

## **cobas**<sup>®</sup> **EBV**

---

### **Test quantitatif des acides nucléiques à utiliser avec les cobas<sup>®</sup> 6800/8800 Systems**

*Destiné au diagnostic in vitro*

<b>cobas<sup>®</sup> EBV</b>	P/N: 08688206190
<b>cobas<sup>®</sup> EBV/BKV Control Kit</b>	P/N: 08688214190
<b>cobas<sup>®</sup> Buffer Negative Control Kit</b>	P/N: 07002238190

# Table des matières

<b>Usage prévu .....</b>	<b>4</b>
<b>Résumé et explication du test.....</b>	<b>4</b>
<b>Réactifs et matériel.....</b>	<b>7</b>
Réactifs et contrôles cobas® EBV .....	7
Réactifs cobas omni pour préparation des échantillons .....	10
Conditions de manipulation et de stockage des réactifs .....	11
Matériel supplémentaire nécessaire .....	12
Instruments et logiciels nécessaires.....	12
<b>Précautions et conditions de manipulation .....</b>	<b>13</b>
Avertissements et précautions.....	13
Manipulation des réactifs.....	13
Bonnes pratiques de laboratoire.....	14
<b>Prélèvement, transport et conservation des échantillons .....</b>	<b>14</b>
Échantillons.....	15
<b>Instructions d'utilisation .....</b>	<b>16</b>
Notes de procédure .....	16
Exécution du test cobas® EBV .....	16
<b>Résultats .....</b>	<b>17</b>
Contrôle qualité et validité des résultats.....	17
Interprétation des résultats.....	18
Limites du test.....	18

---

<b>Évaluation des performances non cliniques .....</b>	<b>19</b>
Caractéristiques clés des performances .....	19
Limite de détection (LoD) .....	19
Domaine de linéarité.....	20
Précision intra-laboratoire .....	21
Inclusivité.....	21
Spécificité .....	22
Spécificité analytique .....	22
Spécificité analytique - substances interférentes.....	23
Corrélation de la méthode.....	23
Échec complet du système.....	24
Contamination croisée.....	24
<b>Informations supplémentaires .....</b>	<b>25</b>
Caractéristiques clés du test.....	25
Symboles.....	26
Fabricant et distributeurs.....	27
Marques commerciales et brevets .....	27
Copyright .....	27
Références .....	28
Révision du document .....	30

## Usage prévu

Le test **cobas**® EBV est un test *in vitro* d'amplification des acides nucléiques pour le dosage quantitatif de l'ADN du virus d'Epstein-Barr (EBV) dans le plasma EDTA humain.

Le test **cobas**® EBV est destiné à contribuer au diagnostic et au traitement de l'EBV chez les patients receveurs de greffe. Pour les patients sous surveillance de l'EBV, des mesures d'ADN en série peuvent être effectuées pour indiquer le besoin d'éventuels changements de traitement et pour évaluer la réponse virale au traitement.

Les résultats du test **cobas**® EBV doivent être interprétés en tenant compte de tous les résultats cliniques et de laboratoire pertinents.

## Résumé et explication du test

### Contexte

Les receveurs de greffe encourent un risque accru de nombreuses infections virales et bactériennes qui sont plus susceptibles de provoquer de graves effets néfastes sur la santé de la population des receveurs de greffe que sur celle de la population générale en bonne santé. Ce risque accru est en partie dû aux fonctions diminuées du système immunitaire en raison des médicaments immunosuppresseurs que prennent les patients receveurs de greffe pour réduire la probabilité de rejet du greffon.<sup>1,2</sup>

L'EBV appartient à la famille des herpèsvirus. C'est un virus à acide désoxyribonucléique (ADN) enveloppé double brin (~172 kb). Deux génotypes principaux de l'EBV, le type 1 et le type 2, ont été définis grâce aux différences au niveau du gène EBNA-2. Les infections à l'EBV sont assez fréquentes chez l'humain ; plus de 90 % des adultes sont infectés et cette infection latente persiste tout au long de la vie. L'EBV est responsable de la mononucléose infectieuse dans un sous-ensemble d'adolescents et d'adultes nouvellement infectés et il est associé à plusieurs types de cancer, comme le carcinome du nasopharynx, le lymphome de Burkitt ou le lymphome de Hodgkin. L'EBV peut être responsable de syndromes lymphoprolifératifs chez les personnes atteintes d'immunodéficience congénitale ou acquise, comme par exemple les receveurs de greffe et les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine/du syndrome d'immunodéficience acquise (VIH/SIDA).<sup>3</sup>

Chez les receveurs de greffe, l'EBV peut provoquer une maladie soit par réactivation d'un virus latent dans les lymphocytes B à mémoire, soit par le biais d'une nouvelle infection primaire, particulièrement chez les patients négatifs pour l'EBV recevant un greffon de la part d'un donneur positif pour l'EBV.<sup>3</sup> Chez ces patients, la forme la plus sévère de maladie liée à l'EBV est la lymphoprolifération post-transplantation (LPT), qui résulte d'une prolifération incontrôlée des lymphocytes, typiquement les lymphocytes B.<sup>4</sup> Globalement, plus de 70 % des cas de LPT parmi les receveurs de greffe sont liés à une infection à l'EBV. Le risque le plus élevé de LPT survient au cours de la première année suivant la transplantation, et plus de 90 % des cas de LPT se déclarant pendant cette période sont liés à l'EBV. Jusqu'à 20 % des cas de LPT se déclarant après la première année post-transplantation sont négatifs pour l'EBV.<sup>4,5</sup>

Les facteurs de risque pour la LPT précoce comprennent le statut sérologique du patient négatif pour l'EBV au moment de la transplantation, la jeunesse, l'exposition à des anticorps responsables d'une déplétion des lymphocytes, et le type d'organe transplanté.<sup>5,6</sup>

Une identification précoce des infections primaires à l'EBV ainsi qu'une surveillance du niveau d'ADN peuvent favoriser une intervention thérapeutique rapide pour prévenir l'évolution vers une maladie liée à l'EBV. Les directives recommandent une surveillance régulière de l'EBV à l'aide de tests d'amplification des acides nucléiques (NAT), en particulier chez les patients receveurs de greffe à haut risque qui sont négatifs pour l'EBV.<sup>4,5</sup> Bien que le seuil viral médicalement pertinent exact soit toujours sujet à débat en raison de la variabilité inter-analyse, le concept de seuil critique semble valide et a été rapporté dans des études de l'histoire naturelle démontrant que des niveaux élevés d'ADN de l'EBV sont corrélés à un risque accru de développement de maladie à l'EBV et de la LPT.<sup>4,5,7</sup> Des échantillons de plasma et de sang total ont été utilisés pour le test EBV, mais les données indiquent que le plasma est plus spécifique pour la détection de la LPT.<sup>4,5,7,8</sup>

Les interventions thérapeutiques courantes destinées à réduire les niveaux d'ADN de l'EBV et à prévenir l'apparition de la LPT comprennent une réduction des doses de médicaments immunosuppresseurs et du traitement aux anticorps responsables d'une déplétion des lymphocytes B.<sup>7</sup> Le traitement préventif pour réduire les niveaux d'ADN de l'EBV est efficace chez la plupart des patients ; cependant, jusqu'à 20 % des patients peuvent toujours développer la LPT, en particulier ceux qui ont reçu une greffe il y a plus d'un an.<sup>7</sup>

La plupart des tests de laboratoire pour le dosage quantitatif de l'EBV ne sont pas standardisés, ce qui a entraîné une variabilité inter-laboratoire et inter-analyse des résultats des niveaux d'ADN et empêche la comparaison des niveaux d'ADN générés par différents laboratoires et tests.<sup>7</sup> Pour répondre à ce problème, l'OMS a créé un standard international pour le dosage quantitatif de l'EBV, permettant aux tests standardisés d'être rapportés en UI/mL.<sup>9</sup> Une évaluation formelle de la reproductibilité et de la validité des niveaux d'ADN de l'EBV est essentielle pour assurer des résultats cohérents dans tous les laboratoires, afin d'améliorer le traitement clinique des patients présentant un risque accru de développer des maladies liées à l'EBV ainsi que la LTD.

## **Pourquoi employer les tests d'amplification génétique ?**

La sérologie EBV du donneur et du receveur est déterminée avant la transplantation pour aider à déterminer le risque de complications liées à l'EBV d'un patient receveur de greffe, mais la sérologie n'est pas suffisamment sensible ou précise pour surveiller les patients après la transplantation. Les méthodes de culture de l'EBV sont lentes et présentent une faible valeur prédictive dans cette configuration. La détection directe de l'ADN de l'EBV par PCR en temps réel peut offrir un large domaine de linéarité, ainsi qu'une précision, une sensibilité et une spécificité élevées.

## **Explication du test**

Le test **cobas**® EBV est un test quantitatif exécuté sur le **cobas**® 6800 System et le **cobas**® 8800 System. Le test **cobas**® EBV permet la détection et la quantification de l'ADN de l'EBV dans le plasma EDTA de patients infectés. La charge virale est quantifiée par rapport à un standard de quantification d'ADN non-EBV (QS-ADN), qui est introduit dans chaque échantillon lors du traitement des échantillons. Le QS-ADN permet également de surveiller l'ensemble du processus de préparation des échantillons et d'amplification par PCR. En outre, le test utilise trois contrôles : un contrôle positif de titre élevé, un contrôle positif de titre faible et un contrôle négatif.

## Principes de la procédure

Le test **cobas**® EBV repose sur la préparation entièrement automatisée des échantillons (extraction et purification des acides nucléiques) suivie de l'amplification par PCR et de la détection. Les **cobas**® 6800/8800 Systems sont composés du module de chargement des échantillons, du module de transfert, du module de traitement et du module analytique. La gestion automatisée des données est réalisée par le logiciel **cobas**® 6800/8800, lequel attribue à chaque test l'un des résultats suivants : cible non détectée, ADN de l'EBV détecté < LLoQ (limite de quantification inférieure), ADN de l'EBV détecté > ULoQ (limite de quantification supérieure) ou valeur dans le domaine de linéarité  $LLoQ < x < ULoQ$ . Les résultats peuvent être consultés directement sur l'écran du système, exportés ou imprimés sous forme de rapports.

Les acides nucléiques des échantillons de patient et des molécules de QS-ADN lambda ajoutées sont extraits simultanément. L'acide nucléique viral est libéré par l'ajout de protéinase et de réactif de lyse à l'échantillon. L'acide nucléique libéré se lie à la surface des particules magnétiques de verre (silice) ajoutées. Les substances non liées et les impuretés, telles que les protéines dénaturées, les débris cellulaires et les inhibiteurs potentiels de PCR, sont éliminées lors d'étapes suivantes utilisant des réactifs de lavage, et l'acide nucléique purifié est séparé des particules de verre à l'aide d'un tampon d'élution à température élevée.

L'amplification sélective de l'acide nucléique cible dans l'échantillon est effectuée à l'aide d'une approche double-cible spécifique au virus dans des régions hautement conservées de l'EBV, situées dans le gène EBNA-1 de l'EBV et le gène BMRF de l'EBV. L'amplification sélective du QS-ADN est effectuée à l'aide d'amorces sens et antisens spécifiques à la séquence, sélectionnées de manière à ne présenter aucune homologie avec le génome de l'EBV. Une enzyme ADN polymérase thermostable est utilisée pour l'amplification. Les séquences cibles et QS-ADN sont amplifiées simultanément à l'aide d'un profil d'amplification par PCR universel composé de paliers de température et d'un nombre de cycles prédéfinis. Le master mix comprend de la désoxyuridine triphosphate (dUTP) à la place de la désoxythymidine triphosphate (dTTP), laquelle est incorporée dans l'ADN nouvellement synthétisé (amplicon).<sup>10-12</sup> Tout amplicon contaminant provenant de runs de PCR précédents est éliminé par l'enzyme AmpErase, incluse dans le mélange de PCR, lorsqu'il est chauffé au cours de la première étape de thermocyclage. Toutefois, les amplicons nouvellement formés ne sont pas éliminés car l'enzyme AmpErase est désactivée une fois exposée à une température supérieure à 55 °C.

Le master mix de **cobas**® EBV contient deux sondes de détection spécifiques aux séquences cibles de l'EBV et une sonde spécifique au QS-ADN. Les sondes sont marquées au moyen de fluorophores rapporteurs spécifiques des cibles permettant la détection simultanée de cible de EBV et de QS-ADN dans deux canaux cibles différents.<sup>13,14</sup> Le signal fluorescent des sondes intactes est supprimé par le fluorophore quencher. Lors de l'étape d'amplification par PCR, l'hybridation de la sonde aux matrices d'ADN monocaténaire spécifiques entraîne un clivage par l'activité nucléase 5' à 3' de l'ADN polymérase, ce qui conduit à une séparation du fluorophore rapporteur et du fluorophore quencher et à la génération d'un signal fluorescent. À chaque cycle PCR, des quantités croissantes de sondes clivées sont générées et le signal cumulatif du fluorophore rapporteur est intensifié simultanément. La détection et la discrimination en temps réel des produits PCR sont effectuées en mesurant la fluorescence des fluorophores rapporteurs libérés pour les cibles virales et le QS-ADN.

# Réactifs et matériel

## Réactifs et contrôles cobas® EBV

Tout réactif ou contrôle non ouvert doit être stocké conformément aux recommandations du Tableau 1 au Tableau 4.

**Tableau 1** cobas® EBV

<b>cobas® EBV</b> Conserver à 2-8 °C Cassette de 192 tests (P/N 08688206190)		
<b>Composants du kit</b>	<b>Ingrédients du réactif</b>	<b>Quantité par kit 192 tests</b>
<b>Solution de protéinase (PASE)</b>	Tampon Tris, < 0,05 % d'EDTA, chlorure de calcium, acétate de calcium, 8 % de protéinase  EUH210 : fiche de données de sécurité disponible sur demande. EUH208 : contient de la subtilisine. peut produire une réaction allergique.	22,3 mL
<b>Standard de quantification d'ADN (DNA QS)</b>	Tampon Tris, < 0,05 % d'EDTA, < 0,001 % de construction d'ADN non-EBV contenant un site de liaison aux amorces non-EBV et un site unique de liaison à la sonde (ADN non infectieux), < 0,002 % d'ARN Poly rA (synthétique), < 0,1 % d'azoture de sodium	21,2 mL
<b>Tampon d'éluion (EB)</b>	Tampon Tris, 0,2 % de 4-hydroxybenzoate de méthyle	21,2 mL
<b>Réactif 1 de master mix (MMX-R1)</b>	Acétate de manganèse, hydroxyde de potassium, < 0,1 % d'azoture de sodium	7,5 mL
<b>Réactif 2 du master mix EBV (EBV MMX-R2)</b>	Tampon de tricine, acétate de potassium, < 18 % de sulfoxyde de diméthyle, glycérol, < 0,1 % de Tween 20, EDTA, < 0,12 % de dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01 % d'amorces d'amont et d'aval d'EBV, < 0,01 % d'amorces sens et antisens de standard de quantification, < 0,01 % de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence spécifiques à l'EBV et au standard de quantification de l'EBV, < 0,01 % d'aptamère d'oligonucléotide, < 0,1 % d'ADN polymérase Z05D, < 0,10 % d'enzyme (microbienne) AmpErase (uracil-N-glycosylase), < 0,1 % d'azoture de sodium	9,7 mL

Tableau 2 cobas® EBV/BKV Control Kit

**cobas® EBV/BKV Control Kit**

Conserver à 2-8 °C  
(P/N 08688214190)

Composants du kit	Ingrédients du réactif	Quantité par kit	Symboles de sécurité et avertissements*	
<b>Contrôle positif bas de EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C</b>	<p>&lt; 0,001 % d'ADN (plasmidique) synthétique d'EBV encapsulé dans la protéine d'enveloppe bactériophage lambda, plasma humain normal, ADN de l'EBV non détectable par les méthodes de PCR.</p> <p>0,1 % de conservateur ProClin® 300**</p>	4 mL (8 × 0,5 mL)		
			<p><b>AVERTISSEMENT</b></p> <p>H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.  P261 : éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.  P272 : Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.  P280 : Porter des gants de protection.  P333 + P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.  P362 + P364 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.  P501 : Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée.</p> <p>55965-84-9 Masse réactionnelle de : 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [n° CE 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [n° CE 220-239-6] (3:1)</p>	
<b>Contrôle positif haut de EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C</b>	<p>&lt; 0,001 % d'ADN (plasmidique) synthétique d'EBV encapsulé dans la protéine d'enveloppe bactériophage lambda, plasma humain normal, ADN de l'EBV non détectable par les méthodes de PCR.</p> <p>0,1 % de conservateur ProClin® 300**</p>	4 mL (8 × 0,5 mL)		
			<p><b>AVERTISSEMENT</b></p> <p>H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.  P261 : éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.  P272 : Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.  P280 : Porter des gants de protection.  P333 + P313 : En cas d'irritation ou d'éruption cutanée : consulter un médecin.  P362 + P364 : Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.  P501 : Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée.</p> <p>55965-84-9 Masse réactionnelle de : 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one [n° CE 247-500-7] et 2-méthyl-2H-isothiazol-3-one [n° CE 220-239-6] (3:1)</p>	

\* Les mentions de sécurité du produit sont conformes en premier lieu au SGH de l'UE.

\*\* Substance dangereuse.

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

Conserver à 2-8 °C  
(P/N 07002238190)

<b>Composants du kit</b>	<b>Ingrédients du réactif</b>	<b>Quantité par kit</b>
<b>cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)</b>	Tampon Tris, < 0,1 % d'azoture de sodium, EDTA, < 0,002 % d'ARN Poly rA (synthétique)	16 mL (16 × 1 mL)

## Réactifs cobas omni pour préparation des échantillons

Tableau 4 Réactifs **cobas omni** pour préparation des échantillons\*

Réactifs	Ingrédients du réactif	Quantité par kit	Symboles de sécurité et avertissements**
<b>cobas omni MGP Reagent (MGP)</b> Conserver à 2-8 °C (P/N : 06997546190)	Particules magnétiques de verre, tampon Tris, 0,1 % de 4-hydroxybenzoate de méthyle, < 0,1 % d'azoture de sodium	480 tests	Non applicable
<b>cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL)</b> Conserver à 2-8 °C (P/N : 06997511190)	Tampon Tris, 0,1 % de 4-hydroxybenzoate de méthyle, < 0,1 % d'azoture de sodium	4 × 875 mL	Non applicable
<b>cobas omni Lysis Reagent (LYS)</b> Conserver à 2-8 °C (P/N : 06997538190)	43 % (m/m) de thiocyanate de guanidinium***, 5 % (m/v) de polidocanol***, 2 % (m/v) de dithiothréitol***, citrate de sodium dihydraté	4 × 875 mL	 <p><b>DANGER</b></p> <p>H302 + H332 : Nocif en cas d'ingestion ou par inhalation. H314 : Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. EUH032 : Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique. P261 : Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P273 : Éviter le rejet dans l'environnement. P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage. P303 + P361 + P353 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau. P304 + P340 + P310 EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin. P305 + P351 + P338 + P310 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin.</p> <p>593-84-0 Thiocyanate de guanidinium 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutane-2,3-diol</p>
<b>cobas omni Wash Reagent (WASH)</b> Conserver à 15-30 °C (P/N : 06997503190)	Citrate de sodium dihydraté, 0,1 % de 4-hydroxybenzoate de méthyle	4,2 L	Non applicable

\* Ces réactifs ne sont pas inclus dans le kit de test **cobas® EBV**. Voir la liste du matériel supplémentaire nécessaire (Tableau 7).

\*\* Les mentions de sécurité du produit sont conformes en premier lieu au SGH de l'UE.

\*\*\* Substance dangereuse.

## Conditions de manipulation et de stockage des réactifs

Les réactifs doivent être stockés et manipulés comme spécifié dans le Tableau 5 et le Tableau 6.

Lorsque les réactifs ne sont pas chargés sur les cobas® 6800/8800 Systems, ils doivent être stockés à la température spécifiée dans le Tableau 5.

**Tableau 5** Stockage des réactifs (lorsque le réactif n'est pas sur le système)

Réactif	Température de stockage
cobas® EBV – 192	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

Les réactifs chargés sur les cobas® 6800/8800 Systems sont stockés à des températures appropriées et leur date de péremption est surveillée par le système. Les cobas® 6800/8800 Systems ne permettent l'utilisation des réactifs que si toutes les conditions indiquées dans le Tableau 6 sont remplies. Le système empêche automatiquement l'utilisation de réactifs périmés. Le Tableau 6 permet à l'utilisateur de comprendre les conditions de manipulation des réactifs appliquées par les cobas® 6800/8800 Systems.

**Tableau 6** Conditions de péremption des réactifs appliquées par les cobas® 6800/8800 Systems

Réactif	Date de péremption du kit	Stabilité de kit ouvert	Nombre de runs possibles avec ce kit	Stabilité à bord (cumul du temps à bord, en dehors du réfrigérateur)
cobas® EBV – 192	Date non passée	90 jours à partir de la première utilisation	40 runs max.	40 heures max.
cobas® EBV/BKV Control Kit	Date non passée	Non applicable <sup>a</sup>	Non applicable	8 heures max.
cobas® Buffer Negative Control Kit	Date non passée	Non applicable <sup>a</sup>	Non applicable	10 heures max.
cobas omni Lysis Reagent	Date non passée	30 jours à partir du chargement*	Non applicable	Non applicable
cobas omni MGP Reagent	Date non passée	30 jours à partir du chargement*	Non applicable	Non applicable
cobas omni Specimen Diluent	Date non passée	30 jours à partir du chargement*	Non applicable	Non applicable
cobas omni Wash Reagent	Date non passée	30 jours à partir du chargement*	Non applicable	Non applicable

<sup>a</sup> Réactifs à usage unique.

\* Durée mesurée à partir du premier chargement du réactif sur les cobas® 6800/8800 Systems.

## Matériel supplémentaire nécessaire

**Tableau 7** Matériel et consommables à utiliser sur les **cobas®** 6800/8800 Systems

Matériel	P/N
<b>cobas omni</b> Processing Plate	05534917001
<b>cobas omni</b> Amplification Plate	05534941001
<b>cobas omni</b> Pipette Tips	05534925001
<b>cobas omni</b> Liquid Waste Container	07094388001
<b>cobas omni</b> Lysis Reagent	06997538190
<b>cobas omni</b> MGP Reagent	06997546190
<b>cobas omni</b> Specimen Diluent	06997511190
<b>cobas omni</b> Wash Reagent	06997503190
Sac à déchets solides	07435967001
Sac à déchets solides et réservoir à déchets solides ou	07435967001 et 07094361001 ou
Sac à déchets solides avec insert et kit tiroir	08030073001 et 08387281001
Réservoir à déchets solides	07094361001
Tubes secondaires <b>cobas omni</b> 13 × 75 (en option)	06438776001

## Instruments et logiciels nécessaires

Le logiciel **cobas®** 6800/8800 et les fichiers d'analyse **cobas®** EBV doivent être installés sur le ou les instrument(s).  
Le serveur IG (Instrument Gateway) est livré avec le système.

**Tableau 8** Instruments

Équipement	P/N
<b>cobas®</b> 6800 System (version mobile)	06379672001
<b>cobas®</b> 6800 System (fixe)	05524245001
<b>cobas®</b> 8800 System	05412722001
Module de chargement des échantillons	06301037001

Pour obtenir plus d'informations, veuillez consulter l'Assistance Utilisateur et/ou le guide de l'utilisateur des **cobas®** 6800/8800 Systems.

Remarque : contacter le représentant Roche local pour obtenir une liste détaillée de références de racks échantillons, racks pour embouts à filtre et plateaux de racks acceptés sur les instruments.

# Précautions et conditions de manipulation

## Avertissements et précautions

Comme pour le déroulement de tout test, de bonnes pratiques de laboratoire sont indispensables pour assurer la qualité de cette analyse. Du fait de la sensibilité élevée de ce test, il est indispensable d'éviter toute contamination des réactifs et des mélanges d'amplification.

- Destiné uniquement au diagnostic *in vitro*.
- L'utilisation du test **cobas® EBV** en tant que test de dépistage de l'EBV dans le sang ou les produits sanguins n'a pas été évaluée.
- Tous les échantillons de patient doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, telles que celles mentionnées dans Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories ainsi que dans le document M29-A4 du CLSI.<sup>15, 16</sup> Seul le personnel expert dans la manipulation du matériel présentant un risque biologique ainsi que dans l'utilisation du test **cobas® EBV** et des **cobas® 6800/8800 Systems** doit effectuer cette procédure.
- Tout produit d'origine humaine doit être considéré comme potentiellement infectieux et doit être manipulé selon les précautions universelles. En cas d'éclaboussures, désinfecter immédiatement avec une solution fraîchement préparée contenant 0,5 % d'hypochlorite de sodium dans de l'eau distillée ou déionisée (eau de javel ménagère diluée à 1:10) ou suivre les procédures locales appropriées.
- Le **cobas® EBV/BKV Control Kit** contient du plasma dérivé de sang humain. Le matériel source a été testé par les méthodes de PCR et a montré des traces acceptables de faibles niveaux d'ADN de l'EBV. Toutefois, aucune méthode de test connue ne peut garantir avec une certitude absolue que des produits dérivés de sang humain sont exempts de tout risque de transmission d'agents infectieux.
- **Ne pas congeler le sang total ni tout échantillon stocké dans des tubes primaires.**
- Utiliser uniquement les consommables nécessaires fournis ou indiqués afin d'assurer des performances de test optimales.
- Les fiches de sécurité (ou SDS pour Safety Data Sheets) sont disponibles sur demande auprès de votre représentant Roche local.
- Suivre rigoureusement les procédures et les directives fournies pour assurer le bon déroulement du test. Toute déviation des procédures et directives peut affecter les performances du test.
- Il existe un risque de faux positifs si la contamination croisée des échantillons n'est pas correctement contrôlée lors de la manipulation et du traitement des échantillons.
- Étant donné que plus de 90 % des adultes sont des porteurs chroniques d'EBV qui peuvent abriter plus de  $10^8$  copies/mL d'EBV dans leur salive, et au vu de la sensibilité élevée du test, il est important de mettre en place des mesures adéquates de contrôle de la contamination dans les laboratoires.<sup>17</sup>

## Manipulation des réactifs

- Manipuler tous les réactifs, contrôles et échantillons selon les bonnes pratiques de laboratoire afin d'éviter une contamination croisée des échantillons ou des contrôles.
- Avant utilisation, inspecter visuellement chaque cassette de réactifs, diluant, réactif de lyse et réactif de lavage pour détecter tout signe de fuite. En présence de fuite, ne pas utiliser ce matériel pour le test.

- Le **cobas omni** Lysis Reagent contient du thiocyanate de guanidine, un produit chimique dangereux. Éviter tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment à l'eau. Il existe sinon un risque de brûlure.
- Les kits de test **cobas**® EBV, le **cobas omni** MGP Reagent et le **cobas omni** Specimen Diluent contiennent de l'azotate de sodium en tant que conservateur. Éviter tout contact des réactifs avec la peau, les yeux ou les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement et abondamment à l'eau. Il existe sinon un risque de brûlure. Si ces réactifs sont renversés, diluer avec de l'eau avant d'essuyer.
- Éviter tout contact entre le **cobas omni** Lysis Reagent, qui contient du thiocyanate de guanidine, et la solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel). Le mélange peut produire un gaz extrêmement toxique.
- Jeter tout le matériel qui a été en contact avec les échantillons et réactifs conformément à la réglementation nationale, fédérale, régionale et locale.

## Bonnes pratiques de laboratoire

- Ne pas pipeter à la bouche.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées.
- Porter des gants de laboratoire, une blouse de laboratoire et des lunettes de protection lors de la manipulation d'échantillons et de réactifs. Afin d'éviter toute contamination, les gants doivent être changés entre la manipulation d'échantillons et la manipulation de réactifs des kits de test **cobas**® EBV, de contrôle positif bas de EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C), de contrôle positif haut de EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C), des **cobas**® Buffer Negative Control (eBUF (-)) C) et **cobas omni**. Éviter la contamination des gants lors de la manipulation des échantillons et des contrôles.
- Bien se laver les mains après la manipulation d'échantillons et de réactifs de test, et après le retrait des gants.
- Nettoyer et désinfecter soigneusement tous les plans de travail du laboratoire avec une solution fraîchement préparée d'hypochlorite de sodium à 0,5 % dans de l'eau distillée ou déionisée (eau de javel ménagère diluée à 1:10), puis essuyer les surfaces avec de l'éthanol à 70 %.
- En cas d'éclaboussures sur les instruments **cobas**® 6800/8800, suivre les instructions de l'Assistance Utilisateur et/ou du guide de l'utilisateur des **cobas**® 6800/8800 Systems afin de nettoyer et de décontaminer correctement les surfaces du ou des instruments.

## Prélèvement, transport et conservation des échantillons

**Remarque :** manipuler tous les échantillons et contrôles comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux.

Conserver tous les échantillons aux températures indiquées.

La stabilité des échantillons est affectée par les températures élevées.

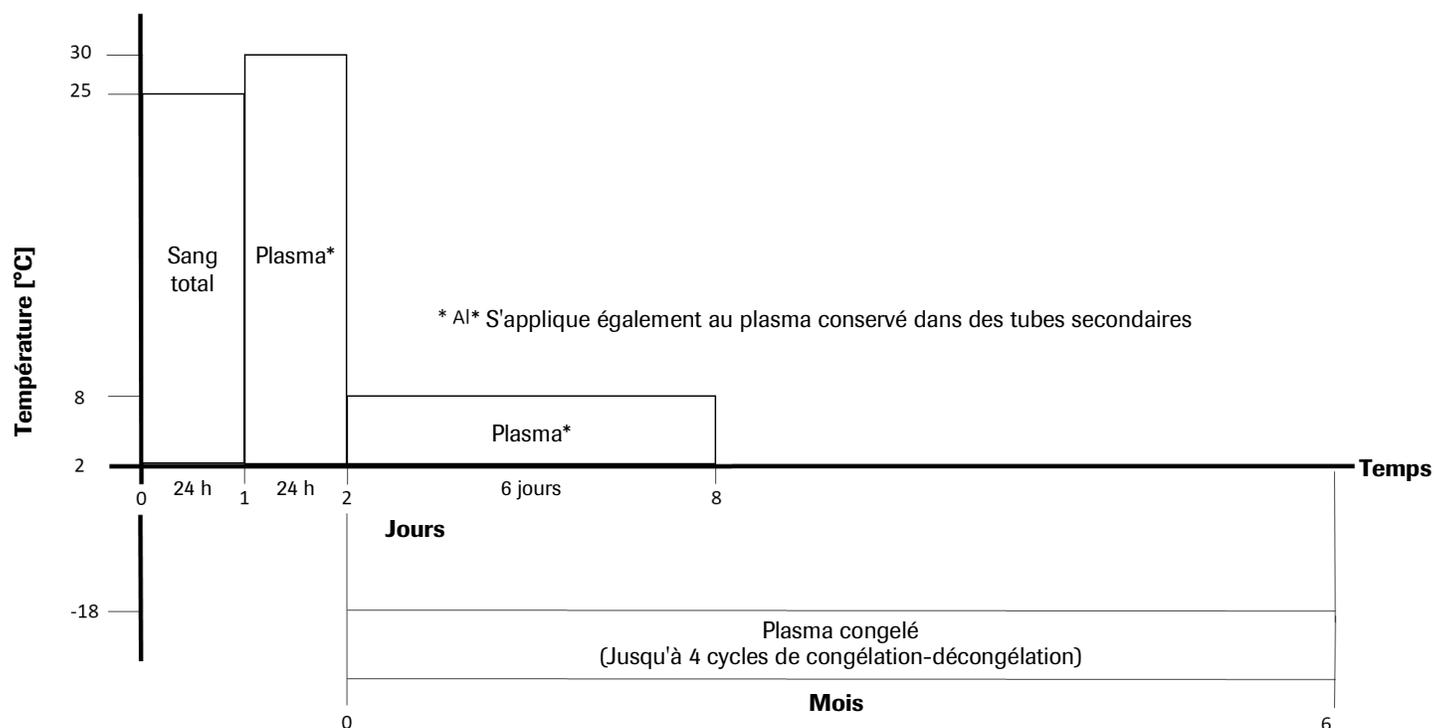
En cas d'utilisation d'échantillons congelés dans des tubes secondaires, mettre les échantillons à température ambiante (15 à 30 °C) jusqu'à ce qu'ils soient complètement décongelés, puis les mélanger brièvement (par exemple passer au vortex pendant 3 à 5 secondes) et les centrifuger pour regrouper le volume échantillon complet au fond du tube.

Après centrifugation, s'il existe une possibilité que des cellules aient été remises en suspension dans le plasma, envisager une recentrifugation avant d'effectuer le traitement sur l'instrument.

## Échantillons

- Le sang total doit être prélevé dans des tubes de préparation du plasma BD Vacutainer® PPT™ pour les méthodes de tests de diagnostic moléculaire ou dans des tubes stériles avec de l'EDTA comme anticoagulant. Suivre les instructions du fabricant des tubes de prélèvement d'échantillons. Consulter la Figure 1.
- Le sang total prélevé dans des tubes de préparation du plasma BD Vacutainer® PPT™ pour les méthodes de tests de diagnostic moléculaire ou dans des tubes stériles avec de l'EDTA comme anticoagulant peut être conservé et/ou transporté à une température comprise entre 2 °C et 25 °C pendant 24 heures au maximum avant la préparation du plasma. La centrifugation doit être effectuée conformément aux instructions du fabricant.
- Après la séparation, les échantillons de plasma peuvent être conservés dans des tubes primaires ou secondaires pendant 24 heures à une température comprise entre 2 °C et 30 °C, puis :
  - Conservation dans des tubes primaires ou secondaires pendant une durée maximale de 6 jours à une température comprise entre 2 et 8 °C.
  - Conservation dans des tubes secondaires pendant une durée maximale de 6 mois à une température  $\leq -18$  °C.
- Les échantillons de plasma sont stables pendant un maximum de quatre cycles de congélation/décongélation lorsqu'ils sont conservés à  $\leq -18$  °C.

**Figure 1** Conditions de stockage des échantillons



- Si les échantillons sont expédiés, ils doivent être emballés et étiquetés conformément aux réglementations nationales et internationales sur le transport d'échantillons et d'agents étiologiques.

# Instructions d'utilisation

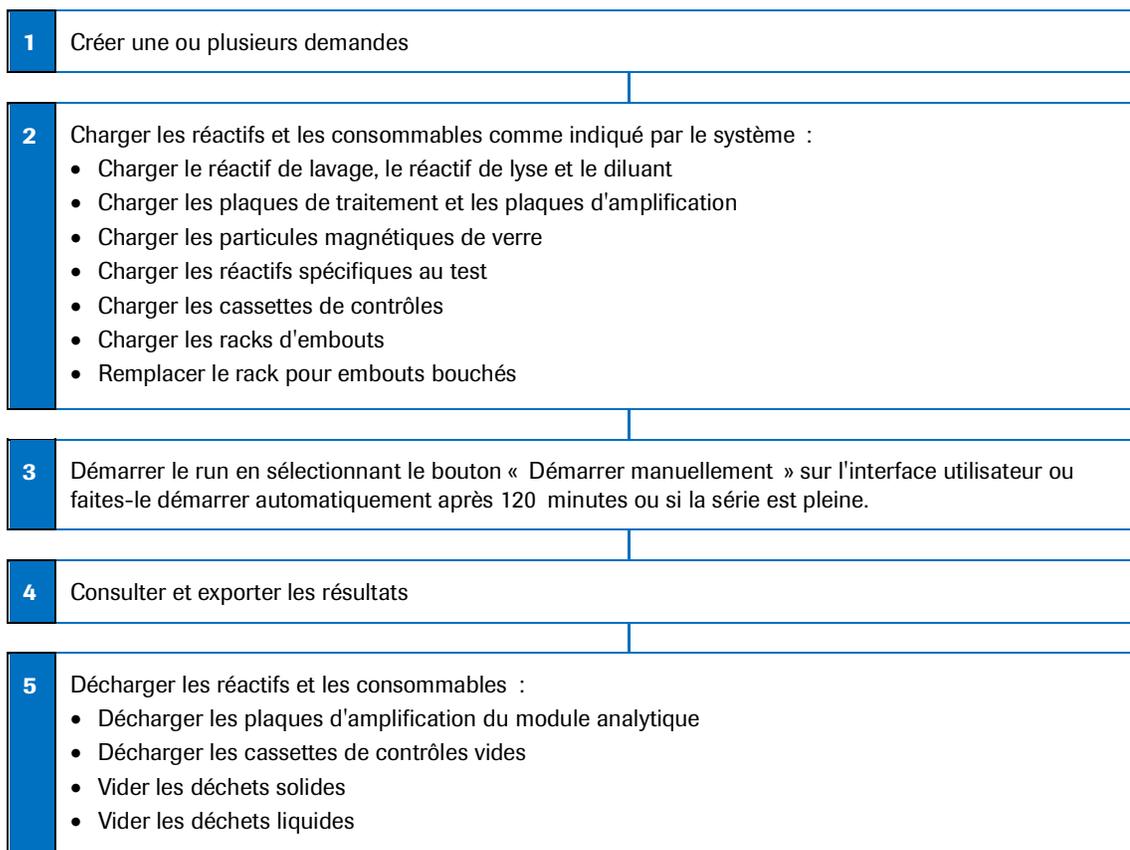
## Notes de procédure

- Ne pas utiliser les réactifs du test **cobas® EBV**, du **cobas® EBV/BKV Control Kit**, du **cobas® Buffer Negative Control Kit**, ni les réactifs **cobas omni** après leur date de péremption.
- Ne pas réutiliser les consommables. Ils sont destinés à un usage unique.
- Se reporter à l'Assistance Utilisateur et/ou au guide de l'utilisateur des **cobas® 6800/8800 Systems** pour obtenir des informations sur la bonne maintenance des instruments.

## Exécution du test **cobas® EBV**

Le test **cobas® EBV** peut être exécuté avec un volume d'échantillon requis de 200 µL. La procédure de test est décrite en détail dans l'Assistance Utilisateur et/ou le guide de l'utilisateur des **cobas® 6800/8800 Systems**. La Figure 2 ci-dessous résume la procédure.

**Figure 2** Procédure de **cobas® EBV**



## Résultats

Les cobas® 6800/8800 Systems déterminent automatiquement la concentration de l'ADN de l'EBV dans les échantillons et les contrôles. La concentration d'ADN de l'EBV est exprimée en Unités Internationales par millilitre (UI/mL).

### Contrôle qualité et validité des résultats

- Un contrôle négatif [(-) C] et deux contrôles positifs, un contrôle positif bas [EBV/BKV L(+)C] et un contrôle positif haut [EBV/BKV H(+)C], sont traités avec chaque série.
- Dans le logiciel cobas® 6800/8800 et/ou dans le rapport, consulter les alertes et les résultats associés pour s'assurer de la validité de la série.
- La série est valide si aucune alerte n'apparaît pour les trois contrôles, constitués d'un contrôle négatif et de deux contrôles positifs : EBV L(+)C, EBV H(+)C. Dans les résultats, le contrôle négatif s'affiche sous la forme (-) C et les contrôles positifs bas et haut s'affichent sous la forme EBV/BKV L(+)C et EBV/BKV H(+)C.

L'invalidation des résultats est effectuée automatiquement par le logiciel cobas® 6800/8800 en fonction des échecs des contrôles négatifs et positifs.

### Alertes de contrôle

**Tableau 9** Alertes de contrôle pour les contrôles négatifs et positifs

Contrôle négatif	Alerte	Résultat	Interprétation
(-) C	Q02 (Échec de la série de contrôle)	Invalid	Résultat invalide ou le résultat de titre calculé pour le contrôle négatif n'est pas négatif.
Contrôle positif	Alerte	Résultat	Interprétation
EBV/BKV L(+)C	Q02 (Échec de la série de contrôle)	Invalid	Résultat invalide ou le résultat d'un titre calculé pour le contrôle faiblement positif se situe en dehors du domaine théorique.
EBV/BKV H(+)C	Q02 (Échec de la série de contrôle)	Invalid	Résultat invalide ou le résultat d'un titre calculé pour le contrôle fortement positif se situe en dehors du domaine théorique.

Si la série de contrôle est invalide, retester tous les échantillons de la série affectée.

## Interprétation des résultats

Pour une série valide, vérifier l'absence d'alerte pour chaque échantillon individuel dans le logiciel **cobas**® 6800/8800 et/ou dans le rapport. Les résultats doivent être interprétés comme suit :

- une série valide peut comporter des résultats d'échantillon valides et invalides.

**Tableau 10** Résultats cibles pour l'interprétation des résultats cibles individuels

Résultats	Interprétation
Target Not Detected	ADN de l'EBV non détecté. Enregistrer les résultats comme suit : « EBV non détecté ».
< Titer Min <sup>a</sup>	Le titre calculé se situe sous la limite de quantification inférieure (LLoQ) du test. Enregistrer les résultats comme suit : « EBV détecté, inférieur à (titre min) ». Titre min = 35,0 UI/mL
Titer	Le titre calculé se situe dans le domaine de linéarité du test : supérieur ou égal au titre min. et inférieur ou égal au titre max. Enregistrer les résultats comme suit : « (Titre) d'EBV détecté ».
> Titer Max <sup>b</sup>	Le titre calculé se situe au-dessus de la limite de quantification supérieure (ULoQ) du test. Enregistrer les résultats comme suit : « EBV détecté, supérieur à (titre max) ». Titre max = 1,0E+08 UI/mL

<sup>a</sup> Des résultats d'échantillons « < Titer Min » (cible détectée < LLoQ) doivent être interprétés en tenant compte des autres données cliniques et ne doivent pas constituer le seul critère sur lequel fonder une décision de traitement.

<sup>b</sup> Un résultat d'échantillon « > Titer Max » correspond à des échantillons positifs pour l'EBV dont les titres sont supérieurs à la limite supérieure de quantification (ULoQ). Si l'on désire obtenir un résultat quantitatif, l'échantillon d'origine doit être dilué dans du plasma humain prélevé sur EDTA négatif pour l'EBV et l'analyse doit être répétée. Multiplier le résultat enregistré par le coefficient de dilution.

## Limites du test

- Le test **cobas**® EBV a été évalué uniquement pour être utilisé conjointement au **cobas**® EBV/BKV Control Kit, au **cobas**® Buffer Negative Control Kit, au **cobas omni** MGP Reagent, au **cobas omni** Lysis Reagent, au **cobas omni** Specimen Diluent et au **cobas omni** Wash Reagent sur les **cobas**® 6800/8800 Systems.
- La fiabilité des résultats dépend du suivi correct des procédures de prélèvement, stockage et manipulation des échantillons.
- Ce test a été validé pour être utilisé exclusivement avec du plasma EDTA. L'analyse d'autres types d'échantillons avec le test **cobas**® EBV peut aboutir à des résultats inexacts. Les mesures de charge virale du plasma ne sont pas directement comparables à celles d'autres types d'échantillons.
- La quantification de l'ADN de l'EBV peut être affectée par les méthodes de collecte d'échantillons, les facteurs relatifs aux patients (c'est-à-dire l'âge, la présence de symptômes) et/ou le stade de l'infection.
- Comme pour tout test moléculaire, des mutations au niveau des régions cibles du test **cobas**® EBV peuvent affecter la liaison des amorces et/ou des sondes et entraîner une sous-quantification du virus ou l'échec de la détection du virus.
- En raison des différences inhérentes à chaque technologie, il est recommandé aux utilisateurs, avant de passer d'une technologie à l'autre, de mener des études de corrélation de méthodes au sein de leur laboratoire afin de caractériser les différences entre les diverses technologies. Les utilisateurs doivent suivre leurs propres politiques/procédures.
- Le test **cobas**® EBV n'est pas destiné au dépistage de l'EBV dans le sang ou les produits sanguins.

# Évaluation des performances non cliniques

## Caractéristiques clés des performances

### Limite de détection (LoD)

#### Standard international de l'OMS

La limite de détection du test cobas® EBV a été déterminée en analysant des dilutions en série du 1<sup>er</sup> standard international de l'OMS pour le virus d'Epstein-Barr pour les techniques d'amplification de l'acide nucléique (1<sup>er</sup> standard international de l'OMS pour l'EBV) obtenu auprès du NIBSC (NIBSC 09/260), dans du plasma EDTA humain négatif pour l'EBV. Des panels de six niveaux de concentration plus un échantillon blanc ont été testés sur trois lots de réactifs cobas® EBV, lors de plusieurs runs, pendant plusieurs jours, par plusieurs opérateurs et sur plusieurs instruments.

Les résultats obtenus pour le plasma EDTA sont indiqués du Tableau 11 au Tableau 13. Cette étude démontre qu'avec le lot le moins sensible, la concentration pour laquelle un taux de succès de 95 % est attendu avec PROBIT est de 18,8 UI/mL avec un intervalle de confiance à 95 % de 14,5 à 27,5 UI/mL dans du plasma EDTA. La concentration la plus faible avec un taux de succès  $\geq 95$  % est 20,0 UI/mL dans du plasma EDTA.

**Tableau 11** Limite de détection dans le plasma EDTA, lot 1

Concentration de titre d'entrée (ADN de l'EBV, UI/mL)	Nb de réplicats valides	Nombre de positifs	Taux de succès en %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	62	98,4
20,0	63	61	96,8
10,0	63	53	84,1
5,0	63	37	58,7
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
Limite de détection à un taux de succès de 95 % par PROBIT		18,8 UI/mL	
		Intervalle de confiance à 95 % : 14,5 à 27,5 UI/mL	

**Tableau 12** Limite de détection dans le plasma EDTA, lot 2

Concentration de titre d'entrée (ADN de l'EBV, UI/mL)	Nb de réplicats valides	Nombre de positifs	Taux de succès en %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	58	92,1
5,0	63	35	55,6
2,5	63	20	31,8
0,0	63	0	0,0
Limite de détection à un taux de succès de 95 % par PROBIT		12,4 UI/mL	
		Intervalle de confiance à 95 % : 10,0 à 17,0 UI/mL	

**Tableau 13** Limite de détection dans le plasma EDTA, lot 3

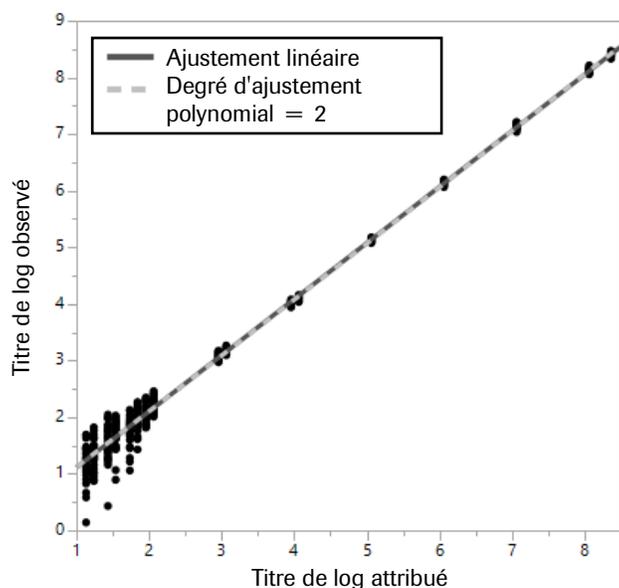
Concentration de titre d'entrée (ADN de l'EBV, UI/mL)	Nb de répliquats valides	Nombre de positifs	Taux de succès en %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	62	98,4
10,0	63	48	76,2
5,0	63	38	60,3
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
Limite de détection à un taux de succès de 95 % par PROBIT	18,6 UI/mL Intervalle de confiance à 95 % : 14,4 à 27,1 UI/mL		

## Domaine de linéarité

La linéarité du test **cobas**® EBV a été évaluée à l'aide d'une série de dilutions constituée de 17 membres de panel avec de l'ADN d'EBV, génotype 1, couvrant le domaine de linéarité du test. Un stock d'ADN lambda de titre élevé a été utilisé pour préparer 11 membres de panel couvrant l'ensemble du domaine de linéarité. Un échantillon clinique a été utilisé pour préparer 6 membres de panel couvrant les niveaux intermédiaire et inférieur du domaine de linéarité.

Chaque membre du panel a été testé en 36 répliquats sur trois lots de réactifs du test **cobas**® EBV et les résultats de l'étude sont présentés dans la Figure 3.

Il a été démontré que le test **cobas**® EBV est linéaire de  $1,40E+01$  UI/mL à  $2,30E+08$  UI/mL et présente une déviation absolue par rapport à la régression non linéaire de meilleur ajustement inférieure ou égale à  $\pm 0,1 \log_{10}$  dans le plasma EDTA humain (voir Figure 3). Dans le domaine de linéarité, l'exactitude du test se situait à  $\pm 0,2 \log_{10}$ .

**Figure 3** Détermination du domaine de linéarité dans le plasma EDTA

## Précision intra-laboratoire

La précision du test **cobas**® EBV a été déterminée en analysant des dilutions en série d'ADN de l'EBV de titre élevé (génotype 1) dans du plasma EDTA négatif pour l'EBV. Six niveaux de dilution ont été testés en 72 réplicats pour chaque niveau sur trois lots de réactifs du test **cobas**® EBV par trois opérateurs, sur trois instruments, pendant 12 jours. Chaque échantillon a subi la procédure entière du test **cobas**® EBV sur des **cobas**® 6800/8800 Systems entièrement automatisés. La précision indiquée plus bas prend donc en compte tous les aspects de la procédure de test. Les résultats sont présentés dans le Tableau 14.

Le test **cobas**® EBV a présenté une précision élevée pour trois lots de réactifs testés sur une plage de concentration de 1,08E+02 UI/mL à 5,40+07 UI/mL.

**Tableau 14** Précision intra-laboratoire du test **cobas**® EBV

Concentration nominale [UI/mL]	Concentration attribuée [UI/mL]	Plasma EDTA			
		Lot n° 1	Lot n° 2	Lot n° 3	Tous les lots
		DS	DS	DS	DS globale
5,00E+07	5,40E+07	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+06	1,08E+06	0,02	0,03	0,02	0,02
1,00E+05	1,08E+05	0,02	0,02	0,03	0,02
1,00E+04	1,08E+04	0,04	0,02	0,03	0,03
1,00E+03	1,08E+03	0,05	0,05	0,05	0,05
1,00E+02	1,08E+02	0,17	0,18	0,15	0,17

## Inclusivité

Les performances du test **cobas**® EBV sur le génotype 2 de l'EBV ont été évaluées par :

- Vérification de la limite de détection
- Vérification du domaine de linéarité

### Vérification de la limite de détection pour le génotype 2

L'ADN de l'EBV pour le génotype 2 a été dilué à trois niveaux de concentration différents dans du plasma EDTA négatif pour l'EBV. Le taux de succès a été déterminé avec 63 réplicats pour chaque niveau. Les tests ont été effectués avec trois lots de réactifs du test **cobas**® EBV, lors de plusieurs runs, pendant plusieurs jours, par plusieurs opérateurs et sur plusieurs instruments. Les résultats démontrent que le test **cobas**® EBV a détecté l'ADN de l'EBV pour le génotype 2 à une concentration de 18,8 UI/mL avec un taux de succès  $\geq 95$  %.

### Vérification du domaine de linéarité pour le génotype 2

La série de dilutions utilisée dans la vérification de l'étude de linéarité des génotypes du test **cobas**® EBV comprenait huit membres de panel couvrant le domaine de linéarité du test. Les tests ont été effectués avec trois lots de réactifs du test **cobas**® EBV ; 12 réplicats par niveau ont été testés dans du plasma EDTA.

Le domaine de linéarité du test **cobas**® EBV a été vérifié pour le génotype 2.

## Spécificité

La spécificité du test **cobas**® EBV a été déterminée en analysant des échantillons de plasma EDTA négatifs pour l'EBV issus de donneurs individuels. 101 échantillons de plasma EDTA individuels ont été testés avec trois lots de réactifs **cobas**® EBV. Tous les échantillons se sont révélés négatifs pour l'ADN de l'EBV. Dans le panel de test, la spécificité du test **cobas**® EBV était de 100 % (intervalle de confiance unilatéral à 95 % inférieur : 97,08 %).

## Spécificité analytique

La spécificité analytique du test **cobas**® EBV a été évaluée en diluant un panel de micro-organismes à une concentration de 1,00E+06 unités/mL (cellules/mL, UFC/mL, IFU/mL, UCC/mL) pour les bactéries et les levures, et entre 3,00E+05 et 1,00E+06 unités/mL (UI/mL, copies/mL, cellules/mL, DICT<sub>50</sub>/mL) pour les virus avec du plasma EDTA positif pour l'ADN de l'EBV et du plasma EDTA négatif pour l'ADN de l'EBV. Les organismes spécifiques testés sont répertoriés dans le Tableau 15. Chaque membre du panel a été évalué avec le test **cobas**® EBV. Aucun des agents pathogènes non EBV n'a provoqué d'interférence avec les performances du test.

**Tableau 15** Micro-organismes dont la réactivité croisée a été testée

<b>Virus</b>	<b>Bactéries</b>	<b>Levure</b>
Adénovirus type 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Polyomavirus BK	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Cytomégalovirus	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus de l'hépatite B	<i>Clostridium perfringens</i>	
Virus de l'hépatite C	<i>Enterococcus faecalis</i>	
Virus de l'herpès simplex de type 1	<i>Escherichia coli</i>	
Virus de l'herpès simplex de type 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Virus de l'herpès humain de type 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Virus de l'herpès humain de type 7	<i>Mycobacterium avium</i>	
Virus de l'herpès humain de type 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Virus de l'immunodéficience humaine 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Virus de l'immunodéficience humaine 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Papillomavirus humain	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
Virus JC	<i>Salmonella enterica</i>	
Parvovirus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Virus simien 40		
Virus varicelle-zona		

## Spécificité analytique - substances interférentes

Des niveaux élevés de triglycérides (33,0 g/L), de bilirubine conjuguée (0,2 g/L), de bilirubine non conjuguée (0,2 g/L), d'albumine (60,0 g/L), d'hémoglobine (2,0 g/L) et d'ADN humain (2 mg/L) dans les échantillons ont été testés en présence et en l'absence d'ADN de l'EBV. Il a été démontré que les interférences endogènes testées n'ont pas d'effet sur les performances du test **cobas**® EBV.

De plus, les composés médicamenteux répertoriés au Tableau 16 ont été testés à trois fois la  $C_{max}$  en présence et en l'absence d'ADN de l'EBV.

Il a été démontré qu'aucune substance potentiellement interférente n'affecte les performances du test.

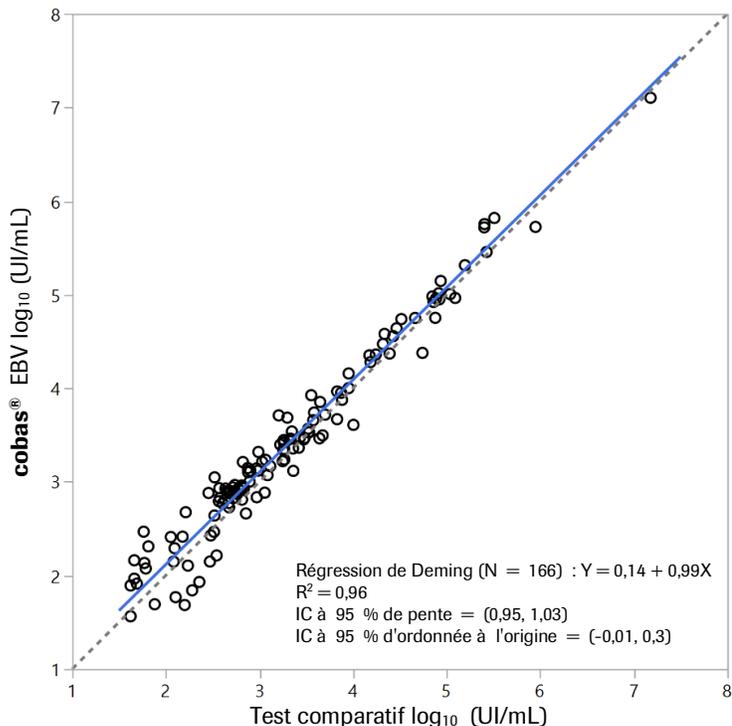
**Tableau 16** Composés médicamenteux dont l'interférence avec la quantification de l'ADN de l'EBV par le test **cobas**® EBV a été testée

Catégorie de médicament	Nom du médicament générique	
Antimicrobien	Céfotétan	Sulfaméthoxazole
	Clavulanate de potassium	Ticarcilline disodique
	Fluconazole	Triméthoprim
	Pipéracilline	Vancomycine
	Tazobactam de sodium	Micafungine
Composés pour le traitement de virus de l'herpès	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Aciclovir	Letermovir
Immunosuppresseur	Azathioprine	Prednisone
	Cyclosporine	Sirolimus
	Évérolimus	Tacrolimus
	Mofétilmycophénolate	Acide mycophénolique

## Corrélation de la méthode

Les performances du test **cobas**® EBV ont été évaluées par rapport à un test comparatif en analysant des échantillons de plasma EDTA issus de patients infectés par l'EBV. Des échantillons de plasma EDTA, compris dans le domaine de quantification des deux tests, ont été testés en tant que répliqués uniques. L'analyse de la régression de Deming a été réalisée.

Les résultats de la régression de Deming sont indiqués dans la Figure 4.

**Figure 4** Analyse de régression comparative du test **cobas®** EBV et d'un test comparatif

## Échec complet du système

Le taux d'échec complet du système pour le test **cobas®** EBV a été déterminé en testant 100 répliqués de plasma EDTA dopés avec un échantillon clinique positif pour l'EBV. Ces échantillons ont été testés à une concentration égale à  $3 \times$  la LoD.

D'après les résultats de cette étude, tous les répliqués étaient valides et positifs pour la cible EBV. Le taux d'échec complet du système est donc de 0 % (intervalle de confiance unilatéral à 95 % supérieur : 2,95 %).

## Contamination croisée

Le taux de contamination croisée pour le test **cobas®** EBV a été déterminé en testant 240 répliqués d'un échantillon de matrice négatif pour l'EBV et 225 répliqués d'un échantillon d'EBV de titre élevé à environ  $2,00E+07$  UI/mL. Au total, cinq runs ont été exécutés avec des échantillons positifs et négatifs en configuration de damier.

Les 240 répliqués de l'échantillon négatif étaient tous négatifs, soit un taux de contamination croisée de 0 % (intervalle de confiance unilatéral à 95 % supérieur : 1,24 %).

## Informations supplémentaires

### Caractéristiques clés du test

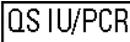
<b>Type d'échantillon</b>	Plasma EDTA
<b>Quantité d'échantillon minimale requise</b>	350 µL*
<b>Volume de prise d'essai d'échantillon</b>	200 µL
<b>Sensibilité analytique</b>	18,8 UI/mL
<b>Domaine de linéarité</b>	35,0 UI/mL à 1E+08 UI/mL
<b>Spécificité</b>	100 %
<b>Génotypes détectés</b>	Génotypes 1 et 2 de l'EBV

\* Volume mort de 150 µL identifié pour les tubes secondaires **cobas omni**. Les autres tubes utilisés pour le test peuvent contenir un volume mort différent et nécessiter un volume minimum plus ou moins élevé.

## Symboles

Les symboles suivants sont utilisés dans toute la documentation accompagnant les produits de diagnostic par PCR de Roche.

**Tableau 17** Symboles utilisés dans l'étiquetage des produits de diagnostic par PCR de Roche

	Logiciel auxiliaire		Limite inférieure de la plage assignée		Contrôle négatif
	Mandataire dans la Communauté européenne		Limite supérieure de la plage assignée		Contrôle positif
	Fiche technique à codes-barres		Conserver dans un endroit sombre		Contrôle
	Code du lot		Suffisant pour $\langle n \rangle$ tests		Plage assignée (copies/mL)
	Risques biologiques		Limites de température		Plage assignée (UI/mL)
	Référence du catalogue		Fichier de définition de tests		Procédure standard
	Consulter les instructions d'utilisation		Fabricant		Procédure ultrasensible
	Contenu du kit		Date limite d'utilisation		Copies QS par réaction de PCR, utiliser les copies QS par réaction de PCR pour le calcul des résultats.
	Distributeur		Code article international		UI QS par réaction de PCR, utiliser les unités internationales (UI) QS par réaction de PCR pour le calcul des résultats.
	Pour évaluation de performance IVD uniquement		Numéro de série		Marquage CE de conformité ; ce dispositif est conforme aux exigences en vigueur concernant le marquage CE d'un dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> .
Rx Only	États-Unis : la législation fédérale américaine limite la vente de ce dispositif aux professionnels de santé autorisés à exercer.		Date de fabrication		
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>		Ne pas réutiliser		

Assistance technique pour les clients aux États-Unis 1-800-526-1247

## Fabricant et distributeurs

**Tableau 18** Fabricant et distributeurs



Roche Molecular Systems, Inc.  
1080 US Highway 202 South  
Branchburg, NJ 08876 USA  
[www.roche.com](http://www.roche.com)



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Strasse 116  
68305 Mannheim, Germany

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

## Marques commerciales et brevets

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

## Copyright

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH  
Sandhofer Str. 116  
68305 Mannheim  
Germany



## Références

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. doi: 10.1038/bmt.2009.254. PubMed PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. doi: 10.1111/ajt.12093. PubMed PMID: 23464993.
3. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343:481-92. doi: 10.1056/NEJM200008173430707. PubMed PMID: 10944566.
4. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al.; Sixth European Conference on Infections in Leukemia, a joint venture of the Infectious Diseases Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation (EBMT-IDWP), the Infectious Diseases Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC-IDG), the International Immunocompromised Host Society (ICHS) and the European Leukemia Net (ELN). Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica*. 2016;101:803-11. doi:10.3324/haematol.2016.144428. Review. PubMed PMID: 27365460; PubMed Central PMCID: PMC5004459.
5. Allen UD, JK Preiksaitis; AST Infectious Diseases Community of Practice. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:107-20. doi: 10.1111/ajt.12104. PubMed PMID: 23465004.
6. San-Juan R, Comoli P, Caillard S, Moulin B, Hirsch HH, P Meylan; ESCMID Study Group of Infection in Compromised Hosts. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 7:109-18. doi: 10.1111/1469-0691.12534. PubMed PMID: 24475976.
7. Nijland ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, Ten Berge IJ. Epstein-Barr virus-positive posttransplant lymphoproliferative disease after solid organ transplantation: pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Transplant Direct*. 2015;2:e48. . doi: 10.1097/TXD.0000000000000557. eCollection 2016 Jan. PubMed PMID: 27500242; PubMed Central PMCID: PMC4946499.
8. Tsai DE, Douglas L, Andreadis C, et al. EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: results of a two-arm prospective trial. *Am J Transplant*. 2008;8:1016-24. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02183.x. PubMed PMID: 18312608.
9. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, et al.; Collaborative Study Group. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals*. 2016;44:423-33. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.04.010. Epub 2016 Jul 22. PubMed PMID: 27461128.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PubMed 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. PubMed PMID: 7845459.

12. 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;80:869-78. PubMed PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992;10:413-7. PubMed PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. doi: 10.1101/gr.6.10.986. PubMed PMID: 8908518.
15. 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.
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. Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog*. 2009;5(7):e1000496. doi: 10.1371/journal.ppat.1000496. Epub 2009 Jul 3. PMID: 19578433.

## Révision du document

Informations sur la révision du document	
Doc Rev. 2.0 08/2020	<p>Prolongation de la durée du stockage des échantillons contenus dans des tubes secondaires (<math>\leq -18\text{ °C}</math>) jusqu'à 6 mois.</p> <p>Ajout d'une remarque relative aux mesures de contrôle de la contamination à la section <b>Avertissements et précautions</b>.</p> <p>Mise à jour de la section <b>Bonnes pratiques de laboratoire</b>.</p> <p>Ajout d'une remarque relative à la recentrifugation des échantillons à la section <b>Prélèvement, transport et conservation des échantillons</b>.</p> <p>Ajoute d'une note de bas de page sur les résultats « &lt; Titer Min » au <b>Tableau 10</b> de la section <b>Interprétation des résultats</b>.</p> <p>Mise à jour de la page des symboles harmonisés.</p> <p>Veillez contacter votre représentant local Roche si vous avez des questions.</p>