

cobas[®] CMV

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

Do stosowania w diagnostyce in vitro

cobas[®] CMV

P/N: 07001029190

cobas[®] CMV Control Kit

P/N: 07001037190

cobas[®] NHP Negative Control Kit

P/N: 07002220190

Spis treści

Zastosowanie	4
Podsumowanie oraz opis testu.....	4
Odczynniki i materiały	7
Odczynniki i kontrole do testu cobas® CMV	7
Odczynniki cobas omni do przygotowywania próbek.....	10
Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników	11
Wymagane materiały dodatkowe	12
Wymagane urządzenia i oprogramowanie.....	12
Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania	13
Ostrzeżenia i środki ostrożności	13
Użytkowanie odczynników	13
Dobra praktyka laboratoryjna.....	14
Pobieranie, transport i przechowywanie próbek.....	14
Próbki	14
Instrukcja użytkowania	16
Uwagi proceduralne.....	16
Wykonywanie testu cobas® CMV	16
Wyniki.....	17
Kontrola jakości i ważność wyników	17
Interpretacja wyników	18
Ograniczenia metody.....	18

Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych 19

Najważniejsze parametry działania testu.....	19
Granica wykrywalności (LoD)	19
Zakres liniowości.....	20
Dokładność wewnątrz laboratorium	21
Weryfikacja genotypu.....	21
Weryfikacja próbek lekoopornego CMV	22
Swoistość	23
Swoistość analityczna.....	23
Swoistość analityczna — substancje wpływające na wynik testu.....	24
Skuteczność w porównaniu z testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV.....	25
Błąd całego systemu	25
Zanieczyszczenie krzyżowe.....	25

Dodatkowe informacje 26

Najważniejsze cechy testu.....	26
Oznaczenia	27
Wytwórca i dystrybutorzy	29
Znaki towarowe i patenty	29
Prawa autorskie	29
Piśmiennictwo	30
Wersja dokumentu.....	32

Zastosowanie

cobas® CMV to test do amplifikacji kwasu nukleinowego w warunkach *in vitro* do ilościowego oznaczania DNA cytomegalowirusa (CMV) w ludzkim osoczu z krwi pobranej na EDTA.

cobas® CMV jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w diagnostyce i leczeniu CMV u pacjentów po przeszczepach narządów miękkich oraz pacjentów po przeszczepach hematopoetycznych komórek macierzystych. Test może być stosowany u tych populacji pacjentów w celu oceny potrzeby wprowadzenia leczenia przeciwwirusowego. U pacjentów poddanych leczeniu anty-CMV, seryjne oznaczenia DNA można stosować w celu oceny odpowiedzi wirusa na terapię.

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

Podsumowanie oraz opis testu

Informacje podstawowe

Ludzki cytomegalowirus (CMV) to patogen wirusowy należący do rodziny herpeswirusów występujących powszechnie na całym świecie.^{1,2} U gospodarzy immunokompetentnych, zakażenia CMV są często bezobjawowe, ale zasadnicze zakażenie lityczne może występować w postaci ostrego zespołu podobnego do mononukleozy. Po zakażeniu CMV zazwyczaj utrzymuje się jako dożyciowe zakażenie utajone, które może okresowo ulegać reaktywacji. Najczęstszymi miejscami zakażenia CMV są komórki jednojądrzaste krwi obwodowej linii szpikowej (ale nie limfocyty) oraz komórki śródbłonna.³ U człowieka wirus CMV pozostaje w stanie utajonym w monocytach/makrofagach.² Osoby z zakażeniem utajonym mogą bezobjawowo wydzielać wirusa do płynów ustrojowych (np. moczu, śliny) i w ten sposób zarażać innych. Osoby z obniżoną odpornością, w tym niemowlęta, biorcy przeszczepów oraz pacjenci z AIDS, należą do grupy wysokiego ryzyka wystąpienia ciężkich pierwotnych zakażeń CMV lub reaktywacji uśpionego CMV, które mogą prowadzić do podwyższonej zachorowalności i śmiertelności.⁴ Ciężkie objawy choroby CMV obejmują zapalenie siatkówki, poliradikulopatię, nieżyt żołądkowo-jelitowy, zapalenie wątroby, zapalenie mózgu, zapalenie przełyku, zapalenie jelit, zapalenie trzustki, zapalenie nerek, odrzucenie narządu dawcy, zapalenie płuc i zespół wirusowy CMV.⁵⁻⁷

Nasze obecne rozumienie istotnych klinicznie wartości progowych rozwoju choroby CMV pochodzi z różnorodnych badań przy użyciu różnych technik, populacji badania i punktów końcowych.⁸⁻¹⁵ Ogólnie, z ryzykiem rozwoju choroby ściślej związane jest wyższe miano wirusa CMV. Związek między wiremiami i chorobą jest sigmoidalny, to jest ryzyko choroby CMV znacząco rośnie, po tym jak obciążenie wirusem osiągnie „krytyczną wartość progową”. Na przykład podczas stosowania laboratoryjnego testu DNA CMV z krwi pełnej w celu badania biorców przeszczepu wątroby, kluczowa wartość progowa wynosiła $\geq 5 \log_{10}$ kopii/ml DNA CMV.¹³ U pacjentów z HIV/AIDS, stężenia DNA CMV były skorelowane z ryzykiem choroby CMV i śmiertelnością całkowitą.¹⁶⁻¹⁹

Jednak obecne metody laboratoryjne ilościowego oznaczania DNA CMV są ograniczone brakiem standaryzowanych wyników, co może prowadzić do wysokiego stopnia zmienności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej.²⁰ W celu zapewnienia spójności wyników podczas leczenia pacjentów z chorobą CMV, kluczowe jest zwalidowanie odtwarzalności miana DNA wirusa CMV. Obecne wytyczne oparte na precyzji testów PCR sugerują, że zmiany seryjnych pomiarów miana wirusa powinny być co najmniej 3-krotne ($0,5 \log_{10}$), aby reprezentowały zmiany istotne biologicznie. Ponieważ zmienność jest największa przy niskich stężeniach, dla wartości bliskich dolnej granicy oznaczalności testu mogą być wymagane ponad 5-krotne ($0,7 \log_{10}$) zmiany wiremii, aby można je było uznać za istotne.^{11, 12}

Chociaż ściśle wartości progowe nadal są przedmiotem debaty ze względu na zmienność pomiędzy testami, koncepcja kluczowej wartości progowej wydaje się być ważna i była zgłaszana w badaniach przyrodniczych pokazując, że wyższe wartości miana wirusa korelowały ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby CMV.⁸⁻¹⁴ Jedno badanie wykorzystujące test COBAS® AMPLICOR CMV MONITOR ustaliło wartość odcięcia prognozującą chorobę między 2000 i 5000 kopii/ml u seropozytywnych pod względem CMV biorców przeszczepu wątroby.¹⁰

Uzasadnienie badań NAT

Do metod laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce zakażenia rozlanego oraz aktywnej choroby trzewnej spowodowanej ludzkim wirusem CMV należą: wyizolowanie wirusa metodą hodowli z leukocytów krwi obwodowej (ang. peripheral blood leukocytes, PBL), badanie histologiczne biopsji, metody serologiczne, pomiar poziomu antygenu pp65 oraz detekcja DNA CMV przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction, PCR).²¹ Serologia posiada jedynie wartość umożliwiającą określenie, czy pacjent był wcześniej zakażony wirusem CMV i czy występuje ryzyko reaktywacji. Metody hodowli mają małą wartość predykcyjną; czas hodowli wynosi ponad 48 godzin, a ich zastosowanie ograniczone jest do pacjentów z upośledzoną odpornością. Ocena antygenem pp65 jest pracochłonna i wymaga opracowania próbki krwi w ciągu 6 godzin od jej pobrania, ponieważ przechowywanie próbki powoduje obniżenie antygenem.²² Test pp65 jest również trudny do przeprowadzenia u pacjentów z neutropenią. Bezpośrednia detekcja DNA wirusa CMV za pomocą metod PCR w czasie rzeczywistym potencjalnie oferuje szeroki zakres dynamiczny, precyzję i wysoką czułość.

Objaśnienie testu

cobas® CMV to ilościowy test stosowany w systemie **cobas® 6800** i **cobas® 8800**. Test **cobas® CMV** umożliwia wykrywanie oraz ilościowe oznaczanie DNA CMV w pobranych od zakażonych pacjentów próbkach osocza krwi pobranej na EDTA. Miano wirusa jest określane ilościowo w porównaniu ze standardem kwantyfikacji DNA nie-CMV (DNA-QS), który jest wprowadzany do każdej próbki podczas jej przetwarzania. DNA-QS pełni również funkcje monitorowania całego procesu przygotowania próbki oraz amplifikacji PCR. Dodatkowo test DNA-QS wykorzystuje trzy kontrole zewnętrzne: o wysokim mianie dodatnim, o niskim mianie dodatnim i kontrolę ujemną.

Zasady procedury

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

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

Wybiórcza amplifikacja docelowego kwasu nukleinowego z próbki jest osiągana przez zastosowanie docelowych swoistych dla wirusa starterów, przedniego i wstecznego, wybranych z wysoce konserwatywnych regionów genu polimerazy DNA wirusa CMV (UL54). Selektywna amplifikacja DNA-QS uzyskiwana jest przy użyciu swoistych dla sekwencji starterów przedniego i wstecznego, które wybierane są tak, aby nie były homologiczne z genomem CMV. Do amplifikacji wykorzystywana jest termostabilna polimeraza DNA. Sekwencje docelowa oraz DNA-QS są amplifikowane jednocześnie przy użyciu uniwersalnego profilu amplifikacji PCR ze wstępnie zdefiniowanymi etapami temperatury i liczby cykli. Mastermiks zamiast trifosforanu deoksytymidyny (dTTP) zawiera trifosforan deoksyurydyny (dUTP), który jest wbudowywany do nowo syntetyzowanego DNA (amplikonu).^{23–25} Wszystkie zanieczyszczające amplikony z poprzednich reakcji PCR eliminowane są podczas pierwszego cyklu termicznego reakcji za pomocą znajdującego się w mieszaninie PCR enzymu AmpErase. Jednak nowo powstałe amplikony nie są eliminowane, gdyż enzym AmpErase jest inaktywowany w temperaturze przekraczającej 55°C.

Mastermiks **cobas**® CMV zawiera jedną sondę detekcyjną swoistą dla docelowych sekwencji CMV i jedną sondę dla DNA-QS. Sondy znakowane są za pomocą swoistych dla sekwencji docelowych fluorescencyjnych barwników reporterowych, pozwalających na równoczesne wykrywanie docelowej sekwencji CMV i DNA-QS w dwóch różnych kanałach detekcji.^{26, 27} Sygnał fluorescencyjny nienaruszonych sond jest tłumiony przez barwnik wygaszający. Podczas amplifikacji PCR hybrydacja sondy do swoistej sekwencji jednoniciowej matrycy DNA powoduje rozszczepienie nici przez polimerazę DNA dzięki jej aktywności nukleolitycznej w kierunku 5' do 3', co powoduje rozdzielanie barwników reporterowych i wygaszających oraz wygenerowanie sygnału fluorescencyjnego. Z każdym cyklem PCR generowana jest zwiększająca się liczba rozszczepionych sond i jednocześnie wzrasta sumaryczny sygnał barwnika reporterowego. Wykrycie w czasie rzeczywistym i rozróżnienie produktów PCR ma miejsce poprzez pomiar fluorescencji uwolnionych barwników reporterowych reprezentujących docelowe wirusy i DNA-QS.

Odczynniki i materiały

Odczynniki i kontrole do testu cobas® CMV

Wszystkie nieotwarte odczynniki i kontrole należy przechowywać zgodnie z zaleceniami, które zawiera Tabela 1 do Tabela 4.

Tabela 1 cobas® CMV

cobas® CMV Przechowywać w temperaturze 2–8°C Kaseta na 96 testów (P/N 07001029190)		
Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw 96 testów
Proteinase Solution (PASE)	Bufor Tris, < 0,05% EDTA, chlorek wapnia, octan wapnia, 8% proteinazy EUH210: Karta charakterystyki dostępna na żądanie. EUH208: Zawiera subtylizynę. Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej.	13 ml
DNA Quantitation Standard (DNA-QS)	Bufor Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% konstruktu innego niż DNA CMV zawierającego starter wiążący region inny niż CMV oraz region unikatowej sondy (niezakaźny DNA), < 0,002% Poli-rA RNA (syntetyczny), < 0,1% azydku sodu	13 ml
Elution Buffer (EB)	Bufor Tris, 0,2% metylo-4-hydroksybenzoesan	13 ml
Master Mix Reagent 1 (MMX-R1)	Octan magnezu, wodorotlenek potasu, < 0,1% azydku sodu	5,5 ml
CMV Master Mix Reagent 2 (CMV MMX-R2)	Bufor trycynowy, octan potasu, <18% dimetylosulfotlenek, glicerol, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% starterów przednich i wstecznych dla CMV, < 0,01% starterów przednich i wstecznych standardu ilościowego, < 0,01% znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond oligonukleotydowych, swoistych dla CMV i standardu ilościowego CMV, < 0,01% aptameru oligonukleotydowego, < 0,1% polimerazy DNA Z05D, < 0,10% enzymu AmpErase (uracylo-N-glikozylazy) (bakteryjnej), < 0,1% azydku sodu	6 ml

Tabela 2 cobas® CMV Control Kit

cobas® CMV Control Kit

Przechowywać w temperaturze 2–8°C

(P/N 07001037190)

Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
CMV Low Positive Control (CMV L(+))C	< 0,001% syntetycznego (plazmidowego) DNA CMV opłaszczanego białkiem kapsydowym bakteriofaga lambda, prawidłowe osocze ludzkie, bez DNA CMV wykrywalnego metodami PCR. 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  OSTRZEŻENIE H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P272: Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wносить poza miejsce pracy. P280: Stosować rękawice ochronne. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P362 + P364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. P501: Zawartość/pojemnik usuwać do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów. 55965-84-9 mieszanina: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [WE nr 247-500-7] i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu [WE nr 220-239-6] (3:1)
CMV High Positive Control (CMV H(+))C	< 0,001% syntetycznego (plazmidowego) DNA CMV opłaszczanego białkiem kapsydowym bakteriofaga lambda, prawidłowe osocze ludzkie, bez DNA CMV wykrywalnego metodami PCR. 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  OSTRZEŻENIE H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P272: Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wносить poza miejsce pracy. P280: Stosować rękawice ochronne. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/ zgłosić się pod opiekę lekarza. P362 + P364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. P501: Zawartość/pojemnik usuwać do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów. 55965-84-9 mieszanina: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [WE nr 247-500-7] i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu [WE nr 220-239-6] (3:1)

* Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zasadniczo zgodne z wytycznymi GHS UE.

** Substancja niebezpieczna.

Tabela 3 cobas® NHP Negative Control Kit

cobas® NHP Negative Control Kit

Przechowywać w temperaturze 2–8°C
(P/N 07002220190)

Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
Normal Human Plasma Negative Control (NHP-NC)	Prawidłowe osocze ludzkie, DNA CMV niewykrywalne metodami PCR. < 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	  OSTRZEŻENIE H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P272: Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wnosić poza miejsce pracy. P280: Stosować rękawice ochronne. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P362 + P364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. P501: Zawartość/pojemnik usuwać do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów. 55965-84-9 Mieszanina: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [WE nr 247-500-7] i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu [WE nr 220-239-6] (3:1)

* Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zasadniczo zgodne z wytycznymi GHS UE.

** Substancja niebezpieczna.

Odczynniki cobas omni do przygotowywania próbek

Tabela 4 Odczynniki cobas omni do przygotowywania próbek*

Odczynniki	Skład odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Przechowywać w temperaturze 2–8°C (P/N 06997546190)	Szklane cząstki magnetyczne, bufor Tris, 0,1% metylo-4-hydroksybenzoesanu, < 0,1% azydku sodu	480 testów	Nie dotyczy
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Przechowywać w temperaturze 2–8°C (P/N 06997511190)	Bufor Tris, 0,1% metylo-4-hydroksybenzoesanu, < 0,1% azydku sodu	4 × 875 ml	Nie dotyczy
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Przechowywać w temperaturze 2–8°C (P/N 06997538190)	43% (udział wagowy) tiocyjanian guanidyny***, 5% (udział wagowo-obj.) polidokanol***, 2% (udział wagowo-obj.) ditiotreitol***, dwuwodny cytrynian sodu	4 × 875 ml	 NIEBEZPIECZEŃSTWO H302 + H332: Działa szkodliwie po połknięciu i w następstwie wdychania. H314: Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. H412: Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. EUH032: W kontakcie z kwasami uwalnia bardzo toksyczne gazy. P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. P303 + P361 + P353: W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): natychmiast zdjąć całą skażoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody. P304 + P340 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. P305 + P351 + P338 + P310: W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ/lekarzem. 593-84-0 Tiocyjanian guanidyny 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimerkaptobutano-2,3-diol
cobas omni Wash Reagent (WASH) Przechowywać w temperaturze 15–30°C (P/N 06997503190)	Dwuwodny cytrynian sodu, 0,1% metylo-4-hydroksybenzoesan	4,2 l	Nie dotyczy

* Te odczynniki nie są dołączone do zestawu testu cobas® CMV. Należy zapoznać się z listą wymaganych materiałów dodatkowych (Tabela 7).

** Oznakowanie bezpieczeństwa produktu jest zasadniczo zgodne z wytycznymi GHS UE.

*** Substancja niebezpieczna.

Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników

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

Jeśli odczynniki nie są umieszczone w **cobas®** 6800/8800 Systems, należy przechowywać je w odpowiedniej temperaturze, zgodnie z informacjami, które zawiera Tabela 5.

Tabela 5 Przechowywanie odczynników (umieszczonych poza systemem)

Odczynnik	Temperatura przechowywania
cobas® CMV – 96	2–8°C
cobas® CMV Control Kit	2–8°C
cobas® NHP 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

Odczynniki umieszczone w **cobas®** 6800/8800 Systems przechowywane są w odpowiedniej temperaturze, a ich data ważności jest monitorowana przez system. Systemy **cobas®** 6800/8800 Systems umożliwiają wykorzystanie odczynników tylko w przypadku spełnienia wszystkich warunków, które zawiera Tabela 6. System automatycznie uniemożliwia wykorzystanie przeterminowanych odczynników. Tabela 6 pozwala na zrozumienie warunków użytkowania odczynników wymuszanych przez **cobas®** 6800/8800 Systems.

Tabela 6 Warunki dotyczące daty ważności odczynników egzekwowane przez **cobas®** 6800/8800 Systems

Odczynnik	Data ważności zestawu	Stabilność otwartego zestawu	Liczba przebiegów, do których można wykorzystać zestaw	Stabilność na pokładzie urządzenia (łącznie czas w urządzeniu poza lodówką)
cobas® CMV – 96	Nieprzekroczona	30 dni od pierwszego użycia	Maksymalnie 10 przebiegów	Maksymalnie 8 godzin
cobas® CMV Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy	Nie dotyczy	Maksymalnie 8 godzin
cobas® NHP Negative Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy	Nie dotyczy	Maksymalnie 10 godzin
cobas omni Lysis Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie*	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas omni MGP Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie*	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas omni Specimen Diluent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie*	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas omni Wash Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie*	Nie dotyczy	Nie dotyczy

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

Wymagane materiały dodatkowe

Tabela 7 Materiały i materiały eksploatacyjne do użytku z systemami **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
Worek na odpady stałe	07435967001
Pojemnik na odpady stałe	07094361001

Wymagane urządzenia i oprogramowanie

Na urządzeniu(-ach) należy zainstalować oprogramowanie **cobas®** 6800/8800 oraz pakiet oprogramowania do analizy **cobas®** CMV. Z systemem zostanie dostarczony serwer Instrument Gateway (IG).

Tabela 8 Urządzenia

Wyposażenie	P/N
cobas® 6800 System (opcja, na ruchomej platformie)	05524245001 i 06379672001
cobas® 6800 System (nieruchomy)	05524245001 i 06379664001
cobas® 8800 System	05412722001
Moduł dostarczania próbek	06301037001

Dodatkowe informacje dotyczące pierwotnych i wtórnych probówek na próbki akceptowanych przez urządzenia zawiera podręcznik użytkownika systemów **cobas®** 6800/8800 System.

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

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności

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

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Test **cobas®** CMV nie został zaprojektowany jako badanie przesiewowe na obecność wirusa CMV we krwi lub produktach krwiopochodnych.
- Ze wszystkimi próbkami pacjentów należy obchodzić się tak jak z materiałem zakaźnym, stosując procedury dobrej praktyki laboratoryjnej, takie jak określone w dokumentach Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories oraz CLSI Document M29-A4.^{28, 29} Procedurę tę powinien wykonywać wyłącznie personel doświadczony w obchodzeniu się z materiałem zakaźnym, użytkowaniu testu **cobas®** CMV i systemu **cobas®** 6800/8800.
- Wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy uważać za potencjalnie zakaźne i postępować z nimi z zastosowaniem ogólnych środków ostrożności. W przypadku rozlania materiału należy natychmiast zdezynfekować świeżo przygotowanym 0,5% roztworem podchlorynu sodu w destylowanej lub dejonizowanej wodzie (wybielacz rozcieńczony w stosunku 1:10) lub postępować zgodnie z procedurami przyjętymi w danej instytucji.
- **cobas®** CMV Control Kit oraz **cobas®** NHP Negative Control Kit zawierają osocze uzyskane z krwi ludzkiej. Materiał źródłowy przetestowano metodami PCR i nie wykazano w nim wykrywalnego DNA CMV. Żadna ze znanych metod badania nie może zaoferować całkowitej pewności, że produkty otrzymane z ludzkiej krwi nie będą przenosić czynników zakaźnych.
- **Nie zamrażać krwi pełnej ani innych próbek przechowywanych w probówkach pierwotnych.**
- W celu zagwarantowania optymalnego działania testu należy stosować wyłącznie dostarczone lub wymienione potrzebne materiały eksploatacyjne.
- Karty charakterystyki (ang. Safety Data Sheet, SDS) są dostępne na żądanie w miejscowym przedstawicielstwie firmy Roche.
- Należy ściśle przestrzegać podanych procedur i wytycznych w celu zapewnienia prawidłowego wykonania testu. Wszelkie odchylenia od procedur i wytycznych mogą mieć wpływ na optymalną skuteczność testu.
- Jeżeli w trakcie obchodzenia się z próbkami i ich przygotowywania nie stosuje się odpowiedniej kontroli zanieczyszczenia pomiędzy próbkami, może dojść do uzyskania wyników fałszywie dodatnich.

Użytkowanie odczynników

- Aby uniknąć zanieczyszczenia pomiędzy próbkami lub kontrolami, z wszystkimi odczynnikami, kontrolami i próbkami należy postępować zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Przed użyciem należy ocenić wzrokowo każdą kasetę z odczynnikami, rozcieńczalnik, odczynnik do lizy i odczynnik płuczający, aby upewnić się, że nie ma choćby najmniejszego wycieku. W razie wystąpienia wycieku nie wolno używać tego materiału do badania.
- **cobas omni** Lysis Reagent zawiera izotiocyanian guanidyny, potencjalnie niebezpieczną substancję chemiczną. Nie dopuszczać do kontaktu odczynników ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody; w przeciwnym razie mogą powstać oparzenia.
- Zestawy testu **cobas®** CMV, **cobas omni** MGP Reagent oraz **cobas omni** Specimen Diluent zawierają azydek sodu jako substancję konserwującą. Nie dopuszczać do kontaktu odczynników ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeżeli dojdzie do kontaktu, natychmiast spłukać dużą ilością wody; w przeciwnym razie mogą

powstać oparzenia. Jeżeli dojdzie do rozlania wymienionych odczynników, przed wytarciem należy rozcieńczyć je wodą.

- Nie wolno dopuszczać do kontaktu **cobas omni** Lysis Reagent, zawierającego tiocyjanian guanidyny, z roztworem podchlorynu sodu (wybielaczem). Połączenie to może skutkować wytworzeniem silnie trującego gazu.
- Wszystkie materiały, które przypadkowo weszły w kontakt z próbkami i odczynnikami, należy usuwać zgodnie z przepisami krajowymi, stanowymi i lokalnymi.

Dobra praktyka laboratoryjna

- Nie należy pipetować za pomocą ust.
- Nie jeść, nie pić ani nie palić w obszarach roboczych.
- Podczas obchodzenia się z próbkami i odczynnikami należy nosić rękawice laboratoryjne, fartuch oraz osłonę oczu. W celu uniknięcia zanieczyszczenia należy zmieniać rękawice pomiędzy próbkami i użytkowaniem zestawów **cobas®** CMV oraz odczynników **cobas omni**. Podczas pracy z próbkami i kontrolami należy unikać zanieczyszczenia rękawic.
- Należy dokładnie umyć ręce po zakończeniu pracy z próbkami i odczynnikami z zestawu, a także po zdjęciu rękawic.
- Dokładnie oczyścić i odkazić wszystkie laboratoryjne powierzchnie robocze świeżo przygotowanym roztworem 0,5% podchlorynu sodu w wodzie destylowanej lub dejonizowanej (rozcieńczyć domowy wybielacz w stosunku 1:10). Następnie należy przetrzeć powierzchnię 70% etanolem.
- Jeśli dojdzie do rozlania płynu na powierzchnię urządzenia **cobas®** 6800/8800, należy postępować zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi w podręczniku użytkownika **cobas®** 6800/8800 Systems w celu prawidłowego wyczyszczenia i odkażenia powierzchni urządzenia (urządzeń).

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

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

Wszystkie próbki należy przechowywać w określonych temperaturach.

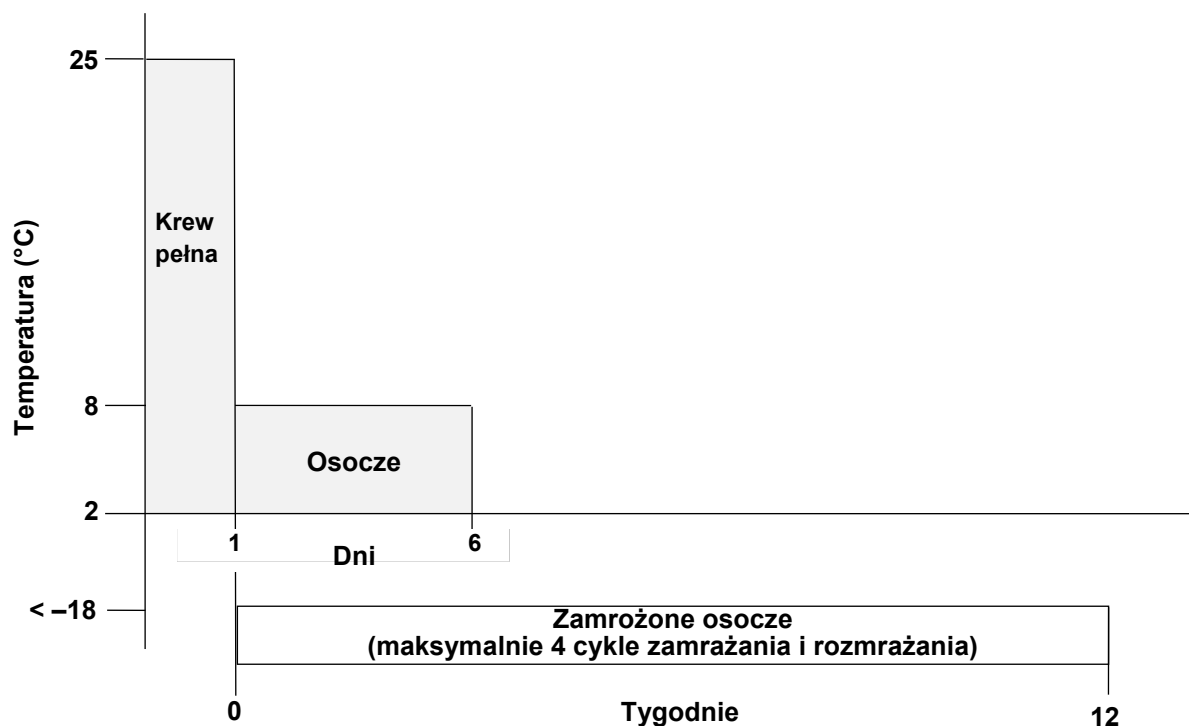
Podwyższona temperatura ma wpływ na stabilność próbek.

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

Próbki

- Krew należy pobierać do probówek do otrzymywania nierozcieńczonego osocza BD Vacutainer® PPT™, przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant. Należy przestrzegać instrukcji producenta probówek do pobierania próbek. Należy zapoznać się z Ryc. 1.
- Krew pełna pobrana do probówek przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej BD Vacutainer® PPT™ lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant może być przechowywana i/lub transportowana do 24 godzin w temperaturze od 2°C do –25°C przed przygotowaniem osocza. Wirowanie powinno być przeprowadzane zgodnie z instrukcjami producenta.
- Po oddzieleniu, próbki osocza można przechowywać w probówkach wtórnych przez maksymalnie 6 dni w temperaturze od 2°C do 8°C lub przez okres do 12 tygodni w temperaturze ≤ –18°C.
- Probki osocza zachowują stabilność przez maksymalnie cztery cykle zamrażania/rozmarzania w przypadku zamrożenia w temperaturze ≤ –18°C.

Ryc. 1 Warunki przechowywania próbek



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

Uwaga: Alternatywnie krew pełną pobraną do probówek przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej BD Vacutainer® PPT™ lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant można przechowywać i/lub transportować do 36 godzin w temperaturze od 2°C do –25°C przed przygotowaniem osocza, lecz w takiej sytuacji nie będzie można dłużej przechowywać oddzielonego osocza i trzeba je będzie bezpośrednio wykorzystać do analiz.

Instrukcja użytkowania

Uwagi proceduralne

- Nie należy używać odczynników testu **cobas® CMV**, **cobas® CMV Control Kit**, **cobas® NHP Negative Control Kit** i odczynników **cobas omni** po upływie ich daty ważności.
- Nie wykorzystywać ponownie materiałów eksploatacyjnych. Są one przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.
- Instrukcje dotyczące prawidłowej konserwacji urządzeń zawiera podręcznik użytkownika systemów **cobas® 6800/8800**.

Wykonywanie testu cobas® CMV

Test **cobas® CMV** można przeprowadzić przy użyciu jednej minimalnej objętości próbki 500 µl. Procedurę wykonywania testu opisano szczegółowo w Podręczniku użytkownika systemów **cobas® 6800/8800**. Na Ryc. 2 podsumowano tę procedurę.

Ryc. 2 Procedura testu **cobas® CMV**

1	Uzupełnienie odczynników i materiałów eksploatacyjnych po monitorowaniu przez system: • Załaduj odczynnik płuczący, odczynnik do lizy oraz rozcieńczalnik • Załaduj płytki do przetwarzania oraz płytki amplifikacyjne • Załaduj szklane cząstki magnetyczne • Załaduj odczynniki swoiste dla testu • Umieść kasety z kontrolami • Załaduj statywy na końcówki • Wymień statyw na niedrożne końcówki
2	Umieścić statyw z próbkami
3	Przeglądanie i eksportowanie wyników
4	Wyładowanie materiałów eksploatacyjnych: • wyjmij płytki do amplifikacji z modułu analitycznego; • wyjmij puste kasety z kontrolami; • usuń odpady stałe; • usuń odpady płynne.

Wyniki

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

Kontrola jakości i ważność wyników

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

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

Znaczniki kontroli

Tabela 9 Oflagowania kontroli ujemnej i kontroli dodatnich

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

Jeśli partia zostanie unieważniona, należy powtórzyć badanie całej partii z uwzględnieniem próbek i kontroli.

Interpretacja wyników

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

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

Tabela 10 Interpretacja wyników dla poszczególnych materiałów docelowych

Wyniki	Interpretacja
Target Not Detected	Nie wykryto DNA CMV. Podać wynik jako „Nie wykryto CMV”.
< Titer Min	Obliczone miano jest niższe od dolnej granicy oznaczalności testu (LLOQ). Podać wynik jako „Wykryto CMV, miano poniżej (miano min.)”. Miano min. = 34,5 IU/ml
Titer	Obliczone miano znajduje się w zakresie liniowym testu — jest większe lub równie mianu min. oraz mniejsze lub równe mianu maks. Podać wynik jako „Wykryto (miano) CMV”.
> Titer Max ^a	Obliczone miano jest wyższe od górnej granicy oznaczalności testu (ULOQ). Podać wynik jako „Wykryto CMV, miano powyżej (miano maks.)”. Miano maks. = 1,0E+07 IU/ml

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

Ograniczenia metody

- Test **cobas**® CMV został oceniony jedynie pod kątem stosowania z **cobas**® CMV Control Kit, **cobas**® NHP Negative Control Kit, **cobas omni** MGP Reagent, **cobas omni** Lysis Reagent, **cobas omni** Specimen Diluent oraz **cobas omni** Wash Reagent do użytku z **cobas**® 6800/8800 Systems.
- Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od prawidłowych procedur pobierania, przechowywania i wykorzystywania próbek.
- Test ten został zatwierdzony wyłącznie do badania osocza krwi pobranej na EDTA. Badanie innych rodzajów próbek przy użyciu testu **cobas**® CMV może dawać nieprawidłowe wyniki. Pomiarów wirerii w osoczu nie można bezpośrednio porównać z wiracją w innych typach próbek.
- Na oznaczenie ilościowe DNA wirusa CMV wpływ mogą mieć: metoda pobrania próbki, czynniki zależne od pacjenta (tj. wiek, obecność objawów) i (lub) stadium zakażenia.
- Mutacje w obrębie wysoko konserwatywnych regionów genu polimerazy DNA CMV (UL54), z którymi wiążą się startery i (lub) sondy używane w teście **cobas**® CMV — chociaż rzadkie — mogą wpływać na wiązanie starterów i (lub) sond oraz spowodować zaniżenie miana lub niewykrycie wirusa.
- Z uwagi na różnice między technologiami zaleca się, aby przed zmianą stosowanych metod użytkownik przeprowadził w laboratorium badania korelacji stosowanych metod w celu określenia występujących między nimi różnic jakościowych. Użytkownicy powinni postępować zgodnie z własnymi określonymi zasadami/procedurami.
- Test **cobas**® CMV nie jest przeznaczony do przesiewowego badania na obecność wirusa CMV we krwi lub produktach krwiopochodnych i nie został oceniony jako test diagnostyczny potwierdzający zakażenie wirusem CMV.

Ocena skuteczności w badaniach nieklinicznych

Najważniejsze parametry działania testu

Granica wykrywalności (LoD)

Międzynarodowy standard WHO

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

Wyniki dla osocza EDTA przedstawia Tabela 11. Badanie wykazuje, że test **cobas®** CMV wykrywa DNA CMV przy stężeniu co najmniej 23 IU/ml z trafnością $\geq 95\%$.

Tabela 11 Granica wykrywalności w osoczu z EDTA

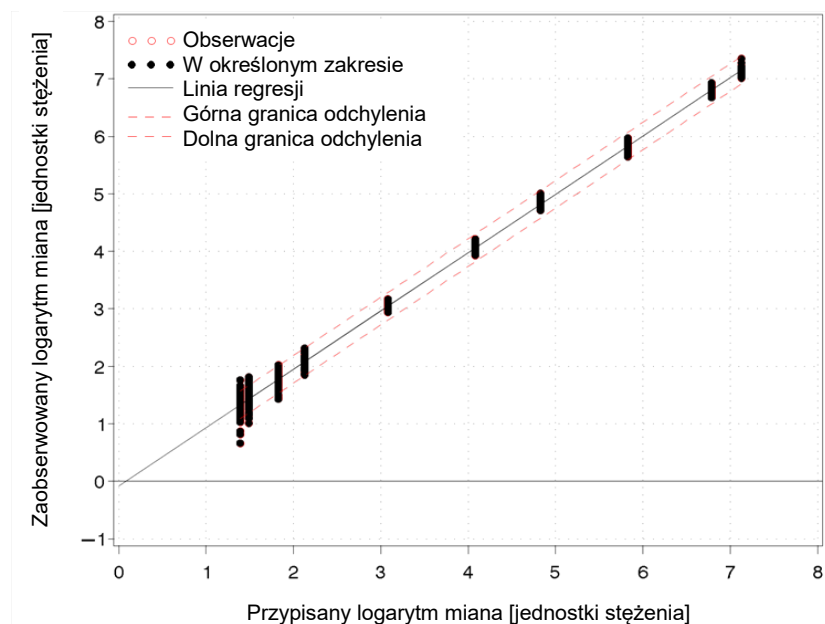
Stężenie wejściowe (DNA CMV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafień w %
92,0	189	189	100,00
46,0	189	188	99,47
34,5	189	187	99,47
23,0	189	181	95,77
11,5	189	158	83,60
5,8	189	117	61,60
2,9	189	66	34,92
1,4	189	28	14,81
0,0	189	0	0,00
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafień	20,6 IU/ml 95% przedział ufności: 17,9–24,3 IU/ml		

Zakres liniowości

Liniowość testu **cobas**® CMV oceniono wykorzystując rozcieńczenia seryjne zawierające 10 członków panelu ze stężeniami DNA genotypu gB-1 CMV pokrywającymi zakres liniowy testu (od $2,45E+01$ IU/ml do $1,34E+07$ IU/ml). Wszystkie elementy panelu testowano w 48 powtórzeniach w obrębie trzech serii odczynników testu **cobas**® CMV, a wyniki badania przedstawia Ryc. 3.

Wykazano, że test **cobas**® CMV jest testem liniowym od $2,45E+01$ IU/ml do $1,34E+07$ IU/ml.

Ryc. 3 Określanie zakresu liniowego w osoczu z EDTA



Dokładność wewnątrz laboratorium

Dokładność testu **cobas**® CMV określono przez analizę szeregu rozcieńczeń próbki o wysokim mianie hodowanego wirusa (genotyp Merlin, gB-1) w CMV-ujemnym osoczu z krwi pobranej na EDTA. Dziesięć poziomów rozcieńczeń zbadano w 48 powtórzeniach dla każdego poziomu w trzech seriach odczynników testu **cobas**® CMV przy użyciu trzech urządzeń oraz trzech operatorów przez 12 dni. Każda próbka przechodziła całą procedurę testu **cobas**® CMV na w pełni zautomatyzowanych systemach **cobas**® 6800/8800. Dlatego podana dokładność odzwierciedla wszystkie aspekty procedury badawczej. Wyniki przedstawia Tabela 12.

Test **cobas**® CMV wykazywał wysoką precyzję dla trzech serii odczynników badanych w zakresie stężeń od 2,45E+01 IU/ml do 1,34E+07 IU/ml.

Tabela 12 Precyzja wewnątrzlaboratoryjna testu **cobas**® CMV

Stężenie nominalne (IU/ml)	Stężenie przypisane (IU/ml)	Osocze pobrane na EDTA			
		Seria nr 1	Seria nr 2	Seria nr 3	Wszystkie serie
		OS	OS	OS	Pulowane OS
2,00E+07	1,34E+07	0,03	0,06	0,02	0,04
9,11E+06	6,11E+06	0,04	0,04	0,03	0,04
1,00E+06	6,71E+05	0,05	0,03	0,06	0,05
1,00E+05	6,71E+04	0,06	0,05	0,03	0,05
1,80E+04	1,21E+04	0,06	0,04	0,05	0,05
1,80E+03	1,21E+03	0,04	0,03	0,04	0,04
2,00E+02	1,34E+02	0,13	0,10	0,11	0,12
1,00E+02	6,71E+01	0,14	0,11	0,09	0,12
4,60E+01	3,09E+01	0,20	0,23	0,17	0,20
3,65E+01	2,45E+01	0,22	0,20	0,23	0,22

Weryfikacja genotypu

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

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

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

Supernatanty hodowli komórkowych CMV dla trzech różnych (gB-2, gB-3 i gB-4) genotypów glikoproteiny B rozcieńczono do trzech różnych stężeń w osoczu z krwi pobranej na EDTA ujemnym pod względem CMV. Określenie odsetka trafności przeprowadzono w 63 powtórzeniach dla każdego poziomu. Badania przeprowadzono z trzema seriami odczynników **cobas**® CMV. Wyniki przedstawia Tabela 13. Wyniki te weryfikują, że test **cobas**® CMV wykrył DNA CMV dla trzech różnych genotypów przy stężeniach 34,5 IU/ml z odsetkiem trafności wynoszącym $\geq 95\%$.

Tabela 13 Weryfikacja granicy wykrywalności genotypu DNA wirusa CMV

Genotyp	17,25 IU/ml			34,5 IU/ml			51,75 IU/ml		
	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w % (95% CI*)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w % (95% CI*)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w % (95% CI*)
gB-2	63	61	96,8 (99,6%)	63	63	100,0 (100,0)	63	63	100,0 (100,0)
gB-3	63	57	90,5 (96,4%)	63	63	100,0 (100,0)	63	63	100,0 (100,0)
gB-4	63	55	87,3 (94,4%)	63	63	100,0 (100,0)	63	63	100,0 (100,0)

* Górna granica jednostronnego 95% przedziału ufności

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

Szereg rozcieńczeń stosowany podczas weryfikacji badania liniowości genotypów testu **cobas®** CMV zawierał siedem elementów panelu rozciągającego się na zakres liniowy oznaczenia. Badanie przeprowadzono z dwiema seriami odczynnika **cobas®** CMV; zbadano 16 powtórzeń na poziom w osoczu z krwi pobranej na EDTA.

Zakres liniowy testu **cobas®** CMV zweryfikowano dla wszystkich trzech genotypów (gB-2, gB-3 i gB-4).

Weryfikacja próbek lekoopornego CMV

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

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

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

Supernatanty hodowli komórkowej dla dwóch różnych próbek lekoopornego CMV (opornego na foskarnet lub gancyklowir, walgancyklowir i cidofovir) rozcieńczono do trzech różnych stężeń w osoczu z krwi pobranej na EDTA ujemnym pod względem CMV. Określenie odsetka trafności przeprowadzono w 63 powtórzeniach dla każdego poziomu. Badania przeprowadzono z trzema seriami odczynników **cobas®** CMV. Wyniki przedstawia Tabela 14. Wyniki te weryfikują, że test **cobas®** CMV wykrył DNA CMV dla dwóch różnych próbek opornych na foskarnet lub gancyklowir, walgancyklowir i cidofovir przy stężeniach 34,5 IU/ml z odsetkiem trafności wynoszącym $\geq 95\%$.

Tabela 14 Weryfikacja granicy wykrywalności dla próbek lekoopornego CMV

Lekooporność	Miejsce mutacji w UL54	17,25 IU/ml			34,5 IU/ml			51,75 IU/ml		
		Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w % (95% CI*)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w % (95% CI*)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w % (95% CI*)
Foskarnet	E756Q	63	58	92,1 (97,4%)	63	63	100,0 (100,0)	63	63	100,0 (100,0)
Gancyklowir, walgancyklowir, cidofovir	L545S	63	59	93,7 (98,2%)	63	63	100,0 (100,0)	63	63	100,0 (100,0)

* Górna granica jednostronnego 95% przedziału ufności

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

Szereg rozcieńczeń stosowany podczas weryfikacji badania liniowości próbek lekoopornego CMV testu **cobas®** CMV zawierał siedem elementów panelu rozciągającego się na zakres liniowy oznaczenia. Badanie przeprowadzono z dwiema seriami odczynnika **cobas®** CMV; zbadano 16 powtórzeń na poziom w osoczu z krwi pobranej na EDTA.

Zakres liniowy testu **cobas®** CMV zweryfikowano dla dwóch lekoopornych próbek CMV (opornych na foskarnet lub gancyklowir, walgancyklowir i cidofovir).

Swoistość

Swoistość testu **cobas®** CMV określono na podstawie analizy próbek CMV-ujemnego osocza z krwi pobranej na EDTA od indywidualnych dawców. 608 indywidualnych próbek osocza EDTA zbadano przy użyciu dwóch serii odczynników testu **cobas®** CMV. Wszystkie badane próbki były ujemne pod względem DNA CMV. W panelu testu swoistość testu **cobas®** CMV wynosiła 100% (dolny jednostronny 95% przedział ufności wynoszący 99,5%).

Swoistość analityczna

Swoistość analityczna testu **cobas®** CMV była oceniana w panelu rozcieńczeń mikroorganizmów do stężenia 1,00E+06 cząstek, kopii, IU, odpowiedników genomowych lub CFU/ml w dodatnim pod względem DNA CMV i ujemnym pod względem DNA CMV osoczu krwi pobranej na EDTA. Dwa swoiste badane organizmy podano w tabeli 15. Każdy element panelu został przebadany przy użyciu testu **cobas®** CMV. Żaden z patogenów innych niż CMV nie zakłócał wydajności testu.

Tabela 15 Mikroorganizmy badane pod kątem reaktywności krzyżowej

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

Swoistość analityczna — substancje wpływające na wynik testu

Podwyższone poziomy trójglicerydów (34,5 g/l), bilirubiny związanej (0,25 g/l), bilirubiny niezwiązanej (0,25 g/l), albuminy (58,7 g/l), hemoglobiny (2,9 g/l) i ludzkiego DNA (2 mg/l) w próbkach badano z i bez DNA CMV. Wykazano, że testowane interferencje endogenne nie zakłócały działania testu **cobas®** CMV.

Wpływ obecności chorób autoimmunologicznych takich, jak toczenia rumieniowatego układowego (SLE), reumatoidalnego zapalenia stawów (RA) oraz obecności przeciwciał przeciwjądrowych (ANA) oceniano również w obecności i przy braku DNA CMV. Dodatkowo składniki leków (patrz Tabela 16) badano w trzykrotnym C_{max} z i bez DNA CMV.

Żadna z potencjalnie zakłócających substancji nie wykazywała interferencji z testem.

Tabela 16 Składniki leków badane pod kątem interferencji z ilościowym oznaczeniem DNA CMV w teście **cobas®** CMV

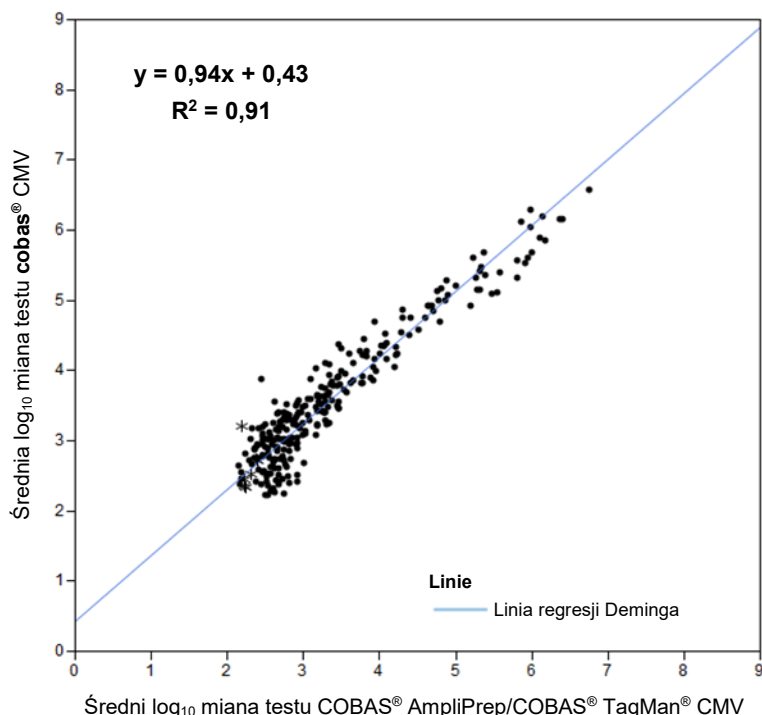
Klasa leku	Nazwa własna leku	
Przeciwbakteryjne	Cefotetan	Sulfametoksazol
	Klawulanian potasu	Tikarcylina disodowa
	Flukonazol	Trimetoprim
	Piperacylina	Wankomycyna
	Tazobaktam sodu	
Preparaty do leczenia zakażeń wirusami opryszczki (Herpes)	Gancyklowir	Cidofowir
	Valgancyklowir	Foskarnet
Lek immunosupresyjny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

Skuteczność w porównaniu z testem COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV

Działanie testu cobas® CMV i testu COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® CMV porównano podczas analizy próbek osocza krwi pobranej na EDTA od osób zakażonych CMV. W sumie 275 próbek osocza krwi pobranej na EDTA dla wszystkich genotypów CMV uzyskało wynik ważny w przeprowadzonej podwójnie analizie i znalazło się w zakresie oznaczalności obu testów. Przeprowadzono analizę regresji Deminga.

Ryc. 4 zawiera wyniki regresji Deminga.

Ryc. 4 Analiza regresji dla testów cobas® CMV vs test ilościowy CAP/CTM CMV Quantitative Test



Błąd całego systemu

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

Wyniki tego badania wykazały, że we wszystkich powtórzeniach stwierdzono ważność i reaktywność względem sekwencji docelowej CMV, co dało częstość występowania błędu systemowego na poziomie 0% (95% przedział 0%–3,6%).

Zanieczyszczenie krzyżowe

Częstość występowania zanieczyszczenia krzyżowego w teście cobas® CMV określono przez oznaczenie 240 powtórzeń prawidłowego osocza ludzkiego niezawierającego CMV z EDTA i 225 powtórzeń próbek z wysokim mianem CMV na poziomie $1,00\text{E}+06$ IU/ml. Łącznie wykonano pięć przebiegów z użyciem próbek dodatnich i ujemnych w układzie naprzemiennym.

Wszystkie 240 powtórzeń ujemnej próbki było ważnych i dało wynik ujemny, dając współczynnik zanieczyszczenia krzyżowego wynoszący 0% (95% przedział ufności wynoszący 0%–1,5%).

Dodatkowe informacje

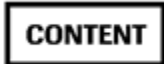
Najważniejsze cechy testu

Rodzaj próbki	Osocze krwi pobranej na EDTA
Wymagana ilość próbki	500 µl
Objętość przetwarzania	350 µl
Czułość analityczna	34,5 IU/ml
Zakres liniowości	34,5 IU/ml – 1E+07 IU/ml
Swoistość	100%
Wykrywane genotypy	Genotypy 1–4 glikoproteiny B CMV
Wykryte próbki lekoopornego CMV	Próbki CMV opornego na gancyklowir, walgancyklowir, cidofovir i foskarnet

Oznaczenia

Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

Tabela 17 Oznaczenia stosowane na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR

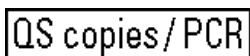
	Wiek lub data urodzenia		Data produkcji
	Oprogramowanie pomocnicze		Dystrybucja
	Przypisany zakres (kopie/ml)		Nie używać powtórnie
	Przypisany zakres (IU/ml)		Kobieta
	Autoryzowany Przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej		Wyłącznie do oceny działania w badaniach IVD
	Arkusze kodów kreskowych		Numer globalny jednostki handlowej
	Kod partii		Wyrób do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Zagrożenie biologiczne		Dolna granica przypisanego zakresu
	Numer katalogowy		Mężczyzna
	Data pobrania		Wytwórca
	Sprawdź w instrukcji użytkowania		Kontrola ujemna
	Zawartość wystarczająca na $<n>$ testów		Wyrób niejałowy
	Zawartość zestawu		Numer pacjenta
	Próba kontrolna		Nazwisko pacjenta



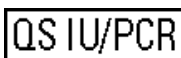
Rozerwać tutaj



Kontrola dodatnia



Kopie QS na reakcję PCR, użyć kopii QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.



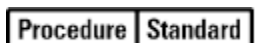
IU QS na reakcję PCR, użyć jednostek międzynarodowych (IU) QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.



Numer seryjny



Ośrodek



Procedura standardowa



Produkt sterylizowany tlenkiem etylenu



Przechowywać z dala od światła



Przestrzegać zakresu temperatury



Plik definicji testów



Oznaczenie zgodności CE – wyrób ten jest zgodny z obowiązującymi wymogami dotyczącymi oznaczenia CE dla wyrobu medycznego do diagnostyki *in vitro*.



Tą stroną do góry



Niepowtarzalny kod identyfikacyjny wyrobu



Procedura ultraczuła



Górna granica przypisanego zakresu



Linia napełniania moczem

Rx Only

Tylko Stany Zjednoczone: prawo federalne zezwala na sprzedaż tego wyrobu wyłącznie lekarzowi lub na zamówienie takiego lekarza.



Termin przydatności



Wyrób do testów przy pacjencie



Wyrób nieprzeznaczony do testów przy pacjencie



Wyrób do samodzielnego testowania



Wyrób nieprzeznaczony do samodzielnego testowania

Wytwórca i dystrybutorzy

Tabela 18 Wytwórca i dystrybutorzy



Wyprodukowano w Stanach Zjednoczonych

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com

Made in USA

Distributed by

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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Znaki towarowe i patenty

Ten produkt jest chroniony przez co najmniej jeden patent zarejestrowany w USA pod numerami 8962293, 9102924, 8609340, 9234250, 8097717, 8192958, 10059993, 10358675, 8129118 oraz 6727067, a także przez odpowiadające im patenty zagraniczne.

COBAS, COBAS OMNI, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLICOR CMV MONITOR, AMPLIPREP i TAQMAN są znakami towarowymi firmy Roche.

Vacutainer® jest zarejestrowanym znakiem towarowym firmy Becton Dickinson & Company.

ProClin® jest zarejestrowanym znakiem towarowym firmy Rohm and Haas Company.

Inne nazwy produktów i znaki towarowe są własnością odpowiednich podmiotów.

Technologia zapobiegania zanieczyszczeniu preparatu enzymu AmpErase® resztkami jest chroniona patentem USA nr 7,687,247 stanowiącym własność firmy Life Technologies; udostępniono ją na zasadzie licencji firmie Roche Molecular Systems, Inc.

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

Prawa autorskie

©2021 Roche Molecular Systems, Inc.



Piśmiennictwo

1. Griffiths PD. Cytomegalovirus. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattson JR, editors. Principles and Practice of Clinical Virology. 4th ed. London; John Wiley and Sons, 2000: pp. 79-116.
2. Pass RR. Cytomegalovirus. In: Knipe D, Howley P, et al., editors. Fields' Virology, vol. 1. 4th ed. Philadelphia; Lippincott, Williams & Wilkins, 2001: pp. 2675-2706.
3. Reeves M, Sinclair J. Aspects of Human Cytomegalovirus Latency and Reactivation. In: Shenk TE, Stinski MF, editors. Human Cytomegalovirus. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin Heidelberg; Springer-Verlag: 2008, pp. 297-313.
4. Jordan MC. Latent infection and the elusive cytomegalovirus. Rev Infect Dis. 1983;5:205-215.
5. Drew WL. Other virus infections in AIDS. I. Cytomegalovirus. Immunol Ser. 1989;44:507-534.
6. Drew WL. Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev. 1992;5:204-210.
7. Moscarski ES, Courcelle CT. Cytomegaloviruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, et al., editors. Fields' Virology, vol. 1. 4th ed. Philadelphia; Lippincott, Williams & Wilkins, 2001: pp. 2629-2674.
8. Asberg A, Humar A, Rollag H, et al.; A VICTOR Study Group. Oral valganciclovir is noninferior to intravenous ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. Am J Transplant. 2007;7:2106-2113.
9. Humar A, Kumar D, Boivin G, Caliendo AM. Cytomegalovirus (CMV) virus load kinetics to predict recurrent disease in solid-organ transplant patients with CMV disease. J Infect Dis. 2002;186:829-833.
10. Humar A, Gregson D, Caliendo AM, et al. Clinical utility of quantitative cytomegalovirus viral load determination for predicting cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. Transplantation. 1999;68:1305-1311.
11. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR, et al. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. Transplantation 2010;89(7):779-95.
12. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al.; Transplantation Society International CMV Consensus Group. Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation. Transplantation. 2013;96:333-360.
13. Cope AV, Sabin C, Burroughs A, Rolles K, Griffiths PD, Emery VC. Interrelationships among quantity of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in blood, donor-recipient serostatus, and administration of methylprednisolone as risk factors for HCMV disease following liver transplantation. J Infect Dis. 1997;176:1484-1490.
14. Razonable RR, Emery VC; 11th Annual Meeting of the IHMF (International Herpes Management Forum). Management of CMV infection and disease in transplant patients. 27–29 February 2004. Herpes. 2004;11:77-86.
15. Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. J Clin Virol. 2008;41:237-241.
16. Salmon-Céron D, Mazon MC, Chaput S, et al. Plasma cytomegalovirus DNA, pp65 antigenaemia and a low CD4 cell count remain risk factors for cytomegalovirus disease in patients receiving highly active antiretroviral therapy. AIDS. 2000;14:1041-1049.
17. Emery VC, Sabin C, Feinberg JE, Grywacz M, Knight S, Griffiths PD. Quantitative effects of valganciclovir on the replication of cytomegalovirus (CMV) in persons with advanced human immunodeficiency virus disease: baseline CMV load dictates time to disease and survival. The AIDS Clinical Trials Group 204/Glaxo Wellcome 123-014 International CMV Prophylaxis Study Group. J Infect Dis. 1999;180:695-701.

18. Bowen EF, Sabin CA, Wilson P, et al. Cytomegalovirus (CMV) viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. *AIDS*. 1997;11:889-893.
19. Jabs DA, Gilpin AM, Min YI, et al. Studies of Ocular Complications of AIDS Research Group. HIV and cytomegalovirus viral load and clinical outcomes in AIDS and cytomegalovirus retinitis patients: Monoclonal Antibody Cytomegalovirus Retinitis Trial. *AIDS*. 2002;16:877-887.
20. Pang XL, Fox JD, Fenton JM, et al.; American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice; Canadian Society of Transplantation. Interlaboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transpl*. 2009;9:258-268.
21. Yan SS, Fedorko DP. Recent advances in laboratory diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 2002;2:155-167.
22. Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant*. 2005;5:218-227.
23. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-128.
24. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-493.
25. Mol CD, Arvai AS, Slupphau G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-878.
26. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992;10:413-417.
27. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-994.
28. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
29. 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.

Wersja dokumentu

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc. Rev. 4.0 03/2021	Zaktualizowano ostrzeżenia o zagrożeniach. Na pierwszej stronie umieszczono symbol „Rx Only”. Dodano deklarację „Made in”. Zaktualizowano część dotyczącą znaków towarowych i patentów. Zaktualizowano adresy dystrybutorów. Zaktualizowano stronę z ujednoliconymi symbolami. W razie jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt z lokalnym przedstawicielem firmy Roche.