

cobas[®] EBV

Kvantitatív nukleinsavteszt a cobas[®] 6800/8800 rendszereken való használatra

In vitro diagnosztikai célra

cobas[®] EBV

P/N: 08688206190

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 08688214190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190

Tartalomjegyzék

Rendeltetésszerű használat	4
A teszt összegzése és ismertetése.....	4
Reagensek és anyagok.....	7
cobas® EBV reagensek és kontrollok	7
cobas omni reagensek minta-előkészítéshez	10
A reagensek tárolási és kezelési feltételei	11
További szükséges anyagok	12
A szükséges eszközök és szoftverek	12
Óvintézkedések és kezelési követelmények	13
Figyelmeztetések és óvintézkedések	13
Reagensek kezelése	13
Helyes laboratóriumi gyakorlat	14
A minta levétele, szállítása és tárolása	14
Minták	14
Használati utasítás.....	16
Megjegyzések az eljárással kapcsolatban	16
A cobas® EBV futtatása	16
Eredmények	17
Minőségellenőrzés és az eredmények érvényessége	17
Az eredmények értelmezése	18
Az eljárással kapcsolatos korlátozások	18

A nem klinikai teljesítmény értékelése	19
A fontosabb teljesítményjellemzők.....	19
Kimutatási határ (LoD).....	19
Lineáris tartomány	20
Pontosság – laboratóriumon belül	21
Genotípus szerinti ellenőrzés	21
Specifitás	21
Analitikai specifitás	22
Analitikai specifitás – zavaró anyagok.....	22
Módszerkorreláció	23
Teljes rendszerhiba	23
Keresztzennyeződés	24
További információk.....	25
A teszt legfontosabb tulajdonságai	25
Szimbólumok	26
Gyártó és forgalmazók.....	27
Védjegyek és szabadalmak	27
Szerzői jogok.....	27
Hivatkozások	28
Dokumentumverzió	30

Rendeltetésszerű használat

A cobas® EBV egy *in vitro* nukleinsav-amplifikációs teszt az Epstein-Barr vírus (EBV) DNS-ének mennyiségi meghatározására humán EDTA-s plazmában.

A cobas® EBV rendeltetésszerű használata szerint segítséget nyújt az EBV-fertőzés diagnosztizálásában és kezelésében szervátültetett betegeknél. Ha egy betegnél folyamatosan figyelik az EBV-t, a sorozatos DNS-mérések jelezhetik, amikor változtatni kell a kezelésen, és felhasználhatók a vírus kezelésre adott reakciójának felmérésére.

A cobas® EBV eredményeit az összes vonatkozó klinikai és laboratóriumi eredménnyel együtt kell értelmezni.

A teszt összegzése és ismertetése

Háttér

A szervátültetett betegeknél számos vírusos és bakteriális fertőzés kockázata magasabb, és ezek náluk nagyobb eséllyel okoznak súlyos állapotromlást, mint a populáció egészséges részében. A nagyobb kockázatot részben az immunrendszer működésének csökkenése okozza, hiszen a szervátültetett betegek immunszuppresszív gyógyszereket kapnak a kilökődés esélyének csökkentésére.^{1,2}

Az EBV a herpeszvírusok családjának tagja. Kettős szálú, burokkal rendelkező dezoxiribonukleinsav (DNS) vírus (~172 kb). Az EBV két fő genotípusa (1-es és 2-es) az EBNA-2 gén különbségeiben térnek el egymástól. Embernél meglehetősen gyakran fordul elő EBV-fertőzés: a felnőttek több mint 90%-a fertőzött, és a lappangó fertőzés egész életen át fennáll. Az EBV fertőző mononukleózist okoz az újonnan megfertőzött kamaszok és felnőttek egy részénél, és többféle daganatos megbetegedésben is szerepet játszhat. Ilyenek az orrgarati karcinóma, a Burkitt-limfóma és a Hodgkin-limfóma. Az EBV okozhat limfoproliferatív rendellenességeket született vagy szerzett immunhiánnyal élőknél, például szervátültetetteknél és humán immundeficiencia vírussal fertőzötteknél, valamint szerzett immunhiányos betegséggel élőknél (HIV/AIDS).³

Szervátültetett betegeknél az EBV a memória B-sejtek segítségével a lappangó vírus újraaktiválásával okozhat betegséget, vagy új elsődleges fertőzéssel, különösen EBV-negatív szervátültetetteknél, akiknél a beültetés EBV-pozitív donortól származott.³ Ezen betegeknél az EBV-vel kapcsolatba hozható betegségek legsúlyosabb megjelenése a limfoproliferatív rendellenesség (PTLD), amit a limfociták (leginkább a B-sejtek) kontrollálatlan burjánzása okoz.⁴ A szervátültetettek körében a PTLD-esetek > 70%-a EBV-fertőzéshez köthető. A PTLD szempontjából a legkockázatosabb időszak a szervátültetés utáni első év, és az ilyenkor előforduló PTLD-esetek > 90%-a összefüggésben van EBV-fertőzéssel. A szervátültetés utáni első év után előforduló PTLD-esetek legfeljebb 20%-a EBV-negatív betegeknél fordul elő.^{4,5}

A korai PTLD kockázati tényezői közé tartozik az EBV-negatív szervátültetettek szerológiai státusza a műtétkor, a fiatal kor, kitettség a limfocitákat gyérítő antitesteknek és az átültetett szerv típusa.^{5,6}

Az elsődleges EBV-fertőzés korai felismerése és a DNS-szint monitorozása elősegítheti a gyors terápiás beavatkozást, amivel megelőzhető az EBV-hez kapcsolódó betegség kialakulása. Az irányelvek szerint ajánlatos rendszeresen ellenőrizni az EBV-szintet mennyiségi nukleinsavtesztekkel (NAT), különösen EBV-negatív, magas kockázatú szervátültetett betegeknél.^{4,5} Bár a vírus orvosiilag releváns pontos küszöbértéke a különböző tesztek közötti eltérések miatt még vitatott, a kritikus küszöbérték létezése valószínűnek tűnik, és élettani vizsgálatok szerint a magasabb EBV-DNS-érték összefügg az EBV-betegségek és a PTLD kialakulásának gyakoriságával.^{4,5,7} EBV-tesztelésre használtak plazma- és teljesvér-mintákat is, és az eredmények alapján a plazma alkalmasabb a PTLD kimutatására.^{4,5,7,8}

Az EBV-DNS-szint csökkentése céljából és a PTLD bekövetkezése ellen általánosan használt terápiás beavatkozások közé tartozik az immunszuppresszív gyógyszeradagok csökkentése és a B-sejtek számát csökkentő antitestekkel történő kezelés.⁷ Az EBV-DNS-szintet csökkentő megelőző kezelés a legtöbb betegnél sikeres, bár akár 20%-uknál így is kialakulhat PTLD, különösen akiknél egy évnél több telt el a szervátültetés óta.⁷

Az EBV mennyiségi meghatározását végző legtöbb laboratóriumi teszt nincs standardizálva, ezért eltérések állnak fenn a laboratóriumok és tesztek eredményei között, és így az eltérő laboratóriumban vagy teszttel kapott DNS-szintek nem hasonlíthatók össze.⁷ A probléma megoldására a WHO létrehozott egy nemzetközi standardot az EBV mennyiségi meghatározására, így a standardizált tesztek eredménye IU/ml egységben fejezhető ki.⁹ Az EBV-DNS-szintek reprodukálhatóságának és érvényességének formális kiértékelése alapvető fontosságú a különböző laboratóriumok eredményeinek egyezése érdekében, mert így javítható az olyan betegek klinikai kezelése, akiknél nagyobb az EBV-vel kapcsolatos betegségek és a PTLD kialakulásának kockázata.

A NAT-teszt elméleti alapjai

Szervátültetés előtt a fogadó EBV-hez kapcsolódó esetleges szövődményeinek kockázatfelmérését elősegítendő meghatározzák a donor és a fogadó EBV-szerológiáját, de a szerológiai vizsgálat nem megfelelően érzékeny vagy pontos a beteg szervátültetés utáni monitorozásához. Az EBV-tenyésztési módszerek lassúak, és ebben a helyzetben nem jelzik elő megfelelően a szövődményeket. Az EBV-DNS közvetlen kimutatása valós idejű PCR-módszerrel nagyobb dinamikus tartományt, pontosságot, valamint magas érzékenységet és specificitást biztosíthat.

A vizsgálat háttere

A **cobas® EBV** a **cobas® 6800** rendszeren és a **cobas® 8800** rendszeren futtatható mennyiségi teszt. A **cobas® EBV** lehetővé teszi az EBV-DNS kimutatását és mennyiségi meghatározását fertőzött betegek EDTA-s plazmájában. A víruskoncentrációt a teszt egy nem EBV-DNS mennyiségi standard (DNA-QS) szerint határozza meg, amit a mintafeldolgozás során adnak az egyes mintákhoz. A DNA-QS egyben monitorozza a teljes minta-előkészítést és PCR-amplifikálást is. Ezen felül a teszt három külső kontrollt használ: egy magas titerű pozitívot, egy alacsony titerű pozitívot és egy negatívot.

Az eljárás alapelvei

A **cobas® EBV** teljesen automatizált minta-előkészítésen (nukleinsav-extrahálás és -tisztítás) alapul, amelyet PCR-amplifikálás és -kimutatás követ. A **cobas® 6800/8800** rendszerek ugyanazon mintaadagoló, szállító-, feldolgozó- és elemzőmodulokból állnak. Az automatizált adatkezelést a **cobas® 6800/8800** szoftver végzi, amely az összes teszthez a következő eredmények egyikét rendeli: „Target not detected” (nem kimutatható target), „EBV DNA detected < LLoQ” (EBV-DNS az alsó mennyiségi meghatározási határ alatt), „EBV DNA detected > ULoQ” (EBV-DNS a felső mennyiségi meghatározási határ fölött) vagy egy érték az $LLoQ < x < ULoQ$ lineáris tartományban. Az eredményeket át lehet tekinteni közvetlenül a rendszer képernyőjén, de exportálhatók vagy jelentésként nyomtathatók is.

A rendszer a betegek mintáiból származó nukleinsavakat és a hozzáadott lambda DNS (DNA-QS) molekulákat egyszerre extrahálja. Összefoglalva: a mintába proteináz és lízisreagens kerül, és ennek hatására a vírus nukleinsav felszabadul. A felszabadult nukleinsav a hozzáadott mágneses üvegpartikulumok szilikonfelületéhez köt. A kötetlen anyagokat és szennyeződések, például a denaturált fehérjét, sejttörmeléket és lehetséges PCR-inhibitorokat az ezt követő mosóreagens-lépések eltávolítják, és egy eluáló puffer magasabb hőmérsékleten eluálja a tisztított nukleinsavat az üvegpartikulumokról.

A teszt a mintában a célnukleinsav szelektív amplifikálását a célvírusra specifikus kettős megközelítéssel éri el, amelyeket az EBV-n belül az EBV-EBNA-1 gén és az EBV-BMRF gén nagy fokban konzervált régióiból választ. A DNA-QS szelektív amplifikálását a teszt szekvenciaspecifikus forward és reverz primerekkel éri el, amelyeket úgy választ, hogy ne legyenek homológok a EBV genomjával. Az amplifikálás hőstabil DNS-polimeráz enzim segítségével történik. A target és DNA-QS szekvenciákat egyszerre amplifikálja egy univerzális PCR-amplifikáló profillal, amely tartalmazza az előre meghatározott hőmérséklet-lépcsőket és a ciklusok számát. A Master Mix dezoxitimidin-trifoszfát (dTTP) helyett dezoxiuridin-trifoszfátot (dUTP) tartalmaz, amely beépül az újonnan szintetizált DNS-be (amplikon).¹⁰⁻¹² Az első hevítési lépés során a PCR Mix reagensben lévő AmpErase enzim az előző PCR-futtatásokból származó minden szennyező amplikont inaktívál. Az újonnan kialakuló amplikonokat viszont nem semmisíti meg, mert az 55 °C-ot meghaladó hőmérséklet miatt az AmpErase enzim maga is inaktív lesz.

A **cobas®** EBV Master Mix a EBV-target szekvenciákra specifikus két kimutatási próbát tartalmaz, valamint egyet az DNA-QS-hez. A próbákat fluoreszcens targetspecifikus jelzőfestékek jelölik, ami lehetővé teszi az EBV target és a DNA-QS egyszerre történő kimutatását két különböző targetcsatornán.^{13, 14} Az érintetlen próbák fluoreszcens jelét a blokkolófesték elfedi. A PCR-amplifikálási lépés során a próba a specifikus, egyszálú DNS-templátokhoz hibridizál. Ennek eredményeként a próbát a DNS-polimeráz 5'-3'-nukleázaktivitása hasítja, így a jelzőfesték és a blokkolófesték elválik, és fluoreszcens jel keletkezik. Minden egyes PCR-ciklus során megnő a hasított próbák mennyisége, és ennek velejárójaként növekszik a jelzőfestékből származó jel összesített nagysága is. A PCR-termékek valós idejű kimutatása és megkülönböztetése a felszabadult, vírustargeteket és DNA-QS-t reprezentáló jelzőfestékek fluoreszcenciájának mérésével megy végbe.

Reagensek és anyagok

cobas® EBV reagensek és kontrollok

Minden felbontatlan reagenst és kontrollt az 1. táblázatban – 4. táblázatban ajánlásai szerint tároljon.

1. táblázat cobas® EBV

cobas® EBV Tárolás: 2–8 °C 192 tesztkazetta (P/N 08688206190)		
A készlet reagensei	A reagens összetevői	Készletenkénti mennyiség 192 teszt
Proteinázoldat (PASE)	Trisz puffer, < 0,05% EDTA, kalcium-klorid, kalcium-acetát, 8% proteináz EUH210: Kérésre biztonsági adatlap kapható. EUH208: Szubtilizint tartalmaz. Allergiás reakciót válthat ki.	22,3 ml
DNS mennyiségi standard (DNA QS)	Trisz puffer, < 0,05% EDTA, < 0,001% nem EBV DNS primerkötő- és egyedi próbaregiót tartalmazó nem EBV-konstrukció (nem fertőző DNS), < 0,002% poli-rA RNS (szintetikus), < 0,1% nátrium-azid	21,2 ml
Eluáló puffer (EB)	Trisz puffer, 0,2% metil-4-hidroxi-benzoát	21,2 ml
Master Mix reagens 1 (MMX-R1)	Mangán-acetát, kálium-hidroxid, < 0,1% nátrium-azid	7,5 ml
EBV Master Mix reagens 2 (EBV MMX-R2)	Tricin puffer, kálium-acetát, < 18% dimetil-szulfoxid, glicerin, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP-k, < 0,01% upstream és downstream EBV-primerek, < 0,01% Quantitation Standard (mennyiségi standard) forward és reverz primer, < 0,01% fluoreszcensen jelölt, a EBV-re és a EBV mennyiségi standardra specifikus oligonukleotid-próbák, < 0,01% oligonukleotid aptamer, < 0,1% Z05D DNS-polimeráz (mikrobiális), < 0,10% AmpErase (uracil-N-glikoziláz) enzim (mikrobiális), < 0,1% nátrium-azid	9,7 ml

2. táblázat cobas® EBV/BKV kontroll-készlet

cobas® EBV/BKV Control Kit

Tárolás: 2–8 °C

(P/N 08688214190)

A készlet reagentsei	A reagens összetevői	Készletenkénti mennyiség	Biztonsági jelzés és figyelmeztetés*
EBV/BKV alacsony pozitív kontroll (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001% szintetikus (plazmid) EBV-DNS lambda bakteriofág burokként csomagolva, normál humán plazma, PCR-eljárásokkal nem kimutatható EBV-DNS. 0,1% ProClin® 300 tartósítószer**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  FIGYELEM H317: Allergiás bőrreakciót válthat ki. P261: Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. P272: Szennyezett munkaruhát tilos kivinni a munkahely területéről. P280: Védőkesztyű használata kötelező. P333 + P313: Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni. P362 + P364: A szennyezett ruhadarabot le kell vetni és újbóli használat előtt ki kell mosni. P501: A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: jóváhagyott hulladékkezelési üzemben. 55965-84-9 Reagálótömeg: 5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC 247-500-7] és 2-metil-2H-izotiazol-3-on [EC 220-239-6] (3:1)
EBV/BKV magas pozitív kontroll (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001% szintetikus (plazmid) EBV-DNS lambda bakteriofág burokként csomagolva, normál humán plazma, PCR-eljárásokkal nem kimutatható EBV-DNS. 0,1% ProClin® 300 tartósítószer**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  FIGYELEM H317: Allergiás bőrreakciót válthat ki. P261: Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. P272: Szennyezett munkaruhát tilos kivinni a munkahely területéről. P280: Védőkesztyű használata kötelező. P333 + P313: Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni. P362 + P364: A szennyezett ruhadarabot le kell vetni és újbóli használat előtt ki kell mosni. P501: A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: jóváhagyott hulladékkezelési üzemben. 55965-84-9 Reagálótömeg: 5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on [EC 247-500-7] és 2-metil-2H-izotiazol-3-on [EC 220-239-6] (3:1)

* A termék biztonsági címkéi megfelelnek az EU GHS előírásainak.

** Veszélyes anyag.

3. táblázat cobas® puffer negatívkontroll-készlet**cobas® Buffer Negative Control Kit**

Tárolás: 2–8 °C

(P/N 07002238190)

A készlet reagentsei	A reagens összetevői	Készletenkénti mennyiség
cobas® puffer negatív kontroll (BUF (-) C)	Trisz puffer, < 0,1% nátrium-azid, EDTA, < 0,002% Poly rA RNS (szintetikus)	16 ml (16 × 1 ml)

cobas omni reagensek minta-előkészítéshez

4. táblázat cobas omni reagensek minta-előkészítéshez*

Reagensek	A reagens összetevői	Készletenkénti mennyiség	Biztonsági jelzés és figyelmeztetés**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Tárolás: 2–8 °C (P/N 06997546190)	Mágneses üvegpartikulumok, trisz puffer, 0,1% metil-4-hidroxi-benzoát, < 0,1% nátrium-azid	480 teszt	Nincs
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Tárolás: 2–8 °C (P/N 06997511190)	Tris puffer, 0,1% metil-4-hidroxi-benzoát, < 0,1% nátrium-azid	4 × 875 ml	Nincs
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Tárolás: 2–8 °C (P/N 06997538190)	43% (m/m) guanidin-tiocianát***, 5% (m/V) polidokanol***, 2% (m/V) ditiotritol***, nátrium-citrát-dihidrát	4 × 875 ml	  VESZÉLY H302 + H332: Lenyelve vagy belélegezve ártalmas. H314: Súlyos égési sérülést és szemkárosodást okoz. H412: Ártalmas a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz. EUH032: Savval érintkezve nagyon mérgező gázok képződnek. P261: Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. P273: Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását. P280: Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. P303 + P361 + P353: HA BŐRRE (vagy hajra) KERÜL: Az összes szennyezett ruhadarabot azonnal le kell vetni. A bőrt le kell öblíteni vízzel. P304 + P340 + P310: BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz. P305 + P351 + P338 + P310: SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz. 593-84-0 Guanidin-tiocianát 9002-92-0 Polidokanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-bután-2,3-diol
cobas omni Wash Reagent (WASH) Tárolás: 15–30 °C (P/N 06997503190)	Nátrium-citrát-dihidrát, 0,1% metil-4-hidroxibenzoát	4,2 l	Nincs

* Ezeket a reagenseket a cobas® EBV tesztkészlet nem tartalmazza. Lásd a további szükséges anyagok felsorolását (7. táblázat).

** A termék biztonsági címkéi megfelelnek az EU GHS előírásainak.

*** Veszélyes anyag.

A reagenszek tárolási és kezelési feltételei

A reagenszeket az 5. táblázatban és a 6. táblázatban szerint kell tárolni és kezelni.

Amikor a reagenszek nincsenek a **cobas®** 6800/8800 rendszerekben, tárolja őket az 5. táblázatban szerinti hőmérsékleten.

5. táblázat Reagenszek tárolása (amikor a reagens nincs a rendszerben)

Reagens	Tárolási hőmérséklet
cobas® EBV – 192	2–8 °C
cobas® EBV/BKV Control Kit (kontroll-készlet)	2–8 °C
cobas® Buffer Negative Control Kit (puffer negatívkontroll-készlet)	2–8 °C
cobas omni Lysis Reagent (lízisreagens)	2–8 °C
cobas omni MGP Reagent (MGP reagens)	2–8 °C
cobas omni Specimen Diluent (mintahígító)	2–8 °C
cobas omni Wash Reagent (mosóreagens)	15–30 °C

A **cobas®** 6800/8800 rendszerekbe töltött reagenszeket a rendszer megfelelő hőmérsékleten tárolja, és figyeli a lejárat idejüket. A **cobas®** 6800/8800 rendszerek csak akkor engedik a reagenszek használatát, ha a 6. táblázatban minden feltétele teljesül. A rendszer automatikusan megakadályozza a lejárt reagenszek használatát. A 6. táblázatban a **cobas®** 6800/8800 rendszerek által alkalmazott reagenskezelési szabályok felhasználói leírását tartalmazza.

6. táblázat A reagenszek **cobas®** 6800/8800 rendszerekhez kapcsolódó lejárat feltételei

Reagens	Készlet lejárat ideje	A bontott készlet stabilitása	Hány futtatásra használható ez a készlet	Stabilitás a rendszerben (összes hűtőn kívül töltött idő)
cobas® EBV – 192	Nem érte el a dátumot	90 nap az első használatától	Max. 40 futtatás	Max. 40 óra
cobas® EBV/BKV Control Kit (kontroll-készlet)	Nem érte el a dátumot	Nincs ^a	Nincs	Max. 8 óra
cobas® Buffer Negative Control Kit (puffer negatívkontroll-készlet)	Nem érte el a dátumot	Nincs ^a	Nincs	Max. 10 óra
cobas omni Lysis Reagent (lízisreagens)	Nem érte el a dátumot	30 nap a betöltéstől*	Nincs	Nincs
cobas omni MGP Reagent (MGP reagens)	Nem érte el a dátumot	30 nap a betöltéstől*	Nincs	Nincs
cobas omni Specimen Diluent (mintahígító)	Nem érte el a dátumot	30 nap a betöltéstől*	Nincs	Nincs
cobas omni Wash Reagent (mosóreagens)	Nem érte el a dátumot	30 nap a betöltéstől*	Nincs	Nincs

^a Egyszer használatos reagens.

* Az azóta eltelt idő, hogy a reagenst először betöltötték a **cobas®** 6800/8800 rendszerekbe.

További szükséges anyagok

7. táblázat A cobas® 6800/8800 rendszerekben használt anyagok és fogyóeszközök

Anyag	P/N
cobas omni Processing Plate (feldolgozólemez)	05534917001
cobas omni Amplification Plate (amplifikálólemez)	05534941001
cobas omni Pipette Tips (pipettahegyek)	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container (folyékonyhulladék-tároló)	07094388001
cobas omni Lysis Reagent (lízisreagens)	06997538190
cobas omni MGP Reagent (MGP reagens)	06997546190
cobas omni Specimen Diluent (mintahígító)	06997511190
cobas omni Wash Reagent (mosóreagens)	06997503190
Szilárdhulladék-zacskó	07435967001
Szilárdhulladék-zsák és szilárdhulladék-tartály vagy Szilárdhulladék-zsák béléssel és készletfiókkal	07435967001 és 07094361001 vagy 08030073001 és 08387281001
Szilárdhulladék-tartály	07094361001
cobas omni 13×75 másodlagos csövek (opcionális)	06438776001

A szükséges eszközök és szoftverek

A cobas® 6800/8800 szoftvernek és a cobas® EBV elemzőcsomagnak telepítve kell lenniük a készülék(ek)en. Az Instrument Gateway (IG) szerver a rendszer része.

8. táblázat Készülékek

Berendezés	P/N
cobas® 6800 rendszer (mozgatható platform opció)	06379672001
cobas® 6800 rendszer (rögzített platform)	05524245001
cobas® 8800 System	05412722001
Mintaadagoló modul	06301037001

A további információkat a cobas® 6800/8800 rendszerek felhasználói segédletében és/vagy használati útmutatójában találja.

Megjegyzés: A készülékekkel használható mintaállványok, eltömődött hegyek tárolására való állványok és állványtálcák részletes megrendelőlistájáért forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.

Óvintézkedések és kezelési követelmények

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Mint minden teszteljárásnál, a helyes laboratóriumi gyakorlat alapvető a teszt megfelelő kivitelezéséhez. A vizsgálat nagy érzékenysége miatt ügyeljen arra, hogy a reagensek és amplifikálási keverékek szennyeződéstől mentesek maradjanak.

- Csak *in vitro* diagnosztikai célra.
- A **cobas® EBV**-t nem értékelték ki EBV szűrőtesztként vérben vagy vérkészítményekben.
- Minden betegről származó mintát fertőzőként, megfelelő biztonságos laboratóriumi eljárásokat alkalmazva kell kezelni. Ilyeneket ír le a Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories és a CLSI Document M29-A4.^{15, 16} Ezt a vizsgálatot csak a fertőző anyagok kezelésében és a **cobas® EBV** és a **cobas® 6800/8800** rendszer használatában jártas személy végezheti.
- Minden humán eredetű anyagot potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni, és az általános óvintézkedések szerint kell kezelni. Kiömlés esetén azonnal fertőtlenítsen desztillált vagy ioncserélt vízzel frissen hígított, 0,5%-os koncentrációjú nátrium-hipoklorit oldattal (a háztartási fehérítőszer 1:10 oldatával), illetve kövesse a megfelelő helyszíni eljárásokat.
- A **cobas® EBV/BKV** kontrollkészlet emberi vérből származó plazmát tartalmaz. A forrásanyagot PCR-technikával vizsgálva az EBV-DNS-ből csak elfogadható, alacsony szintet találtak. Egyetlen ismert vizsgálati módszer sem nyújthat teljes garanciát arra, hogy a humán vérkészítményekben nincs jelen fertőző anyag.
- **Ne fagyassza a teljes vért és az elsődleges csövekben tárolt mintákat.**
- Az optimális vizsgálati feltételek biztosítása érdekében csak a mellékelt vagy a megadott szükséges fogyóeszközöket alkalmazza.
- A biztonsági adatlapok (SDS) igény esetén hozzáférhetőek a Roche helyi irodájában.
- A vizsgálat helyes kivitelezésének biztosítása végett szigorúan tartsa be a megadott eljárásokat és irányelveket. A megadott eljárásoktól és irányelvektől való bármilyen eltérés befolyásolhatja a vizsgálat teljesítményét.
- Álpozitív eredmények fordulhatnak elő, ha a minták átvitelét a mintakezelés és -feldolgozás során nem kontrollálják megfelelően.
- Mivel a felnőttek több mint 90%-a krónikus EBV-hordozó, és a nyálukba akár 10⁸ EBV kópia/ml is kerülhet, valamint a vizsgálat magas érzékenysége miatt fontos, hogy a laboratórium megfelelő intézkedésekkel előzze meg a keresztszennyeződést.¹⁷

Reagensek kezelése

- A mintákkal vagy kontrollokkal történő kontamináció elkerülése érdekében minden reagenst, kontrollt és mintát a helyes laboratóriumi gyakorlat szerint kezeljen.
- Felhasználás előtt szemrevételezzen minden reagenskazettát, oldószert, lízisreagenst és mosóreagenst, hogy nem tapasztal-e szivárgásra utaló jeleket. Szivárgás esetén azt az anyagot ne használja fel a vizsgálatához.
- A **cobas omni** lízisreagens guanidin-tiocianátot tartalmaz, ami potenciálisan veszélyes vegyület. Kerülje a reagensek bőrrel, szemmel vagy nyálkahártyával való érintkezését. Ha mégis előfordul érintkezés, azonnal mossa le bő vízzel, mert ellenkező esetben égési sérülés történhet.
- A **cobas® EBV** tesztkészletek, **cobas omni** MGP reagens és a **cobas omni** mintaoldószer tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaz. Kerülje a reagensek bőrrel, szemmel vagy nyálkahártyával való érintkezését. Ha mégis előfordul érintkezés, azonnal mossa le bő vízzel, mert ellenkező esetben égési sérülés történhet. Ha a reagensek kiömlenek, szárazra törlés előtt hígítsa őket vízzel.
- Ügyeljen rá, hogy a guanidin-tiocianát tartalmú **cobas omni** lízisreagens ne lépjen érintkezésbe nátrium-hipoklorit-oldattal (fehérítő). Az ilyen keverékből erősen mérgező gáz fejlődhet.
- Az országos, állami és helyi szabályozások szerint végezze el minden olyan anyag hulladékkezelését, amely mintákkal vagy reagensekkel kapcsolatba került.

Helyes laboratóriumi gyakorlat

- Ne pipetázzon szájjal.
- Ne egyen, igyon vagy dohányozzon a kijelölt munkaterületeken.
- A minták és reagensek kezelése közben viseljen laboratóriumi kesztyűt, köpenyt és szemvédőt. A szennyeződés elkerülése érdekében váltson kesztyűt a minták és a **cobas®** EBV készletek, az EBV/BKV alacsony pozitív kontroll (EBV/BKV L(+))C), az EBV/BKV magas pozitív kontroll (EBV/BKV H(+))C), a **cobas®** puffer negatívkontroll (eBUF (-)) C) és a **cobas omni** reagensek kezelése között. A minták és kontrollok kezelése során ügyeljen a kesztyűk szennyezésének elkerülésére.
- Alaposan mosson kezet a minták és a készlet reagenseinek kezelése és kesztyűlevétel után.
- Gondosan tisztítson meg, és desztillált vagy ioncserélt vízből frissen készített 0,5%-os nátrium-hipoklorit oldattal (1:10 arányban hígított háztartási fehérítőszer) fertőtlenítsen minden laboratóriumi munkafelületet. Ezután törölje át 70%-os etanollal a felületet.
- Ha a **cobas®** 6800/8800 készülékre folyadék ömlik, a **cobas®** 6800/8800 rendszer felhasználói segédletében és/vagy használati útmutatójában leírtak szerint tisztítsa és fertőtlenítsa a készülék(ek) felületét.

A minta levétele, szállítása és tárolása

Megjegyzés: Valamennyi mintát és kontrollt fertőzések átvitelére alkalmasként kell kezelni.

Az összes mintát az előírt hőmérséklettartományban tárolja.

A minták stabilitását a magasabb hőmérséklet befolyásolja.

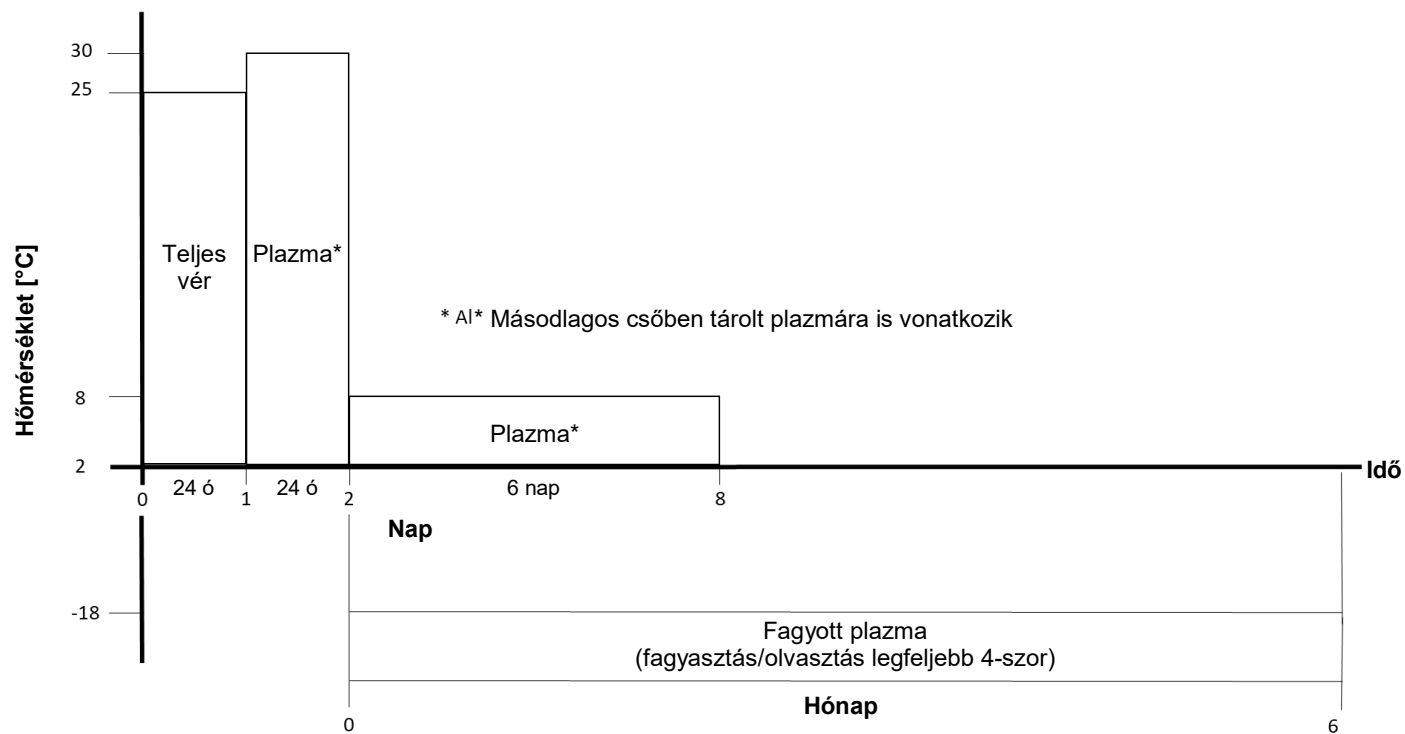
Ha a másodlagos csövekben fagyasztott mintákat használ, tartsa őket szobahőmérsékleten (15–30 °C), amíg teljesen ki nem olvadnak, majd rövid ideig keverje (pl. 3–5 másodpercig vortexelje) és utána centrifugálja, hogy a minta teljes térfogata a cső aljára kerüljön.

Ha centrifugálás után egyes sejtek újraszuszpendálódtak a plazmában, fontolja meg az ismételt centrifugálást, mielőtt feldolgozná a mintát a készülékkel.

Minták

- A teljes vért molekulárdiagnosztikai tesztmódszerekhez való BD Vacutainer® PPT™ plazma-előkészítő csövekbe vagy EDTA véralvadásgátlót tartalmazó steril csövekbe kell levenni. Kövesse a mintavételi cső gyártójának utasításait. Lásd 1. ábra.
- A molekulárdiagnosztikai tesztmódszerekhez való BD Vacutainer® PPT™ plazma-előkészítő csövekbe vagy EDTA véralvadásgátlót tartalmazó steril csövekbe levett teljes vért 24 órán belül 2 °C és –25 °C között lehet tárolni és/vagy szállítani a plazma-előkészítés előtt. A centrifugálást a gyártó utasításai szerint kell végezni.
- A plazmaminták elválasztásuk után 24 órán át 2 °C és 30 °C között tárolhatók elsődleges vagy másodlagos csőben a következők egyike előtt:
 - Tárolás elsődleges vagy másodlagos csőben legfeljebb 6 napig 2 °C és 8 °C között.
 - Tárolás másodlagos csövekben legfeljebb 6 hónapig ≤ –18 °C-on.
- A plazmaminták ≤ –18 °C hőmérsékleten legfeljebb négy fagyasztás–olvasztás ciklusban maradnak stabilak fagyasztva.

1. ábra A minták tárolási feltételei



- Ha a mintákat szállítani kell, a minták és kórokozó anyagok szállítására vonatkozó országos és/vagy nemzetközi előírásoknak megfelelően kell csomagolni és címkézni.

Használati utasítás

Megjegyzések az eljárással kapcsolatban

- Lejáratú idejük után ne használja a **cobas®** EBV reagenseket, a **cobas®** EBV/BKV kontrollkészletet, a **cobas®** puffer negatívkontroll-készletet vagy a **cobas omni** reagenseket.
- A fogyóeszközöket ne használja újra. Csak egyszeri használatra készültek.
- A készülékek megfelelő karbantartásának leírását a **cobas®** 6800/8800 rendszerek felhasználói segédletében és/vagy használati útmutatójában találja.

A cobas® EBV futtatása

A **cobas®** EBV futtatásához használható minimálisan szükséges mintatérfogat 200 µl. A teszteljárás részletes leírását a **cobas®** 6800/8800 rendszerek felhasználói segédletében és/vagy használati útmutatójában találja. Az eljárást az alábbi 2. ábra foglalja össze.

2. ábra A cobas® EBV eljárás

1	Hozzon létre vizsgálatkérés(ek)et
2	Töltse be a reagenseket és fogyóeszközöket a rendszer utasításai szerint: - Töltse be a mosóreagenst, lízisreagenst és hígítót - Töltse be a feldolgozólemezeket és amplifikálólemezeket - Töltse be a mágneses üvegpartikulumokat - Töltse be a teszt-specifikus reagenseket - Töltse be a kontrollkazettákat - Töltse be a hegyállványokat - Cserélje az eltömődött hegy tárolására használt állványt
3	Indítsa a futtatást: válassza a „Start manually” (Kézi indítás) gombot a felhasználói felületen, vagy hagyja, hogy a készülék automatikusan induljon 120 perc elteltével vagy amikor a mintacsoport betelik
4	Tekintse át és fogadja el az eredményeket
5	Vegye ki a reagenseket és fogyóeszközöket: - Vegye ki el az amplifikálólemezeket az elemzőmodulból - Távolítsa el az üres kontrollkazettákat - Távolítsa el a szilárd hulladékot - Távolítsa el a folyékony hulladékot

Eredmények

A **cobas**® 6800/8800 rendszerek automatikusan meghatározzák a minták és kontrollok EBV-DNS-koncentrációját. A EBV DNS-koncentráció mértékegysége a milliliterenkénti nemzetközi egység (IU/ml).

Minőségellenőrzés és az eredmények érvényessége

- Minden feldolgozott mintacsoportba tartozik egy negatív kontroll [(-) C] és két pozitív kontroll, egy alacsony pozitív kontroll [EBV/BKV L(+)C] és egy magas pozitív kontroll [EBV/BKV H(+)C].
- A mintacsoport érvényes eredményének biztosítása érdekében figyelje a jelzőket és a hozzájuk tartozó eredményeket a **cobas**® 6800/8800 szoftverben és/vagy jelentésben.
- A mintacsoport érvényes, ha a három kontroll egyike sem kapott jelzőt. Egy negatív és két pozitív kontroll van: EBV L(+)C, EBV H(+)C. A negatív kontroll eredménye „(-) C”-ként jelenik meg, az alacsony és magas pozitív kontroll eredménye pedig „EBV/BKV L(+)C” és „EBV/BKV H(+)C”.

A **cobas**® 6800/8800 szoftver automatikusan érvényteleníti az eredményeket a negatív és pozitív kontrollok érvénytelensége alapján.

Kontrolljelzések

9. táblázat A negatív és pozitív kontrollok kontrolljelzései

Negatív kontroll	Jelzés	Eredmény	Magyarázat
(-) C	Q02 (A kontrollcsoport sikertelen)	Invalid	Érvénytelen eredmény, vagy a negatív kontroll számított titereredménye nem negatív.
Pozitív kontroll	Jelzés	Eredmény	Magyarázat
EBV/BKV L(+)C	Q02 (A kontrollcsoport sikertelen)	Invalid	Érvénytelen eredmény vagy az alacsony pozitív kontroll számított titer eredménye nem esik a megadott tartományba.
EBV/BKV H(+)C	Q02 (A kontrollcsoport sikertelen)	Invalid	Érvénytelen eredmény vagy a magas pozitív kontroll számított titer eredménye nem esik a megadott tartományba.

Ha a kontrollmintacsoport érvénytelen, ismételje meg az érintett csoport minden mintájának a tesztelését.

Az eredmények értelmezése

Érvényes mintacsoport esetén ellenőrizze az egyes minták jelzőit a **cobas®** 6800/8800 szoftverben és/vagy jelentésben. Az eredményeket így kell értelmezni:

- Egy érvényes csoport érvényes és érvénytelen mintaeredményeket is tartalmazhat.

10. táblázat Az egyes targetek eredményének értelmezése

Eredmények	Magyarázat
Target Not Detected	Nincs kimutatható EBV DNS. Az eredmény a jelentésben „EBV not detected” (Nincs kimutatható EBV).
< Titer Min ^a	A számított titer a vizsgálat alsó mennyiségi meghatározási határa (LLOQ) alatt van. Az eredmény a jelentésben „EBV detected, less than (Titer Min)” (A kimutatott EBV titere nem éri el a minimális értéket). Titer min = 35,0 IU/ml
Titer	A számított titer a teszt lineáris tartományába esik: legalább Titer Min, és legfeljebb Titer Max. Az eredmény a jelentésben „(Titer) of EBV detected” (Adott titerű EBV mutatható ki).
> Titer Max ^b	A számított titer a vizsgálat felső mennyiségi meghatározási határa (ULOQ) fölött van. Az eredmény a jelentésben „EBV detected, greater than (Titer Max)” (A kimutatott EBV titere meghaladja a maximális értéket). Titer max = 1,0E+08 IU/ml

^a Ha a mintaeredmény „< Titer Min” (a kimutatott target < az alsó mennyiségi meghatározási határ), a többi klinikai adattal együtt kell értelmezni őket, és nem szabad csak rájuk alapozva kezelési döntéseket hozni.

^b A minta eredménye „> Titer Max” olyan kimutatott EBV-pozitív titert jelent, ami meghaladja a felső mennyiségi meghatározási határt (ULOQ). Ha mennyiségi eredményre van szükség, hígítsa az eredeti mintát EBV-negatív humán EDTA-s plazmával, és tesztelje újra. Szorozza meg a mért eredményt a hígítási faktoral.

Az eljárással kapcsolatos korlátozások

- A **cobas®** EBV tesztet a **cobas®** EBV/BKV kontrollkészlet, a **cobas®** puffer negatívkontroll-készlet, a **cobas omni** MGP reagens, a **cobas omni** lízisreagens, a **cobas omni** mintaoldószer és a **cobas omni** mosóreagens használatával értékelték ki a **cobas®** 6800/8800 rendszereken.
- A megbízható eredmény a megfelelő mintalevételen, -tároláson és -kezelési eljárásokon múlik.
- Ezt a tesztet csak EDTA-s plazmával való használatra validálták. Más típusú minták tesztelése a **cobas®** EBV tesztel pontatlan eredménnyel járhat. A plazma víruskoncentráció-mérési eredményei nem hasonlíthatók közvetlenül össze az egyéb mintatípusok eredményeivel.
- Az EBV-DNS mennyiségi meghatározását befolyásolhatja a mintavételi mód, a beteggel kapcsolatos tényezők (azaz a kor és a tünetek jelenléte) és/vagy a fertőzés stádiuma.
- Mint minden molekuláris teszt esetén, a **cobas®** EBV targetrégióiban előforduló mutációk is hatással lehetnek a primerek és/vagy próbák kötődésére, ami miatt a vírus kimutatott mennyisége kevesebb lesz, vagy a teszt nem mutatja ki a vírus jelenlétét.
- A technológiák különbözősége miatt javasolt, hogy az egyik technológiáról a másikra való áttéréskor a felhasználók végezzenek korrelációs laboratóriumi vizsgálatokat, hogy a technológiák közötti különbség minősíthető legyen. A felhasználóknak a helyi specifikus irányelveket/eljárásokat kell követniük.
- A **cobas®** EBV tesztnek nem célja a EBV vérben vagy vértermékekben való szűrése.

A nem klinikai teljesítmény értékelése

A fontosabb teljesítményjellemzők

Kimutatási határ (LoD)

WHO Nemzetközi standard

A **cobas®** EBV kimutatási határát a WHO 1. nemzetközi EBV standardja sorozathígításainak elemzésével állapították meg EBV-negatív humán EDTA-s plazmában (WHO 1. nemzetközi Epstein-Barr vírus standardja nukleinsav-amplifikációs technológiához; NIBSC 09/260). Hat koncentrációsintzből és egy referenciamintából álló paneleket teszteltek a **cobas®** EBV reagensek három gyártási tételével, több futtatásban, napon, kezelővel és készüléken.

Az EDTA-s plazmából származó eredményeket a 11. táblázatban – 13. táblázatban tartalmazza. A vizsgálat szerint a legkevésbé érzékeny gyártási tétel esetén PROBIT-elemzés szerinti 95%-os találati arány 18,8 IU/ml koncentrációnál várható, és a 95%-os konfidenciaintervallum 14,5–27,5 IU/ml EDTA-s plazmában. $\geq 95\%$ -os találati arányt legalább 20,0 IU/ml koncentrációnál figyeltek meg EDTA-s plazmánál.

11. táblázat Kimutatási határ EDTA-s plazmában, 1. gyártási tétel

Bemeneti titer koncentrációja (EBV DNS, IU/ml)	Érvényes ismétlések száma	Pozitívok száma	Találati arány (%)
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
LoD PROBIT szerinti 95% találati arány mellett	18,8 IU/ml 95% konfidenciaintervallum: 14,5–27,5 IU/ml		

12. táblázat Kimutatási határ EDTA-s plazmában, 2. gyártási tétel

Bemeneti titer koncentrációja (EBV DNS, IU/ml)	Érvényes ismétlések száma	Pozitívok száma	Találati arány (%)
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
LoD PROBIT szerinti 95% találati arány mellett	12,4 IU/ml 95% konfidenciaintervallum: 10,0–17,0 IU/ml		

13. táblázat Kimutatási határ EDTA-s plazmában, 3. gyártási tétel

Bemeneti titer koncentrációja (EBV DNS, IU/ml)	Érvényes ismétlések száma	Pozitívok száma	Találati arány (%)
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
LoD PROBIT szerinti 95% találati arány mellett	18,6 IU/ml 95% konfidenciaintervallum: 14,4–27,1 IU/ml		

Lineáris tartomány

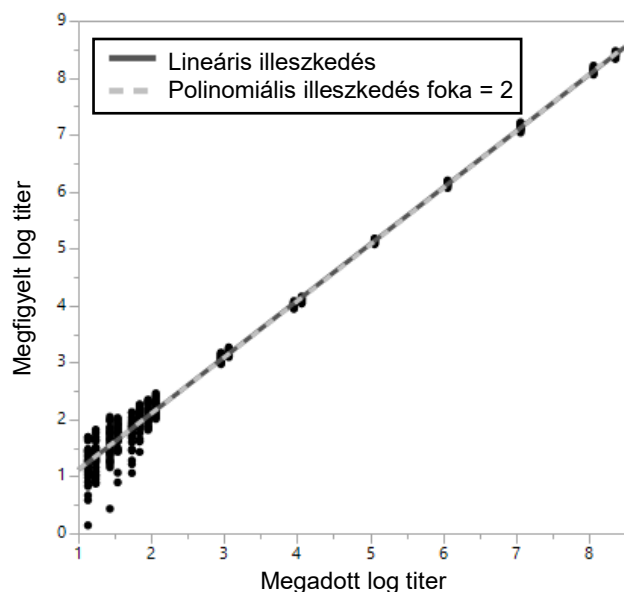
A **cobas**® EBV teszt linearitását 17 paneltagból álló hígítási sorozat elemzésével végezték, ahol az EBV 1. genotípusának DNS-e lefedte a teszt lineáris tartományát. Magas titerű lambda DNS-törzsből készítettek 11 paneltagot, amely lefedte a teljes lineáris tartományt. Egy klinikai mintából 6 paneltagot készítettek, amely lefedte a lineáris tartomány középső és alsó részét.

Minden paneltagot 36 ismétlésben tesztelték a **cobas**® EBV reagensek három gyártási tételével; a vizsgálat eredményeit a 3. ábra tartalmazza.

A **cobas**® EBV lineárisnak bizonyult 1,40E+01 IU/ml és 2,30E+08 IU/ml között, és az abszolút eltérés a jobban illeszkedő nemlineáris regressziótól nem nagyobb mint $\pm 0,1 \log_{10}$ humán EDTA-s plazmában (lásd 3. ábra).

A lineáris tartományban a teszt pontossága $\pm 0,2 \log_{10}$ értéken belül volt.

3. ábra A lineáris tartomány meghatározása EDTA-s plazmában



Pontosság – laboratóriumon belül

A **cobas®** EBV pontosságát magas titerű EBV-DNS (1-es genotípus) sorozathígításainak elemzésével határozták meg EBV-negatív EDTA-s plazmában. Hat hígítási szintet vizsgáltak szintenként 72 ismételéssel a **cobas®** EBV reagensek három gyártási tételével, három készüléken és három kezelővel, 12 napon keresztül. Minden mintát végigvittek a teljes **cobas®** EBV eljárás a teljesen automatizált **cobas®** 6800/8800 rendszereken. Ezért az itt közölt pontosság a vizsgálati eljárás valamennyi aspektusát reprezentálja. Az eredményeket a 14. táblázatban tartalmazza.

A **cobas®** EBV nagy pontosságot mutatott a reagensek három gyártási tételén az 1,08E+02 IU/ml – 5,40+07 IU/ml koncentrációtartományban.

14. táblázat A **cobas®** EBV laboratóriumi pontosságán belül

Névleges koncentráció [IU/ml]	Megadott koncentráció [IU/ml]	EDTA-s plazma			
		1. tétel	2. tétel	3. tétel	Összes gyártási tétel
		SD	SD	SD	Poolozott SD
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

Genotípus szerinti ellenőrzés

A **cobas®** EBV teljesítményét az EBV 2-es genotípusán a következőkkel értékelték ki:

- A kimutatási határ ellenőrzése
- A lineáris tartomány ellenőrzése

A kimutatási határ ellenőrzése a 2-es genotípusra

Az EBV-DNS 2-es genotípusát három különböző koncentrációsintre hígították EBV-negatív EDTA-s plazmával. A találati arány megállapítását minden szint esetén 63 ismételéssel végezték. A tesztelést a **cobas®** EBV reagensek három gyártási tételével végezték több munkamenetben, napon, kezelővel és készüléken. Az eredmények igazolják, hogy a **cobas®** EBV az EBV-DNS 2-es genotípusát $\geq 95\%$ -os találati aránnyal 18,8 IU/ml koncentrációnál mutatja ki.

A lineáris tartomány ellenőrzése a 2-es genotípusra

A **cobas®** EBV-genotípusok linearitási vizsgálatában használt hígítási sorozat nyolc paneltagból állt, amelyek lefedték a teszt lineáris tartományát. A tesztelést a **cobas®** EBV reagens három gyártási tételével végezték. Szintenként 12 ismételést teszteltek EDTA-s plazmában.

A **cobas®** EBV lineáris tartományát a 2-es genotípusra igazolták.

Specifitás

A **cobas®** EBV specifitását különböző donoroktól származó EBV-negatív EDTA-s plazmaminták elemzésével határozták meg. Százegy különböző EDTA-s plazmamintát teszteltek a **cobas®** EBV reagensek három gyártási tételével. A teszt szerint valamennyi minta negatív volt EBV-DNS-re. A tesztpanelben a **cobas®** EBV specifitása 100% volt (97,08% értékű alsó egyoldali 95%-os konfidenciaintervallum).

Analitikai specificitás

A **cobas®** EBV analitikai specificitását mikroorganizmusok panelje hígításainak elemzésével állapították meg EBV-DNS-pozitív és EBV-DNS-negatív EDTA-s plazmában. A koncentráció 1,00E+06 egység/ml (sejt/ml, CFU/ml, IFU/ml, CCU/ml) volt baktériumok és élesztőgomba esetén, és 3,00E+05 és 1,00E+06 egység/ml (IU/ml, kópia/ml, sejt/ml, TCID₅₀/ml) vírusok esetén. A tesztelt organizmusokat a 15. táblázatban tartalmazza. Minden paneltagot a **cobas®** EBV tesztel vizsgálták. A nem EBV kórokozók egyike sem mutatott zavaró hatást a teszt teljesítményére.

15. táblázat Keresztreaktivásra vizsgált mikroorganizmusok

Vírusok	Baktériumok	Sarjadzógomba
Adenovírus 5-ös típus	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BK Polyomavírus	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Cytomegalovírus	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Hepatitis B vírus	<i>Clostridium perfringens</i>	
Hepatitis C vírus	<i>Enterococcus faecalis</i>	
Herpes simplex vírus, 1-es típus	<i>Escherichia coli</i>	
Herpes simplex vírus, 2-es típus	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Humán herpeszvírus, 6-os típus	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Humán herpeszvírus, 7-es típus	<i>Mycobacterium avium</i>	
Humán herpeszvírus, 8-as típus	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Humán immundeficiencia vírus 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Humán immundeficiencia vírus 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Humán papillomavírus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
JC vírus	<i>Salmonella enterica</i>	
Parvovírus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
SV40		
Varicella-zoster vírus		

Analitikai specificitás – zavaró anyagok

Magas triglicerid (33,0 g/l), konjugált bilirubin (0,2 g/l), nem konjugált bilirubin (0,2 g/l), albumin (60,0 g/l), hemoglobin (2,0 g/l) és humán DNS (2 mg/l) tartalmú mintákat teszteltek EBV DNS jelenlétében, illetve hiányában. A vizsgált endogén anyagok nem mutattak zavaró hatást a **cobas®** EBV teszt teljesítményével.

A 16. táblázatban felsorolt gyógyszerkeverékeket is vizsgálták a C_{max} háromszorosánál, EBV DNS jelenlétében, illetve hiányában.

A vizsgálat minden potenciálisan zavaró anyagról kimutatta, hogy nincs hatással a teszt teljesítményére.

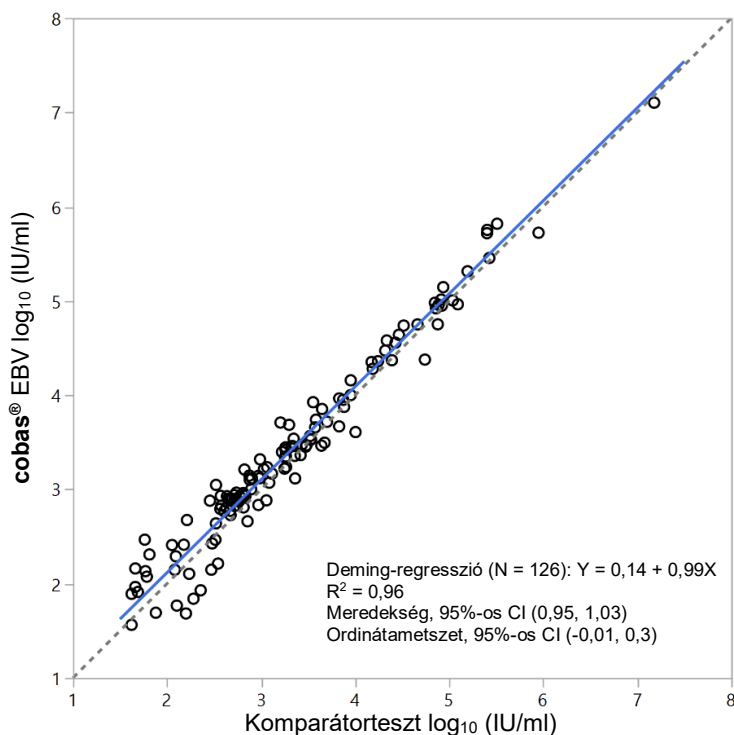
16. táblázat A cobas® EBV teszt EBV DNS mennyiségi meghatározását esetlegesen zavaró gyógyszerkeverékek vizsgálata

Gyógyszerosztály	Gyógyszer generikus neve	
Antimikrobiális	Cefotetan	Sulfamethoxazol
	Kálium-klavulanát	Ticarcillin dinátrium
	Flukonazol	Trimethoprim
	Piperacillin	Vancomycin
	Tazobactam nátrium	Mikafungin
Herpes vírusok kezelésére szolgáló vegyületek	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Acyclovir	Letermovir
Immunszuppresszív szerek	Azathioprin	Prednizon
	Cyclosporin	Sirolimus
	Everolimus	Tacrolimus
	Mycophenolát mofetil	Mikofenolsav

Módszerkorreláció

A cobas® EBV teljesítményét komparátortesztel hasonlították össze EBV-fertőzött betegek EDTA-s plazmamintáinak elemzésével. A mindkét teszt mennyiségi meghatározási tartományába eső EDTA-s plazmamintákat egy ismétléssel tesztelték. Deming-regressziós analízist végeztek.

A Deming-regresszióanalízis eredményeit a 4. ábra tartalmazza.

4. ábra A cobas® EBV és a komparátorteszt összehasonlítása regresszióelemzéssel

Teljes rendszerhiba

A **cobas**® EBV teljes rendszerhiba-arányát EBV-pozitív klinikai mintával oltott EDTA-s plazma 100 ismétlésével határozták meg. Ezeket a mintákat a kimutatási határ háromszorosának megfelelő koncentráción vizsgálták ($3 \times \text{LoD}$).

A vizsgálat eredményei szerint az összes ismétlés teszteredménye érvényes és az EBV targetre pozitív volt, vagyis a teljes rendszerhiba aránya 0% (2,95% értékű felső egyoldali 95%-os konfidenciaintervallum).

Keresztszennyeződés

A **cobas**® EBV keresztszennyeződési arányát egy EBV-negatív mátrixminta 240 ismétlésével és egy magas titerű (kb. $2,00\text{E}+07$ IU/ml) EBV-minta 225 ismétlésével határozták meg. Összesen öt futtatást végeztek pozitív és negatív mintákkal, sakktáblaszerű konfigurációban.

A negatív minták mind a 240 ismétlése negatív volt, vagyis a keresztszennyeződési arány 0% (egyoldali, felső, 1,24% értékű 95%-os konfidenciaintervallum).

További információk

A teszt legfontosabb tulajdonságai

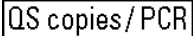
Mintatípus	EDTA-s plazma
Minimálisan szükséges mintamennyiség	350 µl*
Mintafeldolgozási térfogat	200 µl
Analitikai érzékenység	18,8 IU/ml
Lineáris tartomány	35,0 IU/ml – 1E+08 IU/ml
Specifitás	100%
Kimutatott genotípusok	EBV 1-es és 2-es genotípusa

* **cobas omni** másodlagos csövek esetében 150 µl-es holt térfogattal kell számolni. A teszthez használt egyéb csöveknek eltérő holt térfogata lehet, és a minimális térfogat is eltérhet.

Szimbólumok

A Roche PCR diagnosztikai termékek jelölésére a következő szimbólumokat használják.

17. táblázat A Roche PCR diagnosztikai termékek címkéjén használt szimbólumok

	Segédsoftver		Megadott tartomány alsó határa		Negatív kontroll
	Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben		Megadott tartomány felső határa		Pozitív kontroll
	Vonalkód adatlap		Sötétben tárolandó		Kontroll
	Lotszám		Tartalma <n> vizsgálathoz elegendő		Megadott tartomány (kópia/ml)
	Biológiai veszély		Hőmérsékletkorlát		Megadott tartomány (IU/ml)
	Katalógusszám		Vizsgálatdefiníciós fájl		Szokásos eljárás
	Olvassa el a használati útmutatót		Gyártó		Ultraérzékeny eljárás
	A csomag tartalma		Lejárat dátuma		QS-kópiák száma PCR-reakciónként; használja a QS-kópiák reakciónkénti számát az eredmények számításához.
	Forgalmazó		Globális kereskedelmi cikkszám		QS-IU-k száma PCR-reakciónként; használja a QS-IU-k (nemzetközi egységek) reakciónkénti számát az eredmények számításához.
	Csak IVD teljesítmény értékelésre		Sorozatszám	 CE megfelelőségi jelzés: ez az eszköz megfelel az <i>in vitro</i> diagnosztikai felhasználású orvostechnikai eszközök CE jelölésére vonatkozó előírásoknak.	
Rx Only	Csak az USA-ban: Az USA szövetségi törvényei értelmében az eszköz csak orvos részére vagy rendelvényére adható ki.		Gyártás napja		
	<i>In vitro</i> diagnosztikai felhasználásra		Ne használja újra azokat		

Felhasználói technikai segítségnyújtás az Egyesült Államokban 1-800-526-1247

Gyártó és forgalmazók

18. táblázat Gyártó és forgalmazók



Roche Molecular Systems, Inc.
1080 US Highway 202 South
Branchburg, NJ 08876 USA
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)

Védjegyek és szabadalmak

Lásd: <http://www. Roche -diagnostics.us/patents>

Szerzői jogok

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Hivatkozások

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 JL. 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-IGD), 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.

Dokumentumverzió

Dokumentum verzióinformációi	
Doc Rev. 2.0 08/2020	A másodlagos csövek (≤ -18 °C-os) tárolásának maximális ideje 6 hónapra nőtt. A Figyelmeztetések és óvintézkedések részben új megjegyzés a keresztzennyeződés elkerüléséről. A Helyes laboratóriumi gyakorlat rész frissítve. A Minta levétele, szállítása és tárolása részben új megjegyzés a minták újracentrifugálásáról. Az Eredmények értelmezése rész 10. táblázatában új lábjegyzet a < Titer Min eredményekről. A harmonizált szimbólumok oldala frissítve. Esetleges kérdésével forduljon a Roche helyi képviselőjéhez.