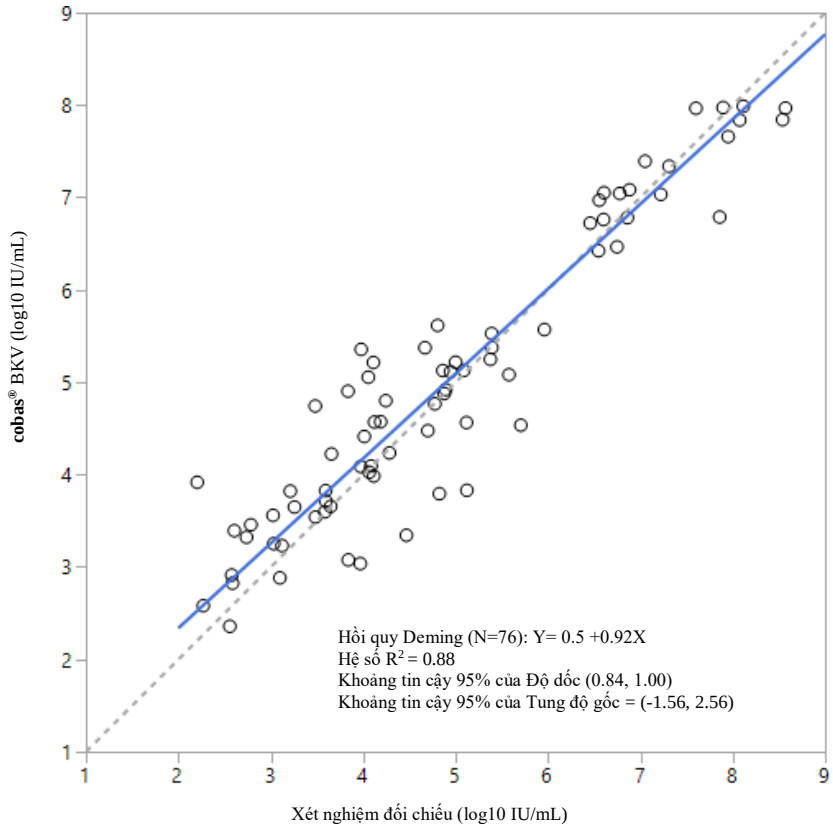
Bảng 25 Các hợp chất thuốc được khảo sát mức độ ảnh hưởng đến định lượng BKV DNA bằng xét nghiệm **cobas**® BKV

Phân loại thuốc	**Thành phần biệt dược**	**Nồng độ**	**Tên thuốc chính**
Kháng sinh	Clotrimazole	100 µg/mL	Gyne-Lotrimin 7
	Metronidazole	701 µmol/L	Arilin rapid Vaginal suppositories Vagi Metro Cream Nidazea Gel
Estrogen steroid hormone	Estradiol	4.41 nmol/L	Estrace
Thuốc giảm đau	Phenazopyridine Hydrochloride	200 µg/mL	Azo Standard
	Acetaminophen	1324 µmol/L	Acetaminophen
Chất bôi trơn	Propylene Glycol	1000 µg/mL	K-Y UltraGel
Thuốc kháng viêm không steroid	Acetylsalicylic Axit	3.62 mmol/L	Acetylsalicylic Axit
	Naproxen	2170 µmol/L	Naproxen
	Ibuprofen	2425 µmol/L	Ibuprofen
Không áp dụng	Talc	0.05% (kl/tt)	Bột talc

Mối tương quan giữa các phương pháp

Hiệu năng của **cobas**® BKV được đánh giá dựa trên xét nghiệm so sánh bằng cách phân tích mẫu nước tiểu của bệnh nhân nhiễm BKV. Các mẫu nước tiểu nằm trong khoảng định lượng của cả hai xét nghiệm, được xét nghiệm dưới dạng các mẫu lặp lại đơn lẻ. Phân tích hồi quy Deming đã được thực hiện.
Kết quả hồi quy Deming được thể hiện trong Hình 8.

Hình 8 Phân tích hồi quy của **cobas**® BKV so với xét nghiệm so sánh



Nhiễm chéo

Tỷ lệ nhiễm chéo đối với **cobas**® BKV được xác định bằng cách thử nghiệm 240 lần lặp lại mẫu nền âm tính với BKV và 225 lần lặp lại mẫu DNA BKV có nồng độ cao ở khoảng 1.00E+09 IU/mL. Tổng cộng, năm lần chạy đã được thực hiện với các mẫu dương tính và âm tính theo sơ đồ bàn cờ.
Tất cả 240 lần lặp lại của mẫu âm tính đều âm tính, dẫn đến tỷ lệ nhiễm chéo là 0.0% (khoảng tin cậy 95% một phía trên 1.24%).

Đánh giá hiệu năng lâm sàng được thực hiện trên hệ thống cobas® 6800/8800

Độ tái lặp của xét nghiệm cobas® BKV trên mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA

Độ tái lặp của **cobas**® BKV được đánh giá qua các yếu tố (lô thuốc thử, địa điểm thử nghiệm, mẻ chạy và ngày thử nghiệm) có thể ảnh hưởng đến kết quả được báo cáo trong thử nghiệm lâm sàng thường quy. Việc đánh giá được tiến hành tại 3 địa điểm xét nghiệm, sử dụng 3 lô thuốc thử, một bộ mẫu dương tính và mẫu âm tính với tổng số 270 xét nghiệm trên mỗi nồng độ (không bao gồm mẫu chứng). Dàn mẫu này được làm từ mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA, mẫu này có kết quả âm tính BKV VCA IgG và được kiểm tra bởi quy trình xét nghiệm NAT BKV với mẫu huyết tương, và phối trộn thêm Mẫu chuẩn QUốc tế BKV của WHO, hoặc mẫu DNA từ vi rút nuôi cấy BKV genotype Ib (là genotype phổ biến nhất). Hai nhân viên vận hành tại mỗi địa điểm đã thử nghiệm từng lô thuốc thử trong 5 ngày. Hai lần chạy (1 lần chạy = 1 mẻ; 1 mẻ = 1 dàn mẫu + 3 mẫu chứng) được thực hiện mỗi ngày và 3 lần lặp lại của mỗi mẫu trong dàn mẫu được thực hiện cho mỗi lần chạy. Đánh giá kết quả được tổng kết trong Bảng 26.

Bảng 26 Tỷ lệ phần trăm có thể quy cho của tổng phương sai (%TV), Độ lệch chuẩn của độ chụm tổng số (SD) và CV(%) log làm tròn của từng nồng độ DNA BKV (log 10 IU/mL) theo bộ mẫu dương tính

Nồng độ BKV DNA Mong đợi (log_{10} IU/mL)	Nồng độ trung bình[a] BKV DNA Quan sát (log_{10} IU/mL)	Số lượt xét nghiệm[b]	Lô %TV[c] (CV%)[d]	Địa điểm %TV[c] (CV%)[d]	Ngày/ người vận hành %TV[c] (CV%)[d]	Mẻ chạy %TV[c] (CV%)[d]	Trong một mẻ chạy %TV[c] (CV%)[d]	Độ chụm tổng số SD[e]	Độ chụm tổng số Độ chụm tổng số Log làm tròn CV(%)[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] Được tính bằng quy trình SAS MIXED.
[b] Số lượng xét nghiệm hợp lệ với mức DNA có thể phát hiện được.
[c] %TV = Phần trăm đóng góp vào Tổng phương sai.
[d] CV% = log chuẩn phần trăm hệ số biến thiên = sqrt (10^[SD^2 * ln(10)] - 1) * 100
[e] Được tính bằng tổng độ biến thiên từ quy trình SAS MIXED
Lưu ý: Được tính bằng tổng độ biến thiên từ quy trình SAS MIXED
Lưu ý: Bảng chỉ bao gồm các kết quả với mức DNA có thể phát hiện được. SD = độ lệch chuẩn. CV = hệ số biến thiên; và BKV = Vi rút BK

cobas® BKV cho thấy mức độ tái lặp lâm sàng có thể chấp nhận được ở các nồng độ trong khoảng tuyến tính. Ngoài ra, hệ thống đã phát hiện 100% các mẫu có nồng độ tương đương 3 x LLoQ. Hệ thống **cobas**® 6800 và **cobas**® 8800 có chung thiết kế kiểu mô-đun và chúng cho thấy sự tương đương khi sử dụng **cobas**® BKV. Tất cả các giới hạn tin cậy (CL) ước tính 95% cho sự khác biệt giữa 2 lần xét nghiệm từ cùng một đối tượng nằm trong khoảng ± 0.84 log_{10} IU/mL, cho thấy rằng xét nghiệm có thể đánh giá những thay đổi về mức BKV DNA được cho là có ý nghĩa lâm sàng.

Trong số 270 thử nghiệm hợp lệ đối với các mẫu trong bộ mẫu âm tính được thực hiện trên hệ thống **cobas®** 6800/8800, tất cả các mẫu đều cho kết quả "Không phát hiện mục tiêu", do đó tỷ lệ phần trăm âm tính (NPA) là 100% với CI chính xác 95% là từ 98.6 % đến 100%.

Hiệu năng của xét nghiệm cobas® BKV trên mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA

Hiệu suất lâm sàng của **cobas®** BKV được đánh giá thêm tại ba địa điểm thử nghiệm bằng cách đo nồng độ BKV DNA trong các mẫu lâm sàng (không pha loãng và pha loãng) của bệnh nhân nhiễm và không nhiễm BKV và các mẫu huyết tương EDTA giả có bổ sung vi rút BKV nuôi cấy, so sánh với một xét nghiệm axit nucleic do phòng xét nghiệm tự phát triển (LDT) (so sánh BKV LDT). Từ tất cả các mẫu được xét nghiệm bằng **cobas®** BKV và xét nghiệm BKV so sánh, có tổng cộng 550 mẫu (217 mẫu không pha loãng và 303 mẫu lâm sàng pha loãng từ 129 bệnh nhân ghép tạng và 30 mẫu nhân tạo) hợp lệ trên cả hai xét nghiệm và có thể đánh giá được sự phù hợp về mặt lâm sàng phân tích (Bảng 27).

Bảng 27 Phân tích sự tương đồng giữa **cobas ®** BKV và xét nghiệm LDT về kết quả nồng độ BKV DNA cho tất cả các mẫu

cobas® BKV (log_{10} IU/mL)	**Xét nghiệm so sánh BKV LDT (log_{10} IU/mL) Target Not Detected**	**Xét nghiệm so sánh BKV LDT (log_{10} IU/mL) <LLoQ (< 2.3)**	**Xét nghiệm so sánh BKV LDT (log_{10} IU/mL) 2.3 đến < 3.0**	**Xét nghiệm so sánh BKV LDT (log_{10} IU/mL) 3.0 đến < 3.7**	**Xét nghiệm so sánh BKV LDT (log_{10} IU/mL) 3.7 đến 4.4**	**Xét nghiệm so sánh BKV LDT (log_{10} IU/mL) > 4.4**	**Tổng**
Target Not Detected	107	7	5	0	0	0	119
< LLoQ (< 2.3)	23	51	39	0	0	0	113
2.3 đến < 3.0	0	3	40	62	1	0	106
3.0 đến < 3.7	0	0	1	71	42	0	114
3.7 đến 4.4	0	0	0	0	26	26	52
> 4.4	0	0	0	0	1	45	46
Tổng cộng	130	61	85	133	70	71	550
Tỉ lệ cột đồng thuận (%)	(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% Score CI)a	(97.1%, 100%)	(94.1%, 100.0%)	(87.0%, 97.5%)	(97.2%, 100.0%)	(92.3%, 99.7%)	(94.9%, 100.0%)	-

Lưu ý: CI = Khoảng tin cậy; LLoQ = giới hạn định lượng dưới của xét nghiệm so sánh BKV LDT (200 IU/mL) = 2.3 log_{10} IU/mL). Độ lệch chuẩn của xét nghiệm so sánh BKV LDT ước chừng 0.37 log_{10} IU/mL (từ nghiên cứu phân tích độ chính xác BKV LDT của đại học Indiana). Nồng độ chất phân tích là khoảng 3.0 log_{10} IU/mL đại diện mức LLoQ + 2σ, 3.7 log_{10} IU/mL đại diện LLoQ + 4σ và 4.4 log_{10} IU/mLđại diện cho LLoQ + 6σvới khoảng tin cậy là 2σ. Các cặp mẫu được ghép đối có thể đánh giá để phân tích sự phù hợp lâm sàng được đưa vào bảng này.

[a] Giả sử rằng tất cả các mẫu độc lập với nhau.

Các kết quả không phù hợp được định nghĩa là những kết quả nằm cách xa đường chéo hơn một ô (được biểu thị bằng cách tô bóng). Đối với kết quả Target not detected (TND) của xét nghiệm LDT cột đồng thuận và kết quả **cobas ®** BKV Target not detected và ô < LLoQ (< 2.3) đã được gộp chung. Lý do căn bản để thêm các ô <LLoQ và TND liền kề cho cột TND là sự khác biệt giữa TND và <LLoQ không có ý nghĩa lâm sàng và chúng được phân tích ở đầu dưới của khoảng đo, có thể bị ảnh hưởng bởi lỗi ngẫu nhiên.

Trong số 43 mẫu âm tính với DNA của BKV được thu thập để ước tính NPA bằng **cobas**® BKV, tất cả 43 mẫu đều âm tính với **cobas**® BKV, do đó NPA là 100% với Khoảng tin cậy chính xác 95% từ 91,8% đến 100%.
Sự phù hợp giữa **cobas**® BKV và BKV LDT so sánh cũng được đánh giá bằng cách sử dụng các ngưỡng lâm sàng khác nhau (Bảng 28).

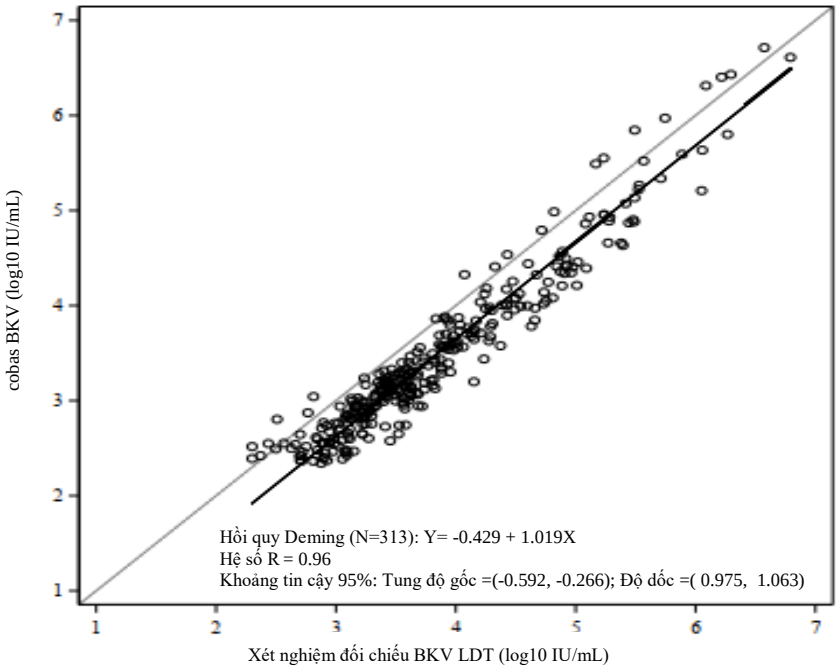
Bảng 28 Tóm tắt sự tương đồng của **cobas**® BKV và xét nghiệm so sánh BKV LDT sử dụng các ngưỡng khác nhau cho tất cả các mẫu

Các ngưỡng*	**Phần trăm đồng thuận < ngưỡng** với độ tin cậy 95% CI (n/N)	**Phần trăm đồng thuận ≥ngưỡng** với độ tin cậy 95% CI (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} IU/mL)	98.4% (188/191) (95.5%, 99.5%)	87.7% (315/359) (83.9%, 90.7%)
3.0 Log_{10} IU/mL	99.6% (275/276) (98.0%, 99.9%)	77.0% (211/274) (71.7%, 81.6%)
4.0 Log_{10} IU/mL	100.0% (447/447) (99.1%, 100.0%)	67.0% (69/103) (57.4%, 75.3%)

Lưu ý: Các mẫu có kết quả Không phát hiện mục tiêu được phân loại là < giá trị ngưỡng với đơn vị IU/mL. LLoQ = giới hạn định lượng dưới của xét nghiệm BKV LDT
(200 IU/mL = 2.3 log_{10} IU/mL) với độ tin cậy 95% (CI) được tính toán bởi phương pháp Score giả định tất cả các mẫu là độc lập với nhau.
* Ngưỡng của 1000 IU/ml = 3.0 log_{10} IU/ml và 10000 IU/ml = 4.0 log_{10} IU/mL.

Từ tất cả các mẫu được xét nghiệm bằng **cobas**® BKV dương tính với BKV bằng xét nghiệm BKV so sánh, có tổng cộng 313 (133 mẫu không pha loãng và 159 mẫu lâm sàng pha loãng từ 68 bệnh nhân ghép tạng và 21 mẫu giả lập), có thể đánh giá được để phân tích tương quan tại ba địa điểm thử nghiệm (Hình 9).

Hình 9 Mối tương quan giữa **cobas**® BKV và xét nghiệm so sánh BKV LDT cho tất cả các mẫu: Biểu đồ hồi quy tuyến tính Deming của các mức nồng độ DNA BKV (log_{10} IU/mL)



Phân tích biểu đồ sai lệch bổ sung về sự khác biệt nồng độ DNA cho thấy sự khác biệt có hệ thống giữa cả hai xét nghiệm là không đổi trên khoảng tuyến tính chồng lấp. Khoảng tin cậy 95% của điểm giao trên đường biểu diễn đồ thị trong các biểu đồ sai lệch là (-0.404 đến -0.168), nằm trong khoảng ±0.74 log 10 IU/mL (± 2 lần độ lệch chuẩn Độ chụm phân tích của BKV LDT so sánh). Hơn nữa, độ lệch trung bình được ước tính là -0.357 log_{10} IU/mL và sử dụng phương trình của đường đồ thị trong biểu đồ độ chệch, sự khác biệt có hệ thống giữa cả hai xét nghiệm là -0.343 log_{10} IU/mL và -0.362 log_{10} IU/mL đối với các mẫu có nồng độ DNA lần lượt là 3 và 4 log_{10} IU/mL.

Độ tái lặp của xét nghiệm cobas® BKV trên mẫu nước tiểu ổn định

Độ tái lặp của **cobas**® BKV được đánh giá qua các yếu tố (lô thuốc thử, địa điểm thử nghiệm, lô và ngày thử nghiệm) có thể ảnh hưởng đến kết quả được báo cáo trong thử nghiệm lâm sàng thông thường. Việc đánh giá được tiến hành tại 3 điểm xét nghiệm, sử dụng 3 lô thuốc thử, của một bộ mẫu dương tính và âm tính với tổng số 270 xét nghiệm trên mỗi nồng độ (không bao gồm mẫu chứng). Các dàn mẫu được làm từ nước tiểu ổn định với môi trường **cobas**® PCR Media đã được xác nhận âm tính với BKV DNA bằng cách sử dụng quy trình xét nghiệm axit nucleic trong nước tiểu (NAT) và mẫu giả lập được phối trộn thêm Mẫu chuẩn Quốc tế BKV của WHO, hoặc DNA vi rút BKV nuôi cấy kiểu gen Ia. Hai nhân viên vận hành tại mỗi địa điểm đã thử nghiệm từng lô thuốc thử trong 5 ngày. Hai lần chạy (1 lần chạy = 1 mẻ chạy; 1 mẻ chạy = 1 bộ mẫu + 3 mẫu chứng) được thực hiện mỗi ngày và 3 lần lặp lại của mỗi bộ mẫu được thực hiện cho mỗi lần chạy. Các kết quả đánh giá được tóm tắt trong Bảng 29.

Bảng 29 Phần trăm có thể quy cho của tổng phương sai (%TV), Độ lệch chuẩn của độ chụm tổng số (SD) và CV(%) tính theo log làm tròn của nồng độ DNA (log_{10} IU/mL) theo từng mẫu trong dàn mẫu dương tính (nước tiểu ổn định)

Nồng độ BKV DNA Mong đợi	Nồng độ trung bình[a] BKV DNA Quan sát	Số lượng xét nghiệm [b]	Lô %TV[c] (CV%)[d]	Địa điểm %TV[c] (CV%)[d]	Ngày/ Người chạy %TV[c] (CV%)[d]	Mẻ chạy %TV[c] (CV%)[d]	Trong cùng mẻ chạy %TV[c] (CV%)[d]	Độ chụm tổng số SD[e]	CV(%)[d] của độ chụm tổng số
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

Lưu ý: Bảng chỉ bao gồm các kết quả với mức nồng độ DNA có thể phát hiện được. SD = độ lệch chuẩn; CV = phần trăm hệ số biến thiên; BKV = Vi rút BK.

[a] Được tính bằng quy trình SAS MIXED.

[b] Số lượng xét nghiệm hợp lệ với mức DNA có thể phát hiện được.

[c] %TV = Phần trăm đóng góp vào Tổng phương sai.

[d] CV% = Log bình thường của Hệ số phần trăm biến thiên = sqrt (10^[SD^2 * ln(10)] - 1) * 100.

[e] Được tính bằng tổng độ biến thiên từ quy trình SAS MIXED.

Xét nghiệm **cobas**® BKV cho thấy độ tái lặp lâm sàng có thể chấp nhận được ở các nồng độ trong khoảng tuyến tính. Ngoài ra, hệ thống đã phát hiện 100% các mẫu có nồng độ 3 x LLoQ. Hệ thống **cobas**® 6800 và **cobas**® 8800 có chung thiết kế kiểu mô-đun và chúng cho thấy sự tương đương khi sử dụng **cobas**® BKV. Tất cả các giới hạn tin cậy (CL) ước tính 95% cho sự khác biệt giữa 2 lần xét nghiệm từ cùng một đối tượng nằm trong khoảng ± 0.20 log_{10} IU/mL, cho thấy rằng xét nghiệm có thể đánh giá những thay đổi về nồng độ BKV DNA được cho là có ý nghĩa lâm sàng. Hệ thống cho thấy tỷ lệ phần trăm đồng thuận âm là 99.26% với khoảng tin cậy từ 97.3% đến 99.9%. Trong số 270 xét nghiệm hợp lệ cho các mẫu trong dàn mẫu âm tính, 2 mẫu (0.74%) cho thấy mức nồng độ DNA < LLoQ dương tính. Điều tra sâu hơn về những kết quả này cho thấy rằng chúng không liên quan đến một thiết bị/địa điểm hoặc lô thuốc thử cụ thể. Phương pháp giải trình tự DNA bổ sung đã xác nhận sự hiện diện của BKV. Các trình tự BKV được xác định khác với các trình tự của mẫu chứng dương tính và chủng BKV được sử dụng để chuẩn bị dàn mẫu, loại trừ sự nhiễm chéo trong quá trình chuẩn bị dàn mẫu và gợi ý dấu vết vi rút niệu ở một trong 25 mẫu nước tiểu của mẫu nước tiểu gộp được sử dụng để chuẩn bị bộ mẫu âm tính.

Hiệu năng của xét nghiệm cobas® BKV trên mẫu nước tiểu ổn định

Hiệu năng lâm sàng của **cobas**® BKV được đánh giá thêm tại ba địa điểm thử nghiệm bằng cách đo nồng độ BKV DNA trong các mẫu nước tiểu lâm sàng của bệnh nhân nhiễm và không nhiễm BKV được ổn định trong Môi trường **cobas**® PCR Media, so với một xét nghiệm phòng xét nghiệm tự phát triển LDT đã thiết lập tốt trước đó (xét nghiệm BKV LDT so sánh). Từ tất cả các mẫu được xét nghiệm bằng **cobas**® BKV và xét nghiệm BKV so sánh, có tổng cộng 308 mẫu nước tiểu nguyên bản được ổn định trong Môi trường **cobas**® PCR Media từ 84 bệnh nhân ghép tạng hợp lệ trên cả hai xét nghiệm và có thể đánh giá để phân tích sự tương đồng lâm sàng (Bảng 30).

Bảng 30 Kết quả phân tích sự tương đồng giữa **cobas®** BKV và xét nghiệm LDT so sánh ở mức nồng độ BKV DNA (log_{10} IU/mL cho tất cả các mẫu (mẫu nước tiểu ổn định)

cobas® BKV (log_{10} IU/mL)	**Xét nghiệm BKV LDT so sánh Target Not Detected**	**Xét nghiệm BKV LDT so sánh< LLoQ (<3.0)**	**Xét nghiệm BKV LDT so sánh 3.0 đến < 3.3**	**Xét nghiệm BKV LDT so sánh 3.3 đến < 3.6**	**Xét nghiệm BKV LDT so sánh 3.6 đến 3.9**	**Xét nghiệm BKV LDT so sánh> 3.9**	**Tổng**
Target Not Detected	62	6	0	0	0	0	68
< LLoQ (<3.0)	4	22	0	0	0	1	27
3.0 đến < 3.3	0	2	0	0	0	0	2
3.3 đến < 3.6	0	0	6	3	0	0	9
3.6 đến 3.9	0	0	2	11	10	0	23
> 3.9	0	0	0	2	8	169	179
Tổng	66	30	8	16	18	170	308
Cột đồng thuận (%)	(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% Score CI)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%)	-

Lưu ý: CI = độ tin cậy; LLoQ = Giới hạn định lượng dưới của xét nghiệm BKV LDT so sánh (1000 IU/mL = 3.0 log_{10} IU/mL); LDT = xét nghiệm do phòng thí nghiệm tự phát triển; BKV = vi rút BK.

Độ lệch chuẩn của BKV LDT so sánh ước chừng là 0.15 log_{10} IU/mL (nghiên cứu thẩm định phương pháp của xét nghiệm BKV LDTso sánh).

Nồng độ mục tiêu là 3.3 log_{10} IU/mL đại diện cho nhóm LLoQ + 2σ, 3.6 log_{10} IU/mL đại diện cho nhóm LLoQ + 4σ và 3.9 log_{10} IU/mL đại diện cho nhóm LLoQ + 6σ với khoảng tin cậy là 2σ.

Các cặp mẫu được đánh giá để phân tích sự tương đồng lâm sàng được đưa vào Bảng này.

[a]Giả sử tất cả các mẫu là độc lập với nhau.

Giải trình tự DNA trên các mẫu đại diện từ các đối tượng có kết quả luôn chênh lệch hơn 1 log_{10} IU/mL mức nồng độ DNA không cho thấy bất kỳ khác biệt trình tự nào đối với bất kỳ mồi hoặc mục tiêu thăm dò nào đối với **cobas®** BKV. Các kết quả không tương đồng được xác định là những kết quả nằm cách xa đường chéo hơn 1 ô (được biểu thị bằng bóng mờ). Đối với kết quả Target Not Detected (TND) bởi xét nghiệm LDT cột đồng thuận của xét nghiệm **cobas®** BKV Target Not Detected và ô < LLoQ (< 3.0) được gộp chung với nhau. Lý do căn bản để thêm các ô < LLoQ và TND liền kề cho cột TND là sự khác biệt giữa TND và < LLoQ không có ý nghĩa lâm sàng và các ô này được phân tích ở đầu dưới của phạm vi đo, có thể bị ảnh hưởng bởi lỗi ngẫu nhiên. Trong số 66 mẫu âm tính với DNA của BKV được thu thập để ước tính NPA với **cobas®** BKV đã cho 61 kết quả hợp lệ, tất cả 61 mẫu đều âm tính với **cobas®** BKV, do đó NPA là 100% với Khoảng tin cậy chính xác 95% là 94,1% đến 100%.

Sự tương đồng giữa **cobas®** BKV và BKV LDT so sánh cũng được đánh giá bằng cách sử dụng các ngưỡng lâm sàng khác nhau (Bảng 31).

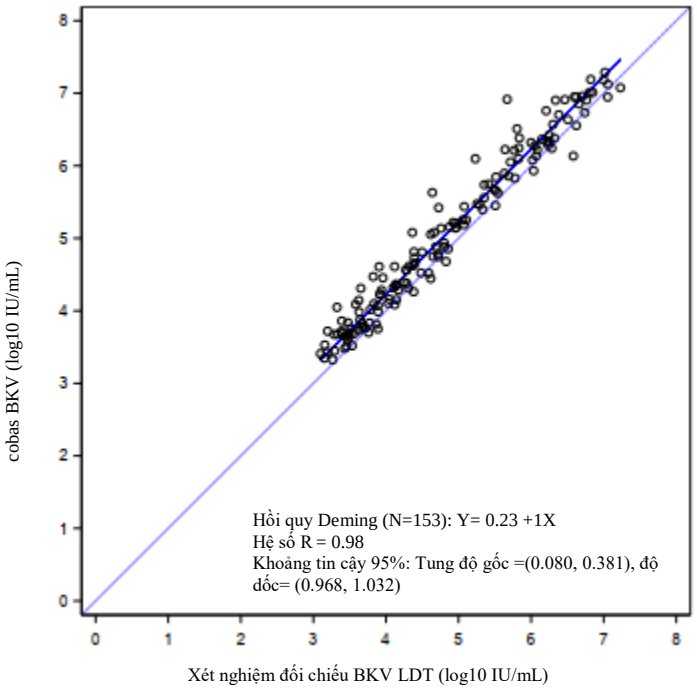
Bảng 31 Tóm tắt sự đồng thuận giữa **cobas**® BKV và xét nghiệm BKV LDT sử dụng các ngưỡng khác nhau cho tất cả các mẫu (nước tiểu ổn định)

Các ngưỡng*	**Phần trăm đồng thuận < ngưỡng với 95% CI (n/N)**	**Phần trăm đồng thuận ≥ ngưỡng với 95% CI (n/N)**
Target Not Detected	93.9% (62/66) (85.4%, 97.6%)	97.5% (236/242) (94.7%, 98.9%)
LLoQ (3.0 $\log_{10}$ IU/mL)	97.9% (94/96) (92.7%, 99.4%)	99.5% (211/212) (97.4%, 99.9%)
4.0 $\log_{10}$ IU/mL	90.9% (130/143) (85.1%, 94.6%)	99.4% (164/165) (96.6%, 99.9%)
7.0 $\log_{10}$ IU/mL	97.2% (242/249) (94.3%, 98.6%)	94.9% (56/59) (86.1%, 98.3%)

Lưu ý: các mẫu có kết quả Target Not Detected được phân loại như là mẫu < giá trị ngưỡng với đơn vị IU/mL.
LLoQ = ngưỡng định lượng dưới của xét nghiệm BKV LDT (1000 IU/mL = 3.0 $\log_{10}$ IU/mL).
Khoảng tin cậy 95% (CI) được tính toán bằng phương pháp Score giả định tất cả các mẫu độc lập với nhau.
* Ngưỡng 10000 IU/mL = 4.0 $\log_{10}$ IU/mL và 10000000 IU/mL = 7.0 $\log_{10}$ IU/mL.

Từ tất cả các mẫu được xét nghiệm bằng **cobas**® BKV dương tính với BKV bằng xét nghiệm BKV so sánh, có tổng cộng 153 mẫu nước tiểu không pha loãng được ổn định trong môi trường **cobas**® PCR Media từ 55 bệnh nhân ghép tạng có thể đánh giá để phân tích tương quan tại ba địa điểm xét nghiệm (Hình 10).

Hình 10 Mối tương quan giữa **cobas**® BKV và xét nghiệm BKV LDT cho tất cả các mẫu: Biểu đồ hồi quy tuyến tính Deming ở các mức nồng độ DNA (log_{10} IU/mL) (mẫu nước tiểu ổn định)



Phân tích biểu đồ sai lệch bổ sung về sự khác biệt ở mức tải lượng DNA cho thấy sự khác biệt có hệ thống giữa cả hai xét nghiệm là không đổi trên khoảng tuyến tính chồng. Độ tin cậy 95% của giao điểm trên đường biểu diễn đồ thị trong các biểu đồ sai lệch là (0.168 đến 0.488), nằm trong khoảng ± 0.5 log_{10} IU/mL. Hơn nữa, độ lệch trung bình được ước tính là 0.231 log_{10} IU/mL và sử dụng phương trình của đường đồ thị trong biểu đồ độ lệch, sự khác biệt có hệ thống giữa cả hai xét nghiệm là 0.248 log_{10} IU/mL và 0.188 log_{10} IU/mL đối với các mẫu có mức tải lượng DNA lần lượt là 4 log_{10} IU/mL và 7 log_{10} IU/mL.

Sự tương đương giữa các hệ thống / so sánh hệ thống

Sự tương đương giữa các hệ thống **cobas**® 5800, **cobas**® 6800 và **cobas**® 8800 được chứng minh qua các nghiên cứu hiệu năng.

Các kết quả được trình bày trong Hướng dẫn sử dụng cung cấp thông tin hiệu năng tương đương cho tất cả các hệ thống.

Thông tin bổ sung

Tính năng chính của xét nghiệm

Loại mẫu	Mẫu huyết tương chống đông bằng EDTA	Mẫu nước tiểu ổn định trong **cobas**® PCR Media
Lượng mẫu tối thiểu cần thiết	350 µL*	550 µL*
Thể tích xử lý mẫu	200 µL	400 µL
Độ nhạy phân tích	21.5 IU/mL (khoảng tin cậy 2 phía 95%: 16.3 IU/mL – 32.4 IU/mL)	12.2 IU/mL (Khoảng tin cậy hai phía 95%: 9.2 IU/mL – 18.3 IU/mL)
Khoảng tuyến tính	21.5 IU/mL đến 1E+08 IU/mL	200 IU/mL đến 1E+08 IU/mL
Độ đặc hiệu	100%	100%
Phát hiện kiểu gen	Kiểu gen BKV I (với phân nhóm Ia, Ib và Ic), II, III và IV	

*Thể tích chết là 150 µL đối với ống thứ cấp **cobas**® **omni**. Các loại ống khác sử dụng trong xét nghiệm có thể có thể tích chết nhiều hoặc ít hơn thể tích tối thiểu. Liên hệ với đại diện Roche tại địa phương để biết thêm chi tiết.

Ký hiệu

Các kí hiệu dưới đây được dùng trên nhãn sản phẩm chẩn đoán của PCR Roche.

Bảng 32 Các ký hiệu được dùng trên nhãn sản phẩm chẩn đoán PCR của Roche

Age/DOB	Tuổi hoặc ngày sinh		Thiết bị không dùng để xét nghiệm gần bệnh nhân	QS IU/PCR	Số QS IU cho mỗi phản ứng PCR, sử dụng số đơn vị chuẩn quốc tế QS International Units (IU) cho mỗi phản ứng PCR trong tính toán kết quả.
	Phần mềm phụ		Thiết bị không dùng để tự xét nghiệm		
Assigned Range [copies/mL]	Khoảng chỉ định (bản sao/mL)		Nhà phân phối *(Lưu ý: Quốc gia/khu vực có thể được chỉ định bên dưới ký hiệu)*	SN	Số seri
Assigned Range [IU/mL]	Phạm vi được chỉ định (IU/mL)		Không sử dụng lại	Site	Trung tâm
EC REP	Đại diện ủy quyền ở Cộng đồng châu Âu		Nữ	Procedure Standard	Quy trình chuẩn
BARCODE	Bảng dữ liệu mã vạch		Chỉ dùng trong đánh giá IVD	STERILE EO	Khử trùng sử dụng ethylene oxide
LOT	Số lô	GTIN	Mã thương phẩm toàn cầu		Bảo quản ở nơi tối
	Nguy cơ sinh học		Nhà nhập khẩu		Giới hạn nhiệt độ
REF	Số danh mục	IVD	Thiết bị dùng trong chẩn đoán in vitro		Tập tin thông số xét nghiệm
CE	Dấu chứng nhận tuân thủ CE: thiết bị này tuân thủ các yêu cầu hiện hành đối với ký hiệu CT cho thiết bị y tế chẩn đoán in vitro	LLR	Giới hạn dưới của khoảng chỉ định		Đặt đúng theo hướng này
			Nam	Procedure UltraSensitive	Quy trình siêu nhạy
Collect Date	Ngày thu thập		Chủ sở hữu	UDI	Mã định danh thiết bị duy nhất
	Tham khảo hướng dẫn sử dụng	CONTROL −	Vật liệu kiểm soát âm tính (Mẫu chứng âm)	ULR	Giới hạn trên của khoảng chỉ định
	Thành phần đủ cho <n> xét nghiệm		Không vô trùng	Urine Fill Line	Vạch mức nước tiểu
CONTENT	Thành phần hộp thuốc thử		Tên bệnh nhân	Rx Only	Chỉ cho Hoa Kỳ: Luật Liên Bang giới hạn thiết bị này chỉ được bán bởi hoặc dựa theo yêu cầu của bác sĩ.
CONTROL	Vật liệu kiểm soát (mẫu chứng)		Mã số bệnh nhân		Sử dụng trước ngày
	Ngày sản xuất		Tách ra ở đây		
	Thiết bị dùng để xét nghiệm gần người bệnh	CONTROL +	Vật liệu kiểm soát dương tính (Mẫu chứng dương)		
	Thiết bị dùng để tự xét nghiệm	QS copies / PCR	Số bản sao QS cho mỗi phản ứng PCR, sử dụng số bản sao QS cho mỗi phản ứng PCR trong tính toán kết quả.		

Hỗ trợ kĩ thuật

Để được hỗ trợ kỹ thuật, vui lòng liên hệ với chi nhánh tại địa phương:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Chủ sở hữu và cơ sở sản xuất

Bảng 33 Chủ sở hữu và cơ sở sản xuất

Chủ sở hữu:
Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 Mỹ
www.roche.com

Sản xuất tại Mỹ

Cơ sở sản xuất:
Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 Mỹ

Thương hiệu và sáng chế

Xem tại địa chỉ https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents

Bản quyền

©2023 Roche Molecular s, Inc.

CE 2797 IVD

Tài liệu tham khảo

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. Nickeleit 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.

Sửa đổi tài liệu

Thông tin xét duyệt tài liệu	
Doc Rev. 2.0 09/2022	Cập nhật trang đầu và Bảng 2 và 3 với thêm số P/N cho mẫu vật liệu kiểm soát (mẫu chứng). Cập nhật mục **Thương hiệu và sáng chế**, bao gồm đường dẫn. Vui lòng liên hệ với đại diện Roche tại địa phương nếu bạn có bất cứ câu hỏi nào
Doc Rev. 3.0 05/2023	Cập nhật thể tích mẫu tối thiểu về lại giá trị gốc ban đầu trong mục **Hướng dẫn sử dụng** và **Tính năng chính của xét nghiệm**. Cập nhật tuyên bố của cơ quan có thẩm quyền. Thêm chú thích bị thiếu ở Bảng 20. Sửa các lỗi văn phạm nhỏ. Cập nhật thương hiệu **cobas**®. Vui lòng liên hệ với đại diện Roche tại địa phương nếu bạn có bất cứ câu hỏi nào.

Tóm tắt báo cáo an toàn và hiệu năng sản phẩm có thể tìm thấy trong đường dẫn sau:
https://ec.europa.eu/tools/eudamed.