

cobas[®] BKV

Test pentru detectarea cantitativă a acizilor nucleici folosit pe sistemele cobas[®] 5800/6800/8800

Destinat diagnosticării *in vitro*

cobas[®] BKV

P/N: 09040960190

Pentru utilizare pe sistemul cobas[®] 5800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 09051953190

Pentru utilizare pe sistemele cobas[®] 6800/8800

cobas[®] EBV/BKV Control Kit

P/N: 08688214190 sau
P/N: 09040951190

cobas[®] Buffer Negative Control Kit

P/N: 07002238190 sau
P/N: 09051953190

Cuprins

Utilizare preconizată	5
Rezumatul și explicarea testului.....	5
Reactivi și materiale	8
Reactivi și controale cobas® BKV	8
Reactivi cobas® omni pentru prepararea probei	11
Cerințe de păstrare și manipulare ale reactivilor	12
Condiții de manipulare a reactivilor pentru sistemul cobas® 5800.....	12
Condiții de manipulare a reactivilor pentru sistemele cobas® 6800/8800	13
Materiale suplimentare necesare pentru sistemul cobas® 5800.....	14
Materiale suplimentare necesare pentru sistemele cobas® 6800/8800	15
Aparatură și aplicații software necesare	16
Precauții și exigențe de manipulare	17
Avertismente și precauții.....	17
Manipularea reactivilor	18
Bunele practici de laborator	18
Recoltarea, transportarea și păstrarea probelor	19
Probe de plasmă EDTA	19
Probe de urină.....	20
Instrucțiuni de utilizare.....	21
Note referitoare la procedură.....	21
Efectuarea testului cobas® BKV pe sistemul cobas® 5800	21
Efectuarea testului cobas® BKV pe sistemele cobas® 6800/8800	23
Rezultate	24
Controlul calității și validitatea rezultatelor pe sistemul cobas® 5800.....	24
Rezultatele controalelor pe sistemul cobas® 5800.....	24

Controlul calității și validitatea rezultatelor pentru sistemele cobas ® 6800/8800	24
Marcajele controalelor pe sistemele cobas ® 6800/8800.....	25
Interpretarea rezultatelor	25
Interpretarea rezultatelor pe sistemul cobas ® 5800	26
Interpretarea rezultatelor pe sistemele cobas ® 6800/8800.....	26
Limitări procedurale	27
Evaluarea performanței non-clinice	28
Caracteristici de performanță cheie pentru tipul de probă plasmă EDTA obținute cu sistemele cobas ® 6800/8800.....	28
Standardul internațional OMS pentru limita de detecție (LoD)	28
Interval liniar.....	29
Precizia — în cadrul laboratorului	30
Verificarea subtipului.....	31
Specificitate.....	31
Specificitate analitică.....	31
Specificitatea analitică — substanțe care interferează.....	33
Corelarea metodei.....	33
Eșec la nivelul întregului sistem.....	34
Contaminare încrucișată.....	34
Caracteristici de performanță cheie pentru tipul de probă de urină obținute cu sistemele cobas ® 6800/8800.....	35
Standardul internațional OMS pentru limita de detecție (LoD)	35
Interval liniar.....	36
Precizia — în cadrul laboratorului	37
Verificarea subtipului.....	38
Specificitate.....	38
Specificitate analitică	38
Specificitatea analitică — substanțe care interferează.....	39
Corelarea metodei.....	41
Contaminare încrucișată.....	41

Evaluarea performanței cheie realizată pe sistemele cobas® 6800/8800 42

Reproductibilitatea cobas® BKV pentru tipul de probă plasmă EDTA.....	42
Performanța cobas® BKV pentru tipul de probă plasmă EDTA	43
Reproductibilitatea cobas® BKV pentru tipul de probă urină stabilizată	45
Performanța cobas® BKV pentru tipul de probă urină stabilizată	46
Echivalența sistemelor / compararea sistemelor	48

Informații suplimentare 49

Componente de testare cheie.....	49
Simboluri	50
Asistență tehnică	51
Producător și importator.....	51
Mărci comerciale și brevete.....	51
Copyright.....	51
Referințe	52
Versiune document.....	53

Utilizare preconizată

cobas® BKV este un test *in vitro* de amplificare a acidului nucleic pentru detectarea cantitativă a ADN-ului virusului BK (BKV) în plasma EDTA umană și urina stabilizată în **cobas® PCR Media**.

În plasma EDTA, **cobas® BKV** este destinat folosirii ca ajutor în diagnosticarea și gestionarea pacienților cu BKV care au suferit un transplant. La pacienții cu monitorizare continuă a BKV în plasma EDTA, pot să fie folosite măsurări în serie ale ADN-ului pentru a indica necesitatea potențialelor modificări ale tratamentului și pentru a evalua răspunsul viral la tratament.

În urina stabilizată în **cobas® PCR Media**, **cobas® BKV** este destinat folosirii ca ajutor în diagnosticarea și gestionarea pacienților cu BKV care au suferit un transplant.

Rezultatele provenite de la **cobas® BKV** trebuie să fie interpretate în contextul tuturor constatărilor relevante clinice și de laborator.

cobas® BKV nu este destinat folosirii ca test de screening pentru sânge sau produse derivate din sânge.

Rezumatul și explicarea testului

Informații de bază

Beneficiarii transplantului prezintă un risc crescut de a dezvolta numeroase infecții virale și bacteriene care foarte probabil vor genera efecte adverse privind starea de sănătate la populația de pacienții cu transplant în comparație cu populația sănătoasă generală. Acest risc crescut este atribuit parțial funcției diminuate a sistemului imunitar, cauzată de medicamentele imunosupresive pe care pacienții cu transplant le primesc pentru a reduce probabilitatea de respingere a grefei.^{1, 2}

Virusul BK (BKV) este un virus mic (~5 kb), cu acid dezoxiribonucleic (ADN) fără pericapsidă care aparține familiei poliomavirusurilor. Există patru subtipuri majore de BKV, dintre care subtipul I este cel mai frecvent detectat (80%), urmat de subtipul IV (15%).³ Seroprevalența BKV este > 80% la populația adultă sănătoasă generală.⁴ La persoanele imunocompetente, BKV nu este asociat cu o patologie semnificativă. Cu toate acestea, infecția cu BKV poate să ducă la boli clinice grave la persoanele imunocompromise, inclusiv la beneficiarii transplantului.⁵

Infecțiile cu BKV se manifestă de obicei în rinichi și în tractul urinar. După infecția primară, virusul rămâne latent în epiteliul tubului renal și în epiteliul ureteral și poate să fie reactivat la persoanele imunocompromise. Pacienții cu transplant de rinichi prezintă un risc crescut de apariție a complicațiilor asociate cu BKV în comparație cu beneficiarii altor tipuri de transplanturi, inclusiv nefropatia asociată cu poliomavirus (PVN) și stenoza ureterală. PVN apare la până la 10% din beneficiarii de transplant de rinichi și aproximativ 50% dintre pacienții afectați de PVN vor experimenta un eșec al grefei transplantate. În plus, aproximativ 3% dintre beneficiarii de transplant de rinichi dezvoltă stenoza uretrală asociată BKV.⁵ Transplanturile de celule stem hematopoietice (HSCT) prezintă, de asemenea, complicații asociate BKV cu o frecvență mai mare, de obicei sub forma cistitei hemoragice (HC). Între 5 și 15% dintre pacienții cu HSCT dezvoltă HC.¹

Orientările recomandă monitorizarea periodică a BKV la pacienții cu transplant de rinichi până la 5 ani după transplant.⁶ Această abordare de monitorizare poate să identifice 80–90% dintre pacienții cu risc de PVN. Testarea plasmei pentru viremia BKV este recomandată ca parte a strategiei de identificare a pacienților cu risc crescut de PVN, fie ca un test de confirmare pentru pacienții la care se detectează viruria BKV, fie ca modalitate principală de testare pentru screeningul de

rutină.⁶ În prezent nu există recomandări pentru monitorizarea de rutină a BKV la pacienții cu HSCT, iar testarea este recomandată în principal pentru evaluarea pacienților cu hematurie și simptome clinice de cistită. Cu toate acestea, un nivel de ADN BKV mai mare de 10.000 copii/ml este asociată cu un risc mai mare de HC la pacienții cu transplant.⁷

Pentru pacienții cu transplant de rinichi care manifestă o creștere constantă a nivelurilor de ADN BKV în sânge, definite de obicei ca o măsurare de peste 10.000 copii/ml, testarea BKV în plasmă se recomandă la fiecare 1–2 săptămâni până când nivelul ADN este la un nivel nedetectabil în cadrul a două măsurări consecutive.

Multe teste de laborator pentru cuantificarea BKV nu sunt standardizate, ducând la o variabilitate ridicată între laboratoare și între teste.^{6,7} În plus, conținutul urinei pot să ducă la agregarea BKV, ceea ce poate, de asemenea, să afecteze variabilitatea cantitativă.^{8,9} Evaluarea formală a reproductibilității și validității nivelurilor de ADN BKV este esențială pentru asigurarea unor rezultate uniforme (indiferent de ce laborator ce test a efectuat) pentru gestionarea clinică a pacienților cu boli asociate BKV.

În timp ce pragul viral relevant medical exact este încă subiect de dezbateri din cauza variabilității între analize, conceptul de prag critic pare valid și a fost raportat în studii de evoluție naturală care arată corelația dintre nivelurile ADN BKV mai mari și riscul crescut de dezvoltare a PVN și HC.^{6,7}

Motivul pentru testarea NAT

Serologia poliomavirusului nu este de obicei folosită în context clinic: este doar o valoare pentru a determina dacă un pacient a fost infectat în trecut cu BKV și există risc de reactivare. Metodele de cultivare a virusului au o durată lungă de obținere a rezultatului și, deoarece sunt semicantitative, sunt folosite limitat la pacienții imunocompromiși la care sunt frecvente nivelurile scăzute de virus. Detectarea directă a ADN BKV prin metodele PCR în timp real oferă în mod potențial un interval dinamic vast, precizie, sensibilitate și specificitate optime pentru folosirea în cazul pacienților cu transplant.

Explicarea testului

cobas® BKV este un test cantitativ realizat cu sistemele **cobas®** 5800/6800/8800. **cobas®** BKV permite detectarea și determinarea cantitativă a ADN BKV în plasma EDTA și urina stabilizată în **cobas®** PCR Media a pacienților infectați. Nivelul de ADN BKV este determinat cantitativ față de un standard de determinare cantitativă a ADN non-BKV (DNA QS) care este introdus în fiecare specimen în timpul prelucrării probei. DNA-QS funcționează și pentru a monitoriza întregul proces de pregătire a probei și amplificare PCR. Testul utilizează, de asemenea, trei controale externe: un control pozitiv cu titru ridicat, un control pozitiv cu titru scăzut și un control negativ. Controalele externe pozitive cu titru ridicat și cu titru scăzut sunt realizate prin diluarea materialului inițial cu un titru trasabil la standardul internațional OMS pentru BKV. Fiecare lot al kitului de amplificare/detectare este calibrat pentru a fi trasabil la standardul internațional OMS pentru BKV.

Principiile procedurii

Procedura **cobas®** BKV se bazează pe o preparare complet automatizată a probelor (extracția și purificarea acidului nucleic), urmată de amplificare și detectare PCR. Sistemele **cobas®** 5800 este conceput ca instrument unic integrat. Sistemele **cobas®** 6800/8800 sunt alcătuite dintr-un modul de alimentare a probelor, un modul de transfer, un modul de procesare și un modul analitic. Gestionarea automată a datelor este efectuată de aplicația software a sistemului **cobas®** 5800 sau **cobas®** 6800/8800 care alocă rezultatele testului pentru toate testele respectiv fie țintă nedetectată, ADN BKV detectat < LLoQ (limita inferioară de cuantificare), ADN BKV detectat > ULQ (limita superioară de cuantificare), fie o valoare

din intervalul liniar $LLOQ < x < ULOQ$. Rezultatele pot fi consultate direct pe ecranul sistemului, pot fi exportate sau pot fi imprimate sub formă de raport.

Acidul nucleic din probele pacienților și moleculele DNA-QS lambda adăugate sunt extrase simultan. Pe scurt, acidul nucleic viral este eliberat prin adăugarea proteinazei și a reactivului de lizare la probă. Acidul nucleic eliberat se leagă de suprafața de dioxid de siliciu a particulelor de sticlă magnetice adăugate. Substanțele nelegate și impuritățile, precum proteinele denaturate, reziduurile celulare și potențialii inhibitori PCR sunt îndepărtate în etapele ulterioare cu reactiv de spălare, iar acidul nucleic purificat este eluat din particulele de sticlă cu soluție tampon de eluție la temperaturi ridicate.

Amplificarea selectivă a acidului nucleic țintă din probă este obținută prin folosirea abordării specifice a virusului cu țintă dublă din regiunile foarte bine conservate ale BKV aflate în regiunea mică a antigenului t al BKV și în regiunea VP2 a BKV. Amplificarea selectivă a DNA-QS este realizată prin utilizarea de primeri sens și antisens specifici secvenței care sunt selectați să nu prezinte omologie cu genomul BKV. Pentru amplificare, se utilizează o enzimă ADN polimerază termostabilă. Secvențele țintă și DNA-QS sunt amplificate simultan utilizând un profil de amplificare PCR universal cu pași de temperatură predefiniți și număr de cicluri predefinit. Reactivul master mix include deoxiuridină trifosfat (dUTP), în loc de deoxitimidină trifosfat (dTTP), încorporată în ADN-ul nou-sintetizat (amplicon).¹⁰⁻¹² Orice amplicon contaminant din ciclurile PCR anterioare este distrus de enzima AmpErase, inclusă în mixul PCR, în timpul încălzirii din prima etapă termică a ciclului. Cu toate acestea, ampliconul nou-format nu este eliminat, deoarece enzima AmpErase este inactivată în urma expunerii la temperaturi de peste 55 °C.

Master mixul **cobas®** BKV conține două sonde de detecție specifice secvențelor țintă BKV și una pentru DNA-QS. Sondele sunt marcate cu coloranți raportor fluorescenți specifici țintei care permit detectarea simultană a țintei BKV și a DNA-QS în două canale țintă diferite.^{13, 14} Semnalul fluorescent al sondelor intacte este suprimat de colorantul de anihilare. În timpul etapei de amplificare PCR, hibridizarea sondei la șabloanele ADN monocatenar specifice duce la scindare prin activitatea 5'-3' nucleazică a ADN-polimerazei, ceea ce contribuie la separarea colorantului raportor de colorantul de anihilare și la generarea unui semnal fluorescent. În urma fiecărui ciclu PCR, se amplifică în paralel numărul tot mai mare de sonde scindate și semnalul cumulativ al colorantului raportor. Detectarea și diferențierea în timp real a produselor PCR se realizează prin măsurarea fluorescenței coloranților raportor eliberați pentru țintele virale și DNA-QS.

Reactivi și materiale

Reactivi și controale cobas® BKV

Materialele furnizate pentru cobas® BKV se regăsesc în Tabelul 1. Materiale necesare, dar nefurnizate se regăsesc în Tabelul 2 – Tabelul 4 și Tabelul 8 – Tabelul 10.

Consultați secțiunea **Reactivi și materiale**, respectiv **Precauții și exigențe de manipulare** pentru informații referitoare la riscurile asociate produsului.

Tabelul 1 cobas® BKV

cobas® BKV

A se păstra la 2–8 °C

casetă cu 192 de teste (P/N 09040960190)

Componente kit	Ingrediente reactiv	Cantitate per kit 192 de teste
Soluție proteinază (PASE)	Soluție tampon Tris, < 0,05% EDTA, clorură de calciu, acetat de calciu, 8% proteinază, glicerol EUH210: Fișa cu date de securitate disponibilă la cerere. EUH208: Conține subtilizină din <i>Bacillus subtilis</i> . Poate provoca o reacție alergică.	22,3 ml
Standard de cuantificare a ADN-ului (DNA QS)	Soluție tampon Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% construcție ADN non-BKV care conține o regiune de legare a primerului non-BKV și a sondei unice (ADN neinfecțios), < 0,002% ARN poli rA (sintetic), < 0,1% azidă de sodiu	21,2 ml
Tampon de eluție (EB)	Tampon Tris, 0,2% metil-4 hidroxibenzoat	21,2 ml
Reactiv Master Mix 1 (MMX-R1)	Acetat de mangan, hidroxid de potasiu, < 0,1% azidă de sodiu	7,5 ml
Master Mix BKV Reactiv 2 (BKV MMX-R2)	Soluție tampon tricină, acetat de potasiu, < 18% dimetil sulfoxid, glicerol, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% primeri în amonte și aval BKV, < 0,01% primeri sens și antisens ai standardului de cuantificare, < 0,01% sonde oligonucleotidice marcate fluorescent specifice pentru BKV și standardul de cuantificare BKV, < 0,01% aptamer oligonucleotidă, < 0,01% ADN polimerază Z05D, < 0,10% enzimă AmpErase (uracil-N-glicozilază) (microbiană), < 0,1% azidă de sodiu	9,7 ml

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

A se păstra la 2–8 °C

Pentru utilizare pe sistemul **cobas®** 5800 (P/N 09040951190)Pentru utilizare pe sistemele **cobas®** 6800/8800 (P/N 08688214190 sau P/N 09040951190)

Componente kit	Ingrediente reactiv	Cantitate per kit	Simbol de siguranță și avertizare*
EBV/BKV Control pozitiv redus (EBV/BKV L(+))C)	< 0,001% ADN BKV sintetic (plasmidă) încapsulat în proteină capsidală bacteriofagă lambda, plasmă umană normală, ADN BKV nedetectabil prin metode PCR 0,1% conservant ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	 AVERTISMENT H317: Poate provoca o reacție alergică a pielii. H412: Nociv pentru viața acvatică, cu efecte pe termen lung. P261: Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/ceața/vaporii/spray-ul. P273: Evitați dispersarea în mediu. P280: A se purta mănuși de protecție. P333 + P313: În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: consultați medicul. P362 + P364: Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. P501: Eliminați conținutul/recipientul într-o unitate autorizată de colectare a deșeurilor. 55965-84-9 Masă de reacție a: 5-cloro-2-metil-4-izotiazolină-3-onă și 2-metil-2H-izotiazol-3-onă (3:1).
EBV/BKV Control pozitiv ridicat (EBV/BKV H(+))C)	< 0,001% ADN BKV sintetic (plasmidă) încapsulat în proteină capsidală bacteriofagă lambda, plasmă umană normală, ADN BKV nedetectabil prin metode PCR 0,1% conservant ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	 AVERTISMENT H317: Poate provoca o reacție alergică a pielii. H412: Nociv pentru viața acvatică, cu efecte pe termen lung. P261: Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/ceața/vaporii/spray-ul. P273: Evitați dispersarea în mediu. P280: A se purta mănuși de protecție. P333 + P313: În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: consultați medicul. P362 + P364: Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. P501: Eliminați conținutul/recipientul într-o unitate autorizată de colectare a deșeurilor. 55965-84-9 Masă de reacție a: 5-cloro-2-metil-4-izotiazolină-3-onă și 2-metil-2H-izotiazol-3-onă (3:1).

* Eticheta de siguranță a produsului respectă în primul rând ghidul UE GHS.

** Substanță periculoasă sau amestec periculos.

09478124001-03RO

Doc Rev. 3.0

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

A se păstra la 2–8 °C

Pentru utilizare pe sistemul cobas® 5800 (P/N 09051953190)

Pentru utilizare pe sistemele cobas® 6800/8800 (P/N 07002238190 sau P/N 09051953190)

Componente kit	Ingrediente reactiv	Cantitate per kit
cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)	Soluție tampon Tris, <0,1 azidă de sodiu, EDTA, 0,002% ARN poli rA (sintetic)	16 ml (16 × 1 ml)

Reactivi cobas® omni pentru prepararea probei

Tabelul 4 Reactivii cobas® omni pentru prepararea probei

Reactivi	Ingrediente reactiv	Cantitate per kit	Simbol de siguranță și avertizare*
cobas® omni MGP Reagent (MGP) A se păstra la 2–8 °C (P/N 06997546190)	Particule de sticlă magnetice, tampon Tris, 0,1% metil-4 hidroxibenzoat, < 0,1% azidă de sodiu	480 de teste	Nu este cazul
cobas® omni Specimen Diluent (SPEC DIL) A se păstra la 2–8 °C (P/N 06997511190)	Tampon Tris, 0,1% metil-4 hidroxibenzoat, < 0,1% azidă de sodiu	4 × 875 ml	Nu este cazul
cobas® omni Lysis Reagent (LYS) A se păstra la 2–8 °C (P/N 06997538190)	43% (m/m) guanidină-tiocianat**, 5% (m/v) polidocanol**, 2% (m/v) ditiotreititol**, citrat de sodiu dihidrat EUH032: În contact cu acizi, degajă un gaz foarte toxic.	4 × 875 ml	 PERICOL H302 + H332: Nociv în caz de înghițire sau inhalare. H314: Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor. H411: Toxic pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung. P273: Evitați dispersarea în mediu. P280: Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței. P303 + P361 + P353: ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA (sau părul): Scoateți imediat toată îmbrăcăminte contaminată. Clătiți pielea cu apă. P304 + P340 + P310: ÎN CAZ DE INHALARE: Transportați persoana la aer liber și mențineți-o într-o poziție confortabilă pentru respirație. Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ/un medic. P305 + P351 + P338 + P310: ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ/un medic. P391: Colectați scurgerile de produs. 593-84-0 Guanidină tiocianat 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutan-2,3-diol
cobas® omni Wash Reagent (WASH) A se păstra la 15–30 °C (P/N 06997503190)	Citrat de sodiu dihidrat, 0,1% metil-4 hidroxibenzoat	4,2 l	Nu este cazul

* Eticheta de siguranță a produsului respectă în primul rând ghidul UE GHS.

** Substanță periculoasă sau amestec periculos.

Cerințe de păstrare și manipulare ale reactivilor

Reactivii se păstrează și se manipulează conform specificațiilor din Tabelul 5, Tabelul 6 și Tabelul 7.

Când reactivii nu sunt încărcăți în sistemele **cobas® 5800** sau **cobas® 6800/8800**, păstrați-i la temperatura corespunzătoare specificată în Tabelul 5.

Tabelul 5 Păstrarea reactivilor (când reactivul nu este în sistem)

Reactiv	Temperatura de păstrare
cobas® BKV	2–8 °C
cobas® EBV/BKV Control Kit	2–8 °C
cobas® Buffer Negative Control Kit	2–8 °C
cobas® omni Lysis Reagent	2–8 °C
cobas® omni MGP Reagent	2–8 °C
cobas® omni Specimen Diluent	2–8 °C
cobas® omni Wash Reagent	15–30 °C

Condiții de manipulare a reactivilor pentru sistemul **cobas® 5800**

Reactivii încărcăți în sistemul **cobas® 5800** sunt păstrați la temperaturi corespunzătoare, iar expirarea acestora este monitorizată de către sistem. Sistemul permite ca reactivii să fie utilizați doar dacă sunt îndeplinite toate condițiile menționate în Tabelul 6. Sistemul împiedică în mod automat utilizarea reactivilor expirați. Tabelul 6 îi ajută pe utilizatori să înțeleagă condițiile de manevrare a reactivilor impuse de către sistemul **cobas® 5800**.

Tabelul 6 Condiții de expirare a reactivilor impuse de sistemul **cobas® 5800**

Reactiv	Data de expirare a kitului	Stabilitatea kitului desigilat	Număr de cicluri în care poate fi utilizat kitul	Stabilitatea în aparat
cobas® BKV	Data nu a fost depășită	90 de zile de la prima utilizare	Max 40 de cicluri	Max 36 de zile**
cobas® EBV/BKV Control Kit	Data nu a fost depășită	Nu este cazul*	Nu este cazul	Max 36 de zile**
cobas® Buffer Negative Control Kit	Data nu a fost depășită	Nu este cazul*	Nu este cazul	Max 36 de zile**
cobas® omni Lysis Reagent	Data nu a fost depășită	30 de zile de la încărcare**	Nu este cazul	Nu este cazul
cobas® omni MGP Reagent	Data nu a fost depășită	30 de zile de la încărcare**	Nu este cazul	Nu este cazul
cobas® omni Specimen Diluent	Data nu a fost depășită	30 de zile de la încărcare**	Nu este cazul	Nu este cazul
cobas® omni Wash Reagent	Data nu a fost depășită	30 de zile de la încărcare**	Nu este cazul	Nu este cazul

* Reactivi de unică folosință.

** Perioada de timp se calculează de la prima încărcare a reactivului în sistemul **cobas® 5800**.

Condiții de manipulare a reactivilor pentru sistemele cobas® 6800/8800

Reactivii încărcăți în sistemele **cobas®** 6800/8800 sunt păstrați la temperaturi corespunzătoare, iar expirarea acestora este monitorizată de către sistem. Reactivii pot fi utilizați cu sistemele **cobas®** 6800/8800 doar dacă sunt îndeplinite toate condițiile indicate în Tabelul 7. Sistemul împiedică în mod automat utilizarea reactivilor expirați. Tabelul 7 îi ajută pe utilizatori să înțeleagă condițiile de manipulare a reactivilor impuse de sistemele **cobas®** 6800/8800.

Tabelul 7 Condiții de expirare a reactivilor impuse de sistemele **cobas®** 6800/8800

Reactiv	Data de expirare a kitului	Stabilitatea kitului desigilat	Număr de cicluri în care poate fi utilizat kitul	Stabilitate în timpul utilizării (timp cumulat în timpul utilizării în afara frigiderului)
cobas® BKV	Data nu a fost depășită	90 de zile de la prima utilizare	Max 40 de cicluri	Max 40 de ore
cobas® EBV/BKV Control Kit	Data nu a fost depășită	Nu este cazul*	Nu este cazul	Max 8 de ore
cobas® Buffer Negative Control Kit	Data nu a fost depășită	Nu este cazul*	Nu este cazul	Max 10 de ore
cobas® omni Lysis Reagent	Data nu a fost depășită	30 de zile de la încărcare**	Nu este cazul	Nu este cazul
cobas® omni MGP Reagent	Data nu a fost depășită	30 de zile de la încărcare**	Nu este cazul	Nu este cazul
cobas® omni Specimen Diluent	Data nu a fost depășită	30 de zile de la încărcare**	Nu este cazul	Nu este cazul
cobas® omni Wash Reagent	Data nu a fost depășită	30 de zile de la încărcare**	Nu este cazul	Nu este cazul

* Reactivi de unică folosință

** Perioada de timp se calculează de la prima încărcare a reactivului în sistemele **cobas®** 6800/8800.

Materiale suplimentare necesare pentru sistemul cobas® 5800

Tabelul 8 Materiale și consumabile necesare pentru sistemul **cobas® 5800**

Materiale	P/N
cobas® omni Processing Plate 24	08413975001
cobas® omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas® omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Vârf CORE TIPS cu filtru, 1 ml	04639642001
Vârf CORE TIPS cu filtru, 300 µl	07345607001
cobas® omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190
Sac pentru deșeuri solide sau Sac pentru deșeuri solide cu inserție	07435967001 sau 08030073001
cobas® omni Secondary Tubes 13×75 (opțional)	06438776001
cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
cobas® PCR Media Disposable Tube Stand (opțional)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050*, **	03143449001
RD5 RACK — RD Standard rack 0001-0050 LR*, **	11902997001
Suport eprubete cu 16 poziții*	09224319001
Suport stativ cu 5 poziții*	09224475001

* Contactați reprezentantul local Roche pentru o listă detaliată de comandă cu rackuri pentru probe.

** Rackul MPA de 16 mm sau suportul pentru tuburi cu 16 poziții este cel preferat pentru utilizare cu probe recoltate în tuburi **cobas®** PCR Media.

Materiale suplimentare necesare pentru sistemele cobas® 6800/8800

Tabelul 9 Materiale și consumabile necesare sistemelor **cobas®** 6800/8800

Materiale	P/N
cobas® omni Processing Plate	05534917001
cobas® omni Amplification Plate	05534941001
cobas® omni Pipette Tips	05534925001
cobas® omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas® omni Lysis Reagent	06997538190
cobas® omni MGP Reagent	06997546190
cobas® omni Specimen Diluent	06997511190
cobas® omni Wash Reagent	06997503190
Sac pentru deșeuri solide și Container pentru deșeuri solide sau Sac pentru deșeuri solide cu inserție și sertar kit pentru deșeuri solide actualizat	07435967001 și 07094361001 sau 08030073001 și 08387281001
cobas® omni Secondary Tubes 13×75 (opțional)	06438776001
cobas® PCR Media Secondary Tube Kit*	07958048190
cobas® PCR Media Tube Replacement Cap Kit	07958056190
cobas® PCR Media Disposable Tube Stand (opțional)	07958064190
MPA RACK 16 MM LIGHT GREEN 2001-2050*, **	03143449001

* Contactați reprezentantul local Roche dacă doriți o listă detaliată de comandă cu rackurile pentru probe, rackurile pentru eprubete cu vârfuri coagulate și tăvile pentru rackuri compatibile cu aparatele.

** Rackul MPA 16 mm este cel preferat pentru utilizare cu probe recoltate în tuburi **cobas®** PCR Media.

Tabelul 10 Kituri de recoltare a specimenelor de urină utilizate cu **cobas®** BKV

Kituri de recoltare	P/N
cobas® PCR Urine Sample Kit	05170486190
cobas® PCR Media Kit	06466281190

Notă: Kitul pentru probe de urină **cobas®** PCR se folosește pentru prelevarea și transportarea specimenelor de urină. Fiecare kit pentru probe de urină **cobas®** PCR conține 100 de pachete pentru probe de urină **cobas®** PCR. Fiecare pachet conține 1 pipetă de unică folosință și 1 tub **cobas®** PCR Media, care conține 4,3 ml de **cobas®** PCR Media. **cobas®** PCR Media servește drept mediu de transport și stabilizare a acidului nucleic pentru probele de urină. Pentru probele de urină trimise direct la laborator fără folosirea kitului de probe de urină **cobas®** PCR la recoltare, kitul **cobas®** PCR Media care conține 100 de tuburi **cobas®** PCR Media (fără pipetele de unică folosință) poate să fie folosit drept alternativă, având în vedere că urina trebuie să fie transferată în 24 de ore de la recoltare.

Aparatură și aplicații software necesare

Aplicația software **cobas® 5800** și pachetul de analiză **cobas® BKV** pentru sistemul **cobas® 5800** trebuie să fie instalate pe aparatul **cobas® 5800**. Aplicația software pentru gestionarea datelor și computerul pentru sistemul **cobas® 5800** vor fi furnizate împreună cu sistemul.

Aplicația software **cobas® 6800/8800** și pachetul de analiză **cobas® BKV** trebuie instalate pe aparate. Serverul Instrument Gateway (IG) se furnizează împreună cu sistemul.

Tabelul 11 Aparatură

Echipamente	P/N
cobas® 5800 System	08707464001
cobas® 6800 System (platformă mobilă)	05524245001 și 06379672001
cobas® 6800 System (platformă fixă)	05524245001 și 06379664001
cobas® 8800 System	05412722001
Modul de alimentare a probelor	06301037001

Consultați asistentul pentru utilizator și/sau ghidurile pentru utilizator aferente sistemului **cobas® 5800** sau **cobas® 6800/8800** pentru informații suplimentare.

Notă: Contactați reprezentantul local Roche dacă doriți o listă detaliată de comandă cu tuburile pentru probe primare și secundare, rackurile pentru probe, rackurile pentru tuburi cu vârfuri coagulate și tăvile pentru rackuri compatibile cu aparatele.

cobas® BKV acceptă tubul primar folosit pentru tipurile de specimene de urină colectate în **cobas® PCR Media**.

Precauții și exigențe de manipulare

Avertismente și precauții

La fel ca în cazul oricărei proceduri de testare, bunele practici de laborator sunt esențiale pentru efectuarea corectă a acestui test. Datorită nivelului ridicat de sensibilitate al acestui test, trebuie avută grijă ca reactivii și amestecurile de amplificare să nu se contamineze.

- Destinat exclusiv utilizării pentru diagnosticare *in vitro*.
- **cobas® BKV** nu a fost evaluat în ceea ce privește folosirea ca test de screening pentru prezența BKV în sânge sau produse derivate din sânge.
- Toate probele de la pacienți trebuie tratate ca prezentând risc de contaminare, respectând bunele practici de laborator, așa cum este prevăzut de ghidul Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Biosiguranța în laboratoarele de microbiologie și biomedicale) și în Documentul CLSI M29-A4.^{15, 16} Această procedură trebuie efectuată doar de către personal cu experiență în manipularea materialelor infecțioase și în utilizarea sistemelor **cobas® BKV** și **cobas® 5800/6800/8800**.
- Toate materialele de proveniență umană trebuie considerate ca având potențial infecțios și trebuie manipulate conform procedurilor universale de precauție. Dacă se produc scurgeri, dezinfectați imediat folosind o soluție proaspăt preparată de hipoclorit de sodiu sau potasiu 0,6% în apă distilată sau deionizată sau respectați procedurile corespunzătoare impuse de instituție.
- Kitul de control **cobas® EBV/BKV** conține plasmă derivată din sânge uman. Materialul sursă a fost testat prin metode PCR și a indicat urme acceptabile de niveluri reduse de ADN BKV. Nicio metodă de testare cunoscută nu poate să ofere asigurarea completă că produsele derivate din sânge uman nu transmit agenți infecțioși.
- **Nu congelați sânge integral sau orice probă de urină stocată în tuburile primare.**
- Utilizați doar consumabile furnizate sau specificate pentru a asigura o funcționare optimă a testului.
- La cerere, reprezentantul local Roche poate furniza Fișa cu date de securitate (SDS).
- Respectați îndeaproape procedurile și ghidurile furnizate pentru a vă asigura că testul este efectuat corect. Orice deviere de la proceduri și ghiduri poate afecta funcționarea în condiții optime a testului.
- E posibil să se producă rezultate fals pozitive în cazul în care contaminarea încrucișată a probelor nu este controlată în mod corespunzător în timpul manipulării și procesării lor.
- **cobas® PCR Media** (din eprubeta primară pentru probe) conține clorhidrat de guanidină. **Nu permiteți contactul direct dintre clorhidratul de guanidină și hipocloritul de sodiu (înălbitor) sau alte substanțe reactive puternice, cum ar fi acizii sau bazele. Aceste amestecuri pot emana gaze toxice.** Dacă lichidul care conține clorhidrat de guanidină este vărsat, curățați cu detergent de laborator adecvat și cu apă. Dacă se produce o scurgere de agenți cu potențial infecțios, **MAI ÎNTÂI** curățați zona afectată cu detergent de laborator și cu apă, apoi cu soluție de sodiu sau hipoclorit de potasiu 0,6%.
- Informați autoritatea locală competentă și producătorul cu privire la incidentele grave rezultate în urma utilizării acestui test.

Manipularea reactivilor

- Manipulați toți reactivii, toate controalele și probele în conformitate cu bunele practici de laborator pentru a preveni contaminarea încrucișată a probelor și controalelor.
- Înainte de utilizare, inspectați vizual fiecare casetă de reactiv, diluant, reactiv de lizare și de spălare pentru a vă asigura că nu există semne de scurgeri. Dacă observați semne de scurgeri, nu utilizați materialul în procedura de testare.
- **cobas® omni** Lysis Reagent conține guanidină tiocianat, o substanță cu potențial periculos. Evitați contactul dintre reactivi și piele, ochi, respectiv membranele mucoase. În cazul în care se produce un astfel de contact, spălați-vă cu apă din abundență, deoarece, în caz contrar, se pot produce arsuri.
- Kiturile de teste **cobas®** BKV, reactivul **cobas® omni** MGP și diluantul de specimene **cobas® omni** conțin azidă de sodiu cu rol de conservant. Evitați contactul dintre reactivi și piele, ochi, respectiv membranele mucoase. În cazul în care se produce un astfel de contact, spălați-vă cu apă din abundență, deoarece, în caz contrar, se pot produce arsuri. Dacă reactivii sunt vărsați, diluați cu apă înainte de a șterge cu o cârpă.
- Evitați contactul dintre **cobas® omni** Lysis Reagent, care conține guanidină tiocianat, și soluția de hipoclorit de sodiu (înălbitor). Amestecul poate degaja un gaz foarte toxic.
- Eliminați toate materialele care au intrat în contact cu probele și reactivii în conformitate cu reglementările naționale, regionale și locale.

Bunele practici de laborator

- Nu pipetați cu gura.
- Consumul de alimente, băuturi, precum și fumatul sunt interzise în spațiile de lucru desemnate.
- Purtați mănuși de laborator, halat de laborator și ochelari de protecție în timpul manipulării probelor și reactivilor. Mănușile trebuie să fie schimbate între manipularea probelor și a kiturilor **cobas®** BKV, controlului pozitiv redus EBV/BKV (EBV/BKV L(+))C), controlului pozitiv ridicat EBV/BKV (EBV/BKV H(+))C), kiturilor de control negativ tampon **cobas®** și reactivilor **cobas® omni** pentru a preveni contaminarea. Evitați contaminarea mănușilor în timpul manipulării probelor și controalelor.
- Spălați-vă bine pe mâini după ce manipulați probele și reactivii kitului și după ce îndepărtați mănușile.
- Curățați și dezinfectați temeinic toate suprafețele de lucru din laborator cu o soluție proaspăt preparată de hipoclorit de sodiu sau potasiu 0,6% în apă distilată sau deionizată. În continuare, ștergeți suprafețele cu etanol 70%.
- Dacă se produc scurgeri pe aparatul **cobas®** 5800 sau **cobas®** 6800/8800, urmați instrucțiunile din asistentul pentru utilizator și/sau ghidul utilizatorului aferent sistemelor **cobas®** 5800 sau **cobas®** 6800/8800 pentru a curăța și decontamina în mod corespunzător suprafața aparatelor.

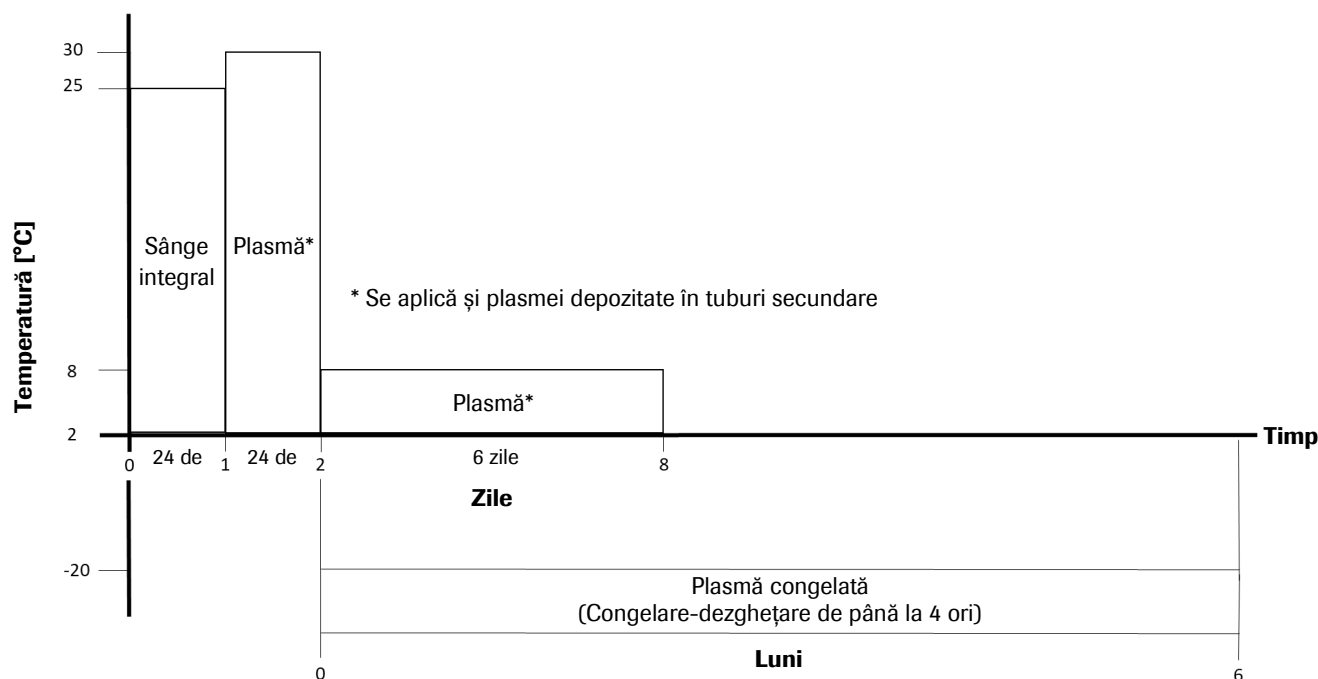
Recoltarea, transportarea și păstrarea probelor

Notă: Manipulați toate probele și controalele ca și cum ar putea transmite agenți infecțioși.

Probe de plasmă EDTA

- Depozitați toate probele la temperaturile specificate. Stabilitatea probei este afectată de temperaturile ridicate.
- La folosirea probelor congelate în tuburi secundare, lăsați probele la temperatura camerei (15–30 °C) până la decongelarea completă, apoi amestecați rapid (de exemplu, agitați în vortex timp de 3–5 secunde) și centrifugați pentru a colecta tot volumul probei din partea de jos a tubului.
- Sângele integral trebuie să fie recoltat în tuburi pentru prepararea plasmei BD Vacutainer® PPT™ pentru metodele de testare pentru diagnosticul molecular sau în tuburi sterile utilizând EDTA ca anticoagulant. Respectați instrucțiunile producătorului tubului de recoltare a probei. Consultați Figura 1.
- Sângele integral recoltat tuburile pentru prepararea plasmei BD Vacutainer® PPT™ pentru metodele de testare pentru diagnosticul molecular sau în tuburi sterile utilizând EDTA ca anticoagulant poate fi păstrat și/sau transportat timp de cel mult 24 de ore la 2–25 °C. Centrifugarea trebuie să fie efectuată în conformitate cu instrucțiunile producătorului.
- La separare, probele de plasmă pot să fie depozitate 24 de ore la 2–30 °C în tuburi primare sau secundare, urmată de:
 - Depozitarea în tuburi primare sau secundare până la 6 zile la 2–8 °C.
 - Depozitarea în tuburi secundare până la 6 luni la ≤ –20 °C.
- Probele de plasmă sunt stabile până la patru cicluri de înghețare/dezghețare atunci când sunt congelate la ≤ –20 °C.
- Dacă probele trebuie să fie expediate, acestea ar trebui să fie ambalate și etichetate în conformitate cu regulile aplicabile naționale și/sau internaționale privind transportul probelor și agenților etiologici.

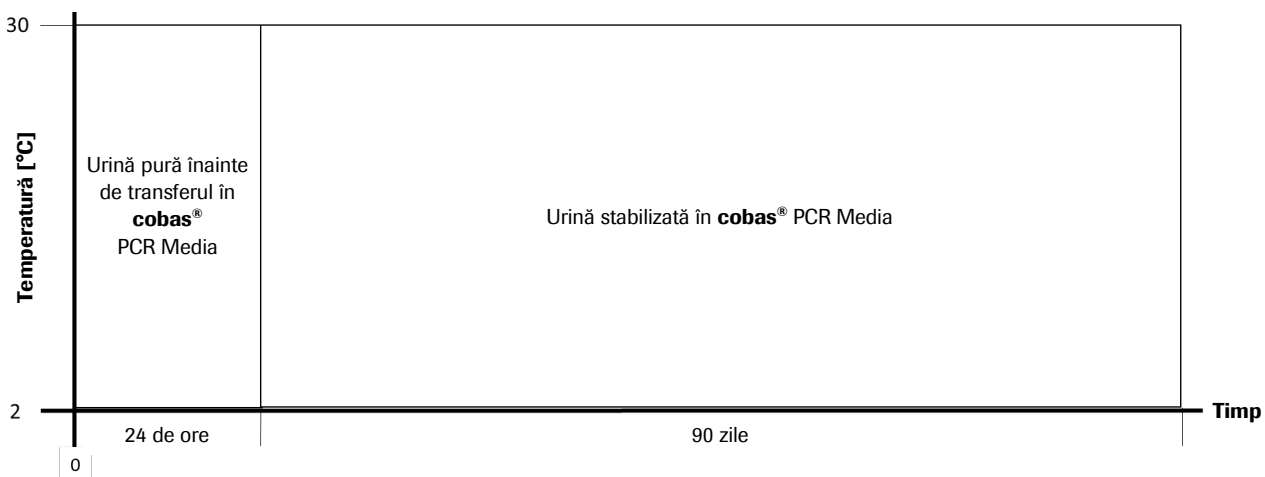
Figura 1 Condiții de depozitare a probelor pentru plasma EDTA



Probe de urină

- Utilizați numai kitul pentru probe de urină **cobas®** PCR pentru a preleva și stabiliza probe de urină pentru **cobas®** BKV. **cobas®** BKV nu a fost validat pentru utilizare cu alte dispozitive de prelevare a urinei sau cu alte tipuri de medii. Utilizarea **cobas®** BKV cu alte dispozitive de prelevare a urinei sau alte tipuri de medii poate duce la rezultate fals negative, fals pozitive și/sau nevalide.
- Specimenele de urină trebuie transferate de îndată în tubul **cobas®** PCR Media (stabilizată). Dacă probele nu pot fi transferate imediat, acestea pot fi păstrate la o temperatură cuprinsă între 2 °C și 30 °C timp de până la 24 de ore. După ce probele de urină sunt stabilizate în **cobas®** PCR Media, probele pot să fie depozitate până la 90 de zile la 2–30 °C. Consultați Figura 2.
- Probele de urină netestate trebuie să prezinte partea superioară a nivelului lichidului dintre cele două linii negre de pe fereastra etichetei eprubetei **cobas®** PCR Media tube. Dacă nivelul lichidului se află deasupra sau dedesubtul acestor linii, proba nu a fost prelevată corespunzător și nu poate fi utilizată pentru testare.
- Dacă nu există un volum suficient de urină (4,3 ml) pentru diluarea în tubul pentru probe de urină **cobas®** PCR, urina poate să fie diluată manuală cu **cobas®** PCR Media. Înainte de testarea cu **cobas®** BKV, cel puțin 0,5 ml de urină pură trebuie să fie diluată manual în **cobas®** PCR Media (raport 1:1).
- Pentru a evita contaminarea încrucișată a probelor procesate, trebuie utilizate capace suplimentare pentru tuburile **cobas®** PCR Media într-o culoare alternativă (neutră; consultați **Materiale suplimentare necesare**) pentru a pune la loc capacul pe probe după testare.
- Dacă sunt necesare testări suplimentare, asigurați-vă că mai există cel puțin 1,2 ml de probă în tubul **cobas®** PCR Media.
- Dacă probele trebuie să fie expediate, acestea ar trebui să fie ambalate și etichetate în conformitate cu regulile aplicabile naționale și/sau internaționale privind transportul probelor și agenților etiologici.

Figura 2 Condiții de depozitare a probelor pentru urină



Instrucțiuni de utilizare

Note referitoare la procedură

- Nu utilizați reactivii **cobas®** BKV, kitul de control **cobas®** EBV/BKV, kitul de control negativ pentru soluția tampon **cobas®** sau reactivii **cobas®** **omni** după datele de expirare aferente.
- A nu se reutiliza consumabilele. Acestea sunt de unică folosință.
- Asigurați-vă că etichetele cu coduri de bare ale probelor de pe tuburile cu probe sunt vizibile prin deschiderile de pe partea laterală a rackurilor pentru probe RD5 sau MPA. Consultați ghidurile utilizatorului aferente sistemului **cobas®** 5800 sau **cobas®** 6800/8800 pentru specificațiile adecvate privind codurile de bare și informații suplimentare despre încărcarea tuburilor de probă.
- Consultați Asistentul pentru utilizator și/sau Ghidurile pentru utilizator aferente sistemelor **cobas®** 5800 sau **cobas®** 6800/8800 pentru întreținerea corespunzătoare a aparatelor.

Efectuarea testului **cobas®** BKV pe sistemul **cobas®** 5800

cobas® BKV poate să fie rulat cu un volum minim necesar al probei de 350 µl pentru plasma EDTA (pentru fluxul de lucru al probelor de 200 µl) și 550 µl pentru speciamele de urină stabilizată (pentru fluxul de lucru al probelor de 400 µl). Procedura de testare este descrisă, în detaliu, în asistentul pentru utilizator și/sau ghidul pentru utilizator sistemele **cobas®** 5800. Figura 3 de mai jos rezumă procedura.

- Speciamele trebuie să aibă capacul scos și să fie încărcate direct pe rackuri pentru procesare pe sistemul **cobas®** 5800.
- O singură rulare poate să aibă o combinație de speciame (plasmă, urină stabilizată).

Plasma EDTA și speciamele de urnă stabilizate trebuie procesate utilizând selecția tipului de probă din interfața cu utilizatorul (UI) a **cobas®** BKV, așa cum este descris în Figura 3, pasul 2.

Figura 3 Procedura de testare **cobas®** BKV pe sistemul **cobas®** 5800

1	Conectați-vă la sistem Apăsați Start pentru a pregăti sistemul
2	Încărcați probele în sistem: • Încărcați stativale cu probe în sistem • Sistemul le pregătește automat • Ordonăți testele - o Alegeți „Plasma” pentru a comanda specimene de plasmă EDTA - o Alegeți „Urine” (Urină) pentru a comanda probe de urină prelevate în cobas® PCR Media ▪ Scoateți capacul eprubetei ▪ Transferați eprubeta direct pe stativ
3	Reumpleți reactivii și consumabilele conform indicațiilor sistemului: • Încărcați caseta(ele) cu reactivi specifici testului • Încărcați mini stativale cu control • Încărcați vârfurile de procesare • Încărcați vârfurile de eluție • Încărcați plăcile de procesare • Încărcați plăcile pentru deșeurile lichide • Încărcați plăcile de amplificare • Încărcați caseta MGP • Reumpleți diluantul probei • Reumpleți reactivul de liză • Reumpleți reactivul de spălare
4	Porniți secvența de rulare alegând butonul Start processing (Pornire procesare) de pe interfața cu utilizatorul; toate secvențele de rulare ulterioare vor porni automat dacă nu sunt amânate manual
5	Consultați și exportați rezultatele
6	Scoateți și acoperiți cu capac toate eprubetele de probă care îndeplinesc cerințele de volum minim, dacă acestea sunt necesare pentru utilizare ulterioară Curățați instrumentul: • Descărcați mini stativale cu control goale • Descărcați caseta(ele) goală(e) cu reactivi specifici testului • Goliți sertarul plăcii de amplificare • Eliminați deșeurile lichide • Eliminați deșeurile solide

Efectuarea testului cobas® BKV pe sistemele cobas® 6800/8800

cobas® BKV poate să fie rulat cu un volum minim necesar al probei de 350 µl pentru plasma EDTA (pentru fluxul de lucru al probelor de 200 µl) și 550 µl pentru speciimenele de urină stabilizată (pentru fluxul de lucru al probelor de 400 µl). Procedura de testare a aparatului este descrisă, în detaliu, în asistentul pentru utilizator și/sau ghidul pentru utilizator pentru sistemele **cobas®** 6800/8800. Figura 4 de mai jos rezumă procedura.

- Speciimenele trebuie să aibă capacul scos și să fie încărcate direct pe rackuri pentru procesare pe sistemele **cobas®** 6800/8800.
- O singură rulare poate să aibă o combinație de speciimene (plasmă, urină stabilizată).
- Plasma EDTA și speciimenele de urină stabilizate trebuie procesate utilizând selecția tipului de probă din interfața cu utilizatorul (UI) a **cobas®** BKV, așa cum este descris în Figura 4, pasul 1.

Figura 4 Procedura de testare **cobas®** BKV pe sistemele **cobas®** 6800/8800

1	Conectați-vă la sistem Apăsați Start pentru a pregăti sistemul Ordonati testele: • Alegeți „Plasma” pentru a comanda speciimene de plasmă EDTA • Alegeți „Urine” (Urină) pentru a comanda probe de urină prelevate în cobas® PCR Media
2	Reumpleți reactivii și consumabilele conform indicațiilor sistemului: • Încărcați caseta cu reactivi specifici testului • Încărcați casetele de control • Încărcați vârfurile pipetei • Încărcați plăcile de procesare • Încărcați reactivul MGP • Încărcați plăcile de amplificare • Reumpleți diluantul probei • Reumpleți reactivul de liză • Reumpleți reactivul de spălare
3	Încărcați speciimenele în sistem: • Pentru fiecare specimen de urină primar în recoltat în cobas® PCR Media - o Scoateți capacul eprubetei - o Transferați eprubeta direct pe stativ • Încărcați stativul pentru probe și stativele pentru vârful pentru cheaguri în modulul de alimentare cu probe • Confirmați că probele au fost acceptate în modulul de transfer
4	Porniți secvența de rulare selectând butonul Pornire manuală din interfața cu utilizatorul sau utilizați funcția de pornire automată setată la 120 de minute sau după completarea lotului
5	Consultați și exportați rezultatele
6	Scoateți și acoperiți cu capac toate eprubetele de probă care îndeplinesc cerințele de volum minim, dacă acestea sunt necesare pentru utilizare ulterioară Curățați aparatul: • Descărcați casetele de control goale • Goliți sertarul plăcii de amplificare • Eliminați deșeurile lichide • Eliminați deșeurile solide

Rezultate

Sistemele **cobas**® 5800/6800/8800 stabilesc automat concentrația de ADN BKV pentru probe și controale. Concentrația de ADN BKV este exprimată în unități internaționale pe milimetru (UI/ml).

Controlul calității și validitatea rezultatelor pe sistemul **cobas**® 5800

- Un control negativ [(-) Ctrl] și două controale pozitive, un control pozitiv scăzut [EBV/BKV L (+) C] și un control pozitiv ridicat [EBV/BKV H (+) C] sunt procesate cel puțin la fiecare 72 de ore și la fiecare lot de kit nou. Controalele pozitive și/sau negative pot fi programate mai frecvent pe baza procedurilor de laborator și/sau a regulamentelor locale.
- În aplicația software și/sau raportul **cobas**® 5800, verificați dacă există marcaje și rezultate asociate cu acestea pentru a vă asigura că rezultatul este valid.

Invalidarea rezultatelor se face în mod automat de către aplicația software **cobas**® 5800 pe baza erorilor controalelor negativ sau pozitiv.

NOTĂ: Sistemele **cobas**® 5800 va fi livrat cu setarea standard de rulare a unui set de controale (pozitiv și negativ) cu fiecare secvență de rulare, dar poate fi configurat la o programare mai puțin frecventă de până la 72 de ore pe baza procedurilor de laborator și/sau a regulamentelor locale. Contactați inginerul de service Roche și/sau serviciul de asistență tehnică pentru clienți Roche pentru informații suplimentare.

Rezultatele controalelor pe sistemul **cobas**® 5800

Rezultatele controalelor sunt prezentate în aplicația software **cobas**® 5800 în aplicația „Controls” (Controale).

- Controalele sunt marcate ca „Valid” în coloana „Control result” (Rezultat control) dacă toate țintele controlului sunt raportate ca fiind valide. Controalele sunt marcate ca „Invalid” (Nevalid) în coloana „Control result” dacă una sau toate țintele controlului sunt raportate ca fiind nevalide.
- Controalele marcate ca „Invalid” prezintă un marcaj în coloana „Flags” (Marcaje). Mai multe informații privind motivul pentru care controlul este raportat ca fiind nevalid, inclusiv informațiile despre marcaje sunt prezentate în vizualizarea detaliată.
- Dacă unul dintre controale este nevalid, este necesară repetarea testării tuturor controalelor și a tuturor probelor asociate.

Controlul calității și validitatea rezultatelor pentru sistemele **cobas**® 6800/8800

- Un control negativ [(-) Ctrl] și două controale pozitive, un control pozitiv scăzut [EBV/BKV L (+) C] și un control pozitiv ridicat [EBV/BKV H (+) C] sunt procesate cu fiecare lot.
- În aplicația software și/sau raportul **cobas**® 6800/8800, reparați marcajele și rezultatele asociate cu acestea pentru a vă asigura că lotul este valid.
- Lotul este valid dacă nu apare niciun marcaj pentru toate cele trei controale, ceea ce include un control negativ și două controale pozitive: EBV/BKV L (+) C, EBV/BKV H (+) C. Rezultatul controlului negativ este afișat ca (-) Ctrl, iar controalele pozitive scăzute și ridicate sunt afișate ca EBV/BKV L (+) C și EBV/BKV H (+) C.

Invalidarea rezultatelor se face în mod automat de către aplicația software **cobas**® 6800/8800 pe baza erorilor controalelor negativ și pozitiv.

Marcajele controalelor pe sistemele cobas® 6800/8800

Tabelul 12 Marcajele controalelor pentru controalele negativ și pozitiv

Control negativ	Marcaj	Rezultat	Interpretare
(-) Ctrl	Q02 (Lot de control cu erori)	Invalid	Un rezultat nevalid sau rezultatul titrului calculat pentru controlul negativ nu este negativ.
Control pozitiv	Marcaj	Rezultat	Interpretare
EBV/BKV L (+) C	Q02 (Lot de control cu erori)	Invalid	Un rezultat nevalid sau rezultatul titrului calculat pentru controlul pozitiv redus nu este în intervalul atribuit.
EBV/BKV H (+) C	Q02 (Lot de control cu erori)	Invalid	Un rezultat nevalid sau rezultatul titrului calculat pentru controlul pozitiv ridicat nu este în intervalul atribuit.

Dacă lotul de control este nevalid, repetați testarea pentru toate probele lotului afectat.

Interpretarea rezultatelor

Pentru un lot valid, verificați fiecare probă individuală pentru marcaje în aplicația software a sistemelor cobas® 5800 și cobas® 6800/8800 și/sau în rapoarte. Rezultatul interpretării trebuie să fie mereu după cum urmează:

- O secvență de rulare de test validă poate include rezultate valide și nevalide.

Tabelul 13 Rezultatele țintă pentru interpretarea rezultatelor țintă individuale

Rezultate	Interpretare
Target Not Detected	ADN-ul BKV nu a fost detectat. Raportați rezultatele ca „BKV nedetectat”.
< Titer Min ^a	Titru calculat este sub limita inferioară de cuantificare (LLOQ) a testului. Raportați rezultatele ca „BKV detectat, mai mic decât (titrul min.)”. Titru minim pentru plasmă EDTA = 21,5 UI/ml Titru minim pentru urină = 200 UI/ml
Titru	Titru calculat este în intervalul liniar al testului — mai mare sau egal cu titrul min. și mai mic sau egal cu titrul max. Raportați rezultatele ca „(Titru) BKV detectat”.
> Titer Max ^b	Titru calculat este peste limita superioară de cuantificare (ULOQ) a testului. Raportați rezultatele ca „BKV detectat, mai mare decât (titrul max.)”. Titru max. pentru plasma EDTA și urină = 1,0E+08 UI/ml

^a Rezultatele probei < Titer Min (ținta detectată < LLOQ) trebuie interpretată în contextul altor date clinice și nu trebuie să reprezinte baza unică pentru deciziile de tratament.

^b Rezultatul probei > Titer Max se referă la probele pozitive la BKV detectate cu titruri peste limita superioară de cuantificare (ULOQ). Dacă se dorește un rezultat cantitativ pentru speciamentele de plasmă EDTA, proba originală trebuie să fie diluată cu plasmă umană EDTA negativă la BKV, iar testul trebuie să fie repetat. Multiplicați rezultatul raportat cu factorul de diluție.

Interpretarea rezultatelor pe sistemul cobas® 5800

Rezultatele probelor sunt prezentate în aplicația software sistemele **cobas® 5800** în aplicația „Results” (Rezultate).

Pentru un lot valid de controale, verificați fiecare probă în parte pentru a vedea dacă există marcaje în aplicația software **cobas® 5800** și/sau în raport. Rezultatul interpretării trebuie să fie mereu după cum urmează:

- Probele asociate cu un lot valid de controale sunt prezentate drept „Valid” (Validă) în coloana „Control result” (Rezultatul controlului) dacă toate rezultatele țintă de control sunt raportate ca fiind valide. Probele asociate cu un lot nereușit de controale sunt prezentate drept „Invalid” (Nevalidă) în coloana „Control result” dacă toate rezultatele țintă de control sunt raportate ca fiind nevalide.
- Dacă controalele asociate ale unui rezultat de probă sunt nevalide, un marcaj specific va fi adăugat la rezultatul probei după cum urmează:
 - Q05D: Eșec de validare a rezultatului din cauza unui control pozitiv nevalid.
 - Q06D: Eșec de validare a rezultatului din cauza unui control negativ nevalid.
- Valorile din coloana „Results” (Rezultate) pentru rezultatul țintă al probei individuale trebuie interpretate așa cum se prezintă în Tabelul 13 de mai sus.

Dacă una sau mai multe ținte de probă sunt marcate ca „Invalid” (Nevalid), aplicația software **cobas® 5800** afișează un marcaj în coloana „Flags” (Marcaje). Mai multe informații privind motivul pentru care proba (probele) țintă este (sunt) raportată (raportate) ca fiind nevalidă (nevalide), inclusiv informații privind marcajul sunt prezentate în vizualizarea detaliată.

Interpretarea rezultatelor pe sistemele cobas® 6800/8800

Pentru loturile valide, verificați fiecare probă pentru marcaje în aplicația software **cobas® 6800/8800 Systems** și/sau în raport. Rezultatul interpretării trebuie să fie mereu după cum urmează:

- Probele sunt marcate cu „Yes” (Da) în coloana „Valid” dacă toate rezultatele țintă necesare au raportat rezultate valide. Probele marcate cu „No” (Nu) din coloana „Valid” pot necesita interpretare și măsuri suplimentare.
- Valorile pentru rezultatul țintă al probei individuale trebuie interpretate așa cum se prezintă în Tabelul 13 de mai sus.

Limitări procedurale

- **cobas® BKV** a fost evaluat doar pentru utilizarea în combinație cu kitul de controale pozitive **cobas® EBV/BKV**, kitul de controale negative pentru soluția tampon **cobas®**, reactivul **cobas® omni MGP**, reactivul de lizare **cobas® omni**, diluantul pentru specimene **cobas® omni** și reactivul de spălare **cobas® omni** pentru utilizare cu sistemele **cobas® 5800/6800/8800**.
- Fiabilitatea rezultatelor depinde de prelevarea, păstrarea și manipularea în condiții optime ale probelor.
- Acest test a fost validat pentru a fi folosit numai cu plasma EDTA și urina stabilizată. Testarea altor tipuri de probe cu **cobas® BKV** poate duce la rezultate incorecte. Măsurările nivelului de ADN din plasmă și urina stabilizată nu sunt direct comparabile una cu alta și cu cele ale altor tipuri de probe.
- Cuantificarea ADN-ului BKV poate fi afectată de metodele de prelevare a probelor, de factori legați de pacienți (adică, vârsta, prezența simptomelor) și/sau stadiul infecției.
- Degradarea ADN-ului BKV în urina pură poate să afecteze cuantificarea.¹⁷ Transferul urinei în **cobas® PCR Media** este necesar pentru a obține stabilitatea specimenului.
- Variabilitatea cantitativă a ADN-ului BKV inherentă urinei a fost observată în experimente legate de stabilitatea specimenelor în diferite momente de prelevare (urină pură) sau în diferite alicote ale aceleiași probe (urină pură și urină stabilizată în **cobas® PCR Media**).
- Având în vedere aceste limitări, rezultatele ADN BKV trebuie interpretate cu atenție în context cu alte constatări clinice și de laborator și nu ar trebuie să reprezinte baza unică pentru deciziile privind tratamentul.
- Urina poate să conțină niveluri ridicate de ADN BKV, cu riscul de a transmite contaminarea.¹⁸
- La fel ca în cazul tuturor testelor moleculare, mutațiile în regiunile țintă ale **cobas® BKV** pot afecta legarea primerilor și/sau sondelor, ceea ce poate cauza sub-cuantificarea virusului sau incapacitatea de a detecta prezența virusului.
- Din cauza diferențelor inerente între tehnologii, se recomandă ca, înainte de a trece de la o tehnologie la alta, utilizatorii să efectueze studii de corelare a metodelor în cadrul laboratoarelor lor pentru a înregistra diferențele între tehnologii. Utilizatorii trebuie să respecte politicile/procedurile impuse de instituție.
- **cobas® BKV** nu este destinat folosirii ca test de screening pentru prezența BKV în sânge sau produse derivate din sânge.

Evaluarea performanței non-clinice

Caracteristici de performanță cheie pentru tipul de probă plasmă EDTA obținute cu sistemele cobas® 6800/8800

Standardul internațional OMS pentru limita de detecție (LoD)

Limita de detecție a cobas® BKV pentru standardul internațional OMS a fost determinată prin analiza seriilor de diluții pentru Primul standard internațional OMS BKV obținute din NIBSC (NIBSC 14/212), în plasma EDTA umană negativă la BKV. Paneluri de șase niveluri de concentrație plus unul gol au fost testate cu trei loturi de reactivi cobas® BKV, rulări, zile, operatori și aparate multiple.

Rezultatele pentru plasma EDTA sunt indicate în Tabelul 14 – Tabelul 16. Studiul demonstrează că în lotul cel mai puțin sensibil, concentrația pentru care se așteaptă o rată de succes de 95% prin PROBIT este de 21,5 UI/ml cu un interval de încredere de 95% între 16,3 și 32,4 UI/ml în plasma EDTA. Concentrația cea mai scăzută cu o rată de succes $\geq 95\%$ este de 19,0 UI/ml în plasma EDTA.

Tabelul 14 Limita de detecție în plasma EDTA, lotul 1

Concentrația titlului de intrare (ADN BKV UI/ml)	Număr de replicări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de succes în %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	46	73,0
4,75	63	36	57,1
2,38	63	23	36,5
0	62	0	0,0
LoD după PROBIT la o rată de succes 95%	21,5 UI/ml 95% interval de încredere: 16,3–32,4 UI/ml		

Tabelul 15 Limita de detecție în plasma EDTA, lotul 2

Concentrația titlului de intrare (ADN BKV UI/ml)	Număr de replicări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de succes în %
80,0	62	62	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	61	96,8
9,5	63	48	76,2
4,75	63	34	54,0
2,38	62	23	37,1
0	62	0	0,0
LoD după PROBIT la o rată de succes 95%	19,7 UI/ml 95% interval de încredere: 15,0–29,2 UI/ml		

Tabelul 16 Limita de detecție în plasma EDTA, lotul 3

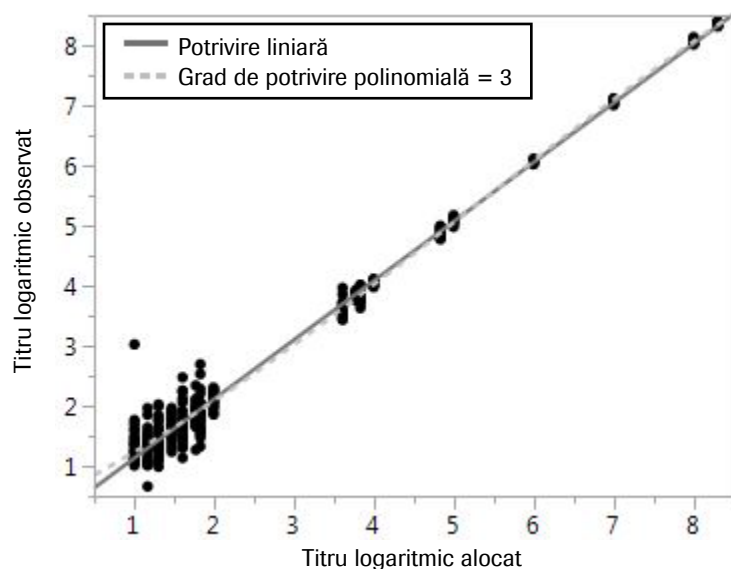
Concentrația titlului de intrare (ADN BKV UI/ml)	Număr de replicări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de succes în %
80,0	63	63	100,0
38,0	63	63	100,0
19,0	63	60	95,2
9,5	63	50	79,4
4,75	63	35	55,6
2,38	63	22	35,0
0	63	0	0,0
LoD după PROBIT la o rată de succes 95%	19,3 UI/ml 95% interval de încredere: 14,8–28,5 UI/ml		

Interval liniar

Linearitatea **cobas**® BKV a fost evaluată folosind o serie de diluție constând din 18 membri ai panelului cu ADN al subgrupului Ib BKV acoperind întregul interval liniar al testului. O soluție de ADN lambda cu un titru ridicat a fost folosită pentru a prepara 11 membri ai panelului acoperind întregul interval liniar. Un specimen clinic a fost folosit pentru a pregăti șapte membri ai panelului acoperind nivelurile intermediar și inferior ale intervalului liniar.

Fiecare membru al panelului a fost testat în 36 de replicări în cadrul a trei loturi de reactivi **cobas**® BKV și rezultatele studiului sunt prezentate în Figura 5.

cobas® BKV a demonstrat că este liniar între $1,01\text{E}+01$ și $1,97\text{E}+08$ UI/ml și prezintă o abatere absolută de la regresia neliniară care se potrivește mai bine de mai puțin sau egal cu $\pm 0,1 \log_{10}$ în plasmă umană EDTA (consultați Figura 5). În intervalul liniar, acuratețea testului a fost în limita $\pm 0,2 \log_{10}$.

Figura 5 Determinarea intervalului liniar în plasma EDTA

Precizia — în cadrul laboratorului

Precizia **cobas®** BKV a fost stabilită prin analiza seriilor de diluții ale ADN-ului BKV (subgrupul Ib) în plasma EDTA negativă la BKV. Cinci niveluri de diluție au fost testate în 72 de replicări pentru fiecare nivel în cadrul a trei loturi de reactivi **cobas®** BKV folosind patru aparate și doi operatori în 12 zile. Fiecare probă a fost purtată prin întreaga procedură **cobas®** BKV pe sistemele complet automatizate **cobas®** 6800/8800. Astfel, precizia raportată aici reprezintă toate aspectele procedurii de testare. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 17.

cobas® BKV a indicat o precizie ridicată pentru trei loturi de reactivi testați în cadrul intervalului de concentrație între $9,83\text{E}+01$ UI/ml și $9,83\text{E}+05$ UI/ml.

Tabelul 17 Precizia în cadrul laboratorului a **cobas®** BKV*

Concentrație nominală [UI/ml]	Concentrație alocată [UI/ml]	Plasmă EDTA			
		Lot 1	Lot 2	Lot 3	Toate loturile
		AS	AS	AS	SD agregat
$1,00\text{E}+06$	$9,83\text{E}+05$	0,02	0,02	0,04	0,03
$1,00\text{E}+05$	$9,83\text{E}+04$	0,03	0,04	0,04	0,04
$1,00\text{E}+04$	$9,83\text{E}+03$	0,04	0,05	0,03	0,04
$6,00\text{E}+03$	$5,90\text{E}+03$	0,03	0,05	0,03	0,04
$1,00\text{E}+02$	$9,83\text{E}+01$	0,09	0,11	0,11	0,11

* Datele titrului sunt considerate distribuite log-normale și sunt analizate după transformarea $\log_{10}$. Coloana abaterilor standard (SD) prezintă totalul titrului log-transformat pentru fiecare dintre cele trei loturi de reactivi.

Verificarea subtipului

Performanța **cobas**® BKV pentru BKV subtipurile I (cu subgrupurile Ia și Ic), II, III și IV a fost evaluată prin:

- Verificarea limitei de detecție
- Verificarea intervalului liniar

Verificarea limitei de detecție pentru subtipurile I (cu subgrupurile Ia și Ic), II, III și IV

ADN-ul BKV pentru cinci subtipuri/subgrupuri diferite (Ia, Ic, II, III și IV) a fost diluat la trei niveluri de concentrație diferite în plasma EDTA negativă la BKV. Determinarea ratei de succes a fost efectuată cu 63 de replicări pentru fiecare nivel. Testarea s-a desfășurat cu trei loturi de reactivi **cobas**® BKV, rulări, zile, operatori și aparate multiple. Aceste rezultate verifică dacă **cobas**® BKV a detectat ADN BKV pentru cinci subtipuri/subgrupuri diferite la concentrații de 21,5 UI/ml cu o rată de succes de $\geq 95\%$.

Verificarea intervalului liniar pentru subtipurile I (cu subgrupurile Ia și Ic), II, III și IV

Seria de diluție folosită în verificarea studiului de linearitate a subtipului/subgrupului pentru **cobas**® BKV a constatat din opt membri ai panelului acoperind intervalul liniar al testului. Testarea a fost efectuată cu trei loturi de reactiv **cobas**® BKV, 12 replicări pe nivel au fost testate în plasmă EDTA.

Intervalul liniar al **cobas**® BKV a fost verificat pentru toate cele cinci subtipuri/subgrupuri (Ia, Ic, II, III și IV).

Specificitate

Specificitatea **cobas**® BKV a fost determinată prin analiza probelor de plasmă EDTA negativă la BKV de la donatori individuali. 104 probe de plasmă EDTA au fost testate cu trei loturi de reactivi **cobas**® BKV. Toate probele au fost testate negative la ADN BKV. În panelul testului, specificitatea **cobas**® BKV a fost 100% (limită inferioară a intervalului de încredere de 95% unilateral: 97,16%).

Specificitate analitică

Specificitatea analitică a **cobas**® BKV a fost evaluată prin diluarea unui panel de microorganisme la o concentrație de 1,00E+06 unități/ml (CFU/ml, celule/ml, CCU/ml, IFU/ml) pentru bacterii și levuri și între 1,00E+05 unități/ml și 1,00E+06 unități/ml (copii/ml, TCID₅₀/ml, UI/ml, celule/ml) pentru virusuri. Microorganismele au fost diluate în plasmă EDTA umană negativă la ADN BKV, precum și în plasmă EDTA umană conținând (100 UI/ml) ADN BKV. Organismele specifice testate sunt enumerate în Tabelul 18. Fiecare probă a fost testată în replicări de trei. Niciunul dintre patogenii non-BKV nu a interferat cu performanța testului la concentrațiile testate. Rezultate negative au fost obținute cu **cobas**® BKV pentru toate probele de microorganisme fără țintă BKV și rezultate pozitive au fost obținute pentru toate probele de microorganisme cu țintă BKV. Mai mult, titrul log₁₀ mediu al fiecăreia dintre probele pozitive la BKV care conține organisme cu reactivitate încrucișată a fost $\pm 0,5 \log_{10}$ din titrul log₁₀ mediu al controlului pozitiv adăugat respectiv.

Tabelul 18 Microorganisme testate pentru reactivitate încrucișată

Virusuri	Bacterii	Levuri
Adenovirus tip 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Citomegalovirus	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Virusul Epstein-Barr	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Virusul hepatitei B	<i>Clostridium perfringens</i>	-
Virusul hepatitei C	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
Virusul <i>Herpes Simplex</i> de tip 1	<i>Escherichia coli</i>	-
Virusul <i>Herpes Simplex</i> de tip 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Virusul herpetic uman de tip 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
Virusul herpetic uman de tip 7	<i>Mycobacterium avium</i>	-
Virusul herpetic uman de tip 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-
Virusul imunodeficienței umane 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-
Virusul imunodeficienței umane 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-
Papilomavirus uman	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-
Virusul JC	<i>Salmonella enterica</i>	-
Parvovirus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
Virusul simian 40	-	-
Virusul Varicella-Zoster	-	-

Specificitatea analitică — substanțe care interferează

Niveluri ridicate de trigliceride (33 g/l), bilirubină conjugată (0,2 g/l), bilirubină neconjugată (0,2 g/l), albumină (60 g/l), hemoglobină (2 g/l) și ADN uman (2 mg/l) au fost testate în prezența (100 UI/ml) și absența în absența ADN-ului BKV. S-a demonstrat că interferențele endogene testate nu interferează cu performanța de testare a **cobas®** BKV.

În plus, compușii medicamentelor enumerați în Tabelul 19 au fost testați la de trei ori C_{max} în prezența și absența ADN-ului BKV.

S-a demonstrat că toate substanțele care pot să interfereze nu interferează cu performanța de testare. Rezultate negative au fost obținute cu **cobas®** BKV pentru toate probele fără țintă BKV și rezultate pozitive au fost obținute pentru toate probele cu țintă BKV. Mai mult, titrul $\log_{10}$ mediu al fiecăreia dintre probele pozitive la BKV care conținea substanțe care este posibil să interfereze a fost $\pm 0,5 \log_{10}$ din titrul $\log_{10}$ mediu al controlului pozitiv adăugat respectiv.

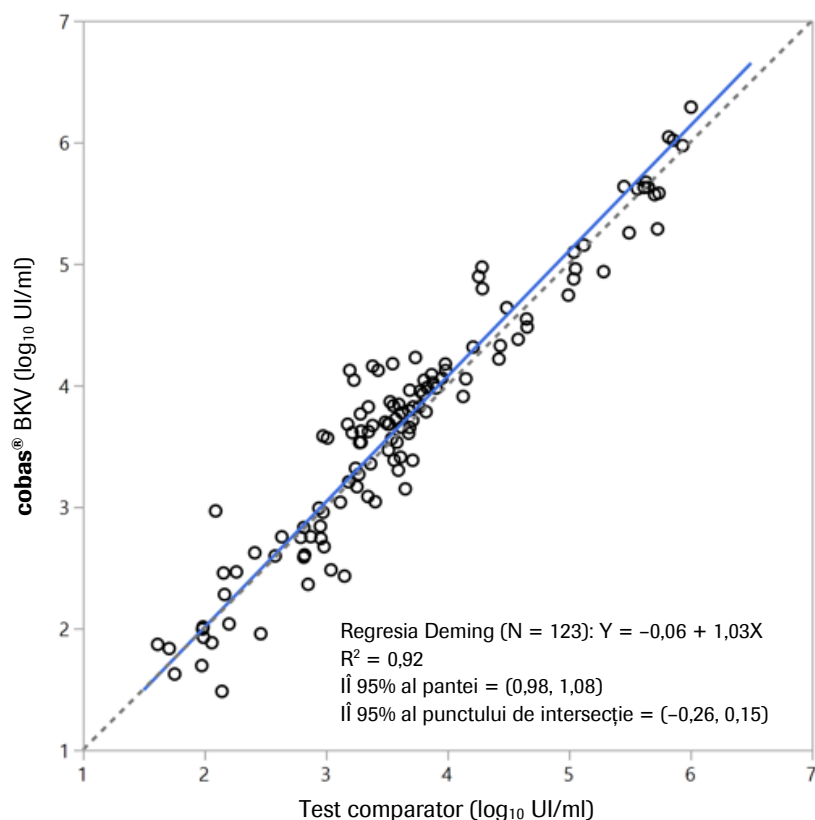
Tabelul 19 Compușii medicamentelor testați pentru interferența cu cuantificarea ADN-ului BKV prin **cobas®** BKV

Clasa de medicamente	Numele medicamentului generic	
Antimicrobian	Cefotetan	Sulfametoxazol
	Clavulanat de potasiu	Disodiu ticarcilină
	Fluconazol	Trimetoprim
	Piperacilină	Vancomicină
	Tazobactam sodiu	Micafungin
Compuși pentru tratarea virusurilor herpetice	Ganciclovir	Cidofovir
	Valganciclovir	Foscarnet
	Aciclovir	Letermovir
Medicamente imunosupresoare	Azatioprină	Prednison
	Ciclosporină	Sirolimus
	Everolimus	Tacrolimus
	Micofenolat mofetil	Acid micofenolic

Corelarea metodei

Performanța **cobas®** BKV a fost evaluată în raport cu un test comparator, prin analizarea specimenelor de plasmă EDTA de la pacienți infectați cu BKV. Specimenele de plasmă EDTA, din intervalul de cuantificare al ambelor teste, au fost testate ca replicări unice. A fost desfășurată analiza de regresie Deming.

Rezultatele regresiei Deming sunt prezentate în Figura 6.

Figura 6 Analiza regresiei cobas® BKV față de un test comparator

Eșec la nivelul întregului sistem

Rata de eșec a întregului sistem pentru cobas® BKV a fost determinată prin testarea a 100 replicări de plasmă EDTA la care s-a adăugat un specimen clinic pozitiv la BKV. Aceste probe au fost testate la o concentrație de $3 \times \text{LoD}$.

Rezultatele acestui studiu au indicat că toate replicările au fost valide și pozitive pentru ținta BKV, rezultând o rată de eșec la nivelul întregului sistem de 0% (un interval de încredere superior unilateral de 95% de 2,95%).

Contaminare încrucișată

Rata de contaminare încrucișată pentru cobas® BKV a fost stabilită prin testarea a 240 de replicări ale unei probe matrice negative la BKV și a 225 de replicări ale unei probe de ADN BKV cu titru ridicat la aproximativ $2,00\text{E}+07 \text{ UI/ml}$. În total, au fost efectuate cinci rulări cu probe pozitive și negative într-o configurație de tip grilă.

Toate cele 240 de replicări ale probei negative au fost negative, rezultând într-o rată de contaminare încrucișată de 0% (interval de încredere superior unilateral de 95% de 1,24%).

Caracteristici de performanță cheie pentru tipul de probă de urină obținute cu sistemele cobas® 6800/8800

Standardul internațional OMS pentru limita de detecție (LoD)

Limita de detecție a cobas® BKV pentru standardul internațional OMS a fost determinată prin analiza seriilor de diluții pentru Primul standard internațional OMS BKV obținute din NIBSC (NIBSC 14/212), în probe de urină cumulate negative la BKV stabilizate în cobas® PCR Media. Paneluri de șase niveluri de concentrație plus unul gol au fost testate cu trei loturi de reactivi cobas® BKV, rulări, zile, operatori și aparate multiple.

Rezultatele pentru probele de urină stabilizate în cobas® PCR Media sunt indicate în Tabelul 20 până la Tabelul 22. Studiul demonstrează că în lotul cel mai puțin sensibil, concentrația pentru care se așteaptă o rată de succes de 95% prin PROBIT este de 12,2 UI/ml cu un interval de încredere de 95% între 9,2 și 18,3 UI/ml în urină pură. Concentrația cea mai scăzută cu o rată de succes $\geq 95\%$ este de 10,0 UI/ml în urină pură.

Tabelul 20 Limita de detecție în urină, lotul 1

Concentrația titlului de intrare (ADN BKV UI/ml)*	Număr de replicări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de succes în %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	47	74,6
2,5	63	25	39,7
1,25	63	26	41,3
0	63	0	0,0
LoD după PROBIT la o rată de succes 95%	12,2 UI/ml 95% interval de încredere: 9,2–18,3 UI/ml		

* Probe de urină testate stabilizate în cobas® PCR Media. Concentrația titlului de intrare folosită pentru calcul în baza urinei pure.

Tabelul 21 Limita de detecție în urină, lotul 2

Concentrația titlului de intrare (ADN BKV UI/ml)*	Număr de replicări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de succes în %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	60	95,2
5,0	63	42	66,7
2,5	63	32	50,8
1,25	63	17	27,0
0	63	0	0,0
LoD după PROBIT la o rată de succes 95%	11,9 UI/ml 95% interval de încredere: 9,2–17,3 UI/ml		

* Probe de urină testate stabilizate în **cobas®** PCR Media. Concentrația titlului de intrare folosită pentru calcul în baza urinei pure.

Tabelul 22 Limita de detecție în urină, lotul 3

Concentrația titlului de intrare (ADN BKV UI/ml)*	Număr de replicări valide	Număr de rezultate pozitive	Rată de succes în %
40,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	61	96,8
5,0	63	46	73,0
2,5	63	39	61,9
1,25	63	19	30,2
0	63	0	0,0
LoD după PROBIT la o rată de succes 95%	10,1 UI/ml 95% interval de încredere: 7,8–14,7 UI/ml		

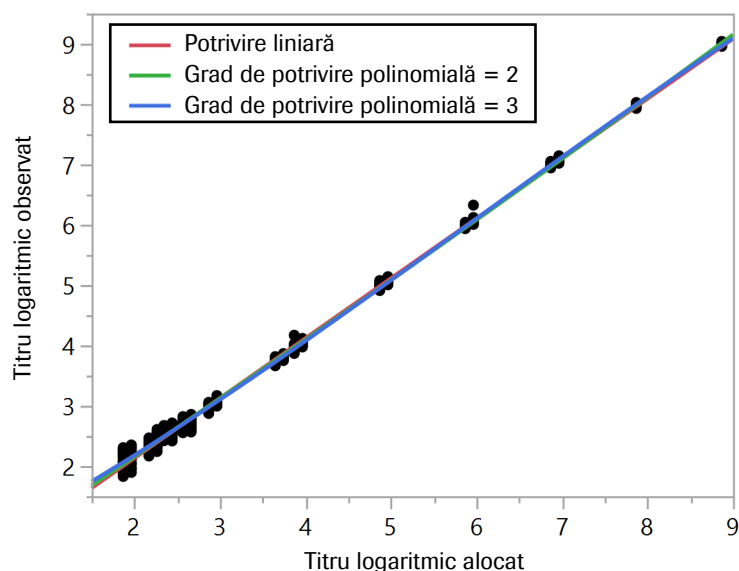
* Probe de urină testate stabilizate în **cobas®** PCR Media. Concentrația titlului de intrare folosită pentru calcul în baza urinei pure.

Interval liniar

Linearitatea **cobas®** BKV a fost evaluată folosind o serie de diluție constând din 10 membri ai panelului folosind un specimen clinic (BKV subgrupul lb) acoperind întregul interval liniar al testului. O soluție de ADN lambda cu un titru ridicat a fost folosită pentru a prepara 12 membri ai panelului acoperind întregul interval liniar.

Fiecare membru al panelului a fost testat în 36 de replicări în cadrul a trei loturi de reactivi **cobas®** BKV și rezultatele studiului sunt prezentate în Figura 7.

S-a demonstrat că **cobas®** BKV este liniar între $7,41\text{E}+01$ UI/ml și $7,41\text{E}+08$ UI/ml și prezintă o abatere absolută de la regresia neliniară care se potrivește mai bine de mai puțin sau egal cu $\pm 0,1 \log_{10}$ în probe de urină cumulate stabilizate în **cobas®** PCR Media (consultați Figura 7). În intervalul liniar, acuratețea testului a fost în limita $\pm 0,2 \log_{10}$.

Figura 7 Determinarea intervalului liniar în urină

Precizia — în cadrul laboratorului

Precizia **cobas®** BKV a fost stabilită prin analiza seriilor de diluții ale ADN-ului BKV cu titru ridicat (subgrupul Ib) în probe de urină cumulate negative la BKV stabilizate în **cobas®** PCR Media. Cinci niveluri de diluție au fost testate în 72 de replicări pentru fiecare nivel în cadrul a trei loturi de reactivi **cobas®** BKV folosind două aparate și doi operatori în 12 zile. Fiecare probă a fost purtată prin întreaga procedură **cobas®** BKV pe sistemele complet automatizate **cobas®** 6800/8800. Astfel, precizia raportată aici reprezintă toate aspectele procedurii de testare. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 23.

cobas® BKV a indicat o precizie ridicată pentru trei loturi de reactivi testați în cadrul intervalului de concentrație între 7,41E+02 UI/ml și 7,41E+05 UI/ml.

Tabelul 23 Precizia în cadrul laboratorului a **cobas®** BKV*

Concentrație nominală [UI/ml]	Concentrație alocată [UI/ml]	Urină stabilizată în cobas® PCR Media			
		Lot 1	Lot 2	Lot 3	Toate loturile
		AS	AS	AS	SD agregat
1,00E+06	7,41E+05	0,02	0,02	0,02	0,02
1,00E+05	7,41E+04	0,02	0,03	0,02	0,03
1,00E+04	7,41E+03	0,03	0,03	0,03	0,03
6,00E+03	4,44E+03	0,04	0,03	0,04	0,03
1,00E+03	7,41E+02	0,05	0,05	0,04	0,05

* Datele titrului sunt considerate distribuite log-normale și sunt analizate după transformarea $\log_{10}$. Coloana abaterilor standard (SD) prezintă totalul titrului log-transformat pentru fiecare dintre cele trei loturi de reactivi.

Verificarea subtipului

Performanța **cobas**® BKV pentru BKV subtipurile I (cu subgrupurile Ia și Ic), II, III și IV a fost evaluată prin:

- Verificarea limitei de detecție
- Verificarea intervalului liniar

Verificarea limitei de detecție pentru subtipurile I (cu subgrupurile Ia și Ic), II, III și IV

ADN-ul BKV pentru cinci subtipuri/subgrupuri diferite (Ia, Ic, II, III și IV) a fost diluat la trei niveluri de concentrație diferite în probe de urină cumulate negative la BKV stabilizate în **cobas**® PCR Media. Determinarea ratei de succes a fost efectuată cu 63 de replicări pentru fiecare nivel. Testarea s-a desfășurat cu trei loturi de reactivi **cobas**® BKV, rulări, zile, operatori și aparate multiple. Aceste rezultate verifică dacă **cobas**® BKV a detectat ADN BKV pentru cinci subtipuri/subgrupuri diferite la concentrații de 12,2 UI/ml cu o rată de succes de $\geq 95\%$.

Verificarea intervalului liniar pentru subtipurile I (cu subgrupurile Ia și Ic), II, III și IV

Seria de diluție folosită în verificarea studiului de linearitate a subtipului/subgrupului pentru **cobas**® BKV a constatat din opt membri ai panelului acoperind intervalul liniar al testului. Testarea a fost efectuată cu trei loturi de reactiv **cobas**® BKV, 12 replicări pe nivel au fost testate în urină stabilizată în **cobas**® PCR Media.

Intervalul liniar al **cobas**® BKV a fost verificat pentru toate cele cinci subtipuri/subgrupuri (Ia, Ic, II, III și IV).

Specificitate

Specificitatea **cobas**® BKV a fost determinată prin analiza probelor de urină negativă la BKV stabilizată în **cobas**® PCR Media de la donatori individuali. O sută de probe de urină au fost testate cu trei loturi de reactivi **cobas**® BKV. Toate probele au fost testate negative la ADN BKV. În panelul testului, specificitatea **cobas**® BKV a fost 100% (limită inferioară a intervalului de încredere de 95% unilateral: 97,05%).

Specificitate analitică

Specificitatea analitică a **cobas**® BKV a fost evaluată prin diluarea unui panel de microorganisme la o concentrație de între 1,00E+06 unități/ml și 2,00E+06 unități/ml (CFU/ml, celule/ml, CCU/ml, IFU/ml) pentru bacterii și levuri și la 1,00E+05 unități/ml (copii/ml, TCID₅₀/ml, UI/ml, celule/ml) pentru virusuri. Microorganismele au fost diluate în urină negativă la ADN BKV, precum și în urină conținând (600 UI/ml) ADN BKV. Organismele specifice testate sunt enumerate în Tabelul 24. Fiecare probă a fost testată în replicări de trei. Niciunul dintre patogenii non-BKV nu a interferat cu performanța testului la concentrațiile testate. Rezultate negative au fost obținute cu **cobas**® BKV pentru toate probele de microorganisme fără țintă BKV și rezultate pozitive au fost obținute pentru toate probele de microorganisme cu țintă BKV. Mai mult, titrul log₁₀ mediu al fiecăreia dintre probele pozitive la BKV care conținea organisme cu reactivitate încrucișată a fost $\pm 0,5$ log₁₀ din titrul log₁₀ mediu al controlului pozitiv adăugat respectiv.

Tabelul 24 Microorganisme testate pentru reactivitate încrucișată

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

Specificitatea analitică — substanțe care interferează

Niveluri ridicate de albumină (0,5% m/v), bilirubină conjugată (1% m/v), glucoză (1% m/v), celule mononucleare din sângele periferic (1,00E+06 celule/ml), mucus (în prezența a 1 tampon de mucus per 4,3 ml de specimen), pH acid (pH 4), pH alcalin (pH 9), spermă (1 tampon scufundat în spermă per 4,3 ml de specimen), sodiu (300 mEq/l) și sânge integral (10% v/v) în probe au fost testate în prezența (600 UI/ml) și în absența ADN BKV. S-a demonstrat că interferențele endogene testate nu interferează cu performanța de testare a **cobas®** BKV.

În plus, compuşii medicamentelor enumerați în Tabelul 25 au fost testați în prezența și absența ADN-ului BKV.

S-a demonstrat că toate substanțele care pot să interfereze, cu excepția pudrei de talc, nu interferează cu performanța de testare. Pudra de talc la $\leq 0,05\%$ a indicat că nu interferează cu **cobas®** BKV. Rezultate negative au fost obținute cu **cobas®** BKV pentru toate probele fără țintă BKV și rezultate pozitive au fost obținute pentru toate probele cu țintă BKV. Mai mult, titrul $\log_{10}$ mediu al fiecăreia dintre probele pozitive la BKV care conținea substanțe care este posibil să interfereze a fost $\pm 0,5 \log_{10}$ din titrul $\log_{10}$ mediu al controlului pozitiv adăugat respectiv.

Tabelul 25 Compușii medicamentelor testați pentru interferența cu cuantificarea ADN-ului BKV prin **cobas® BKV**

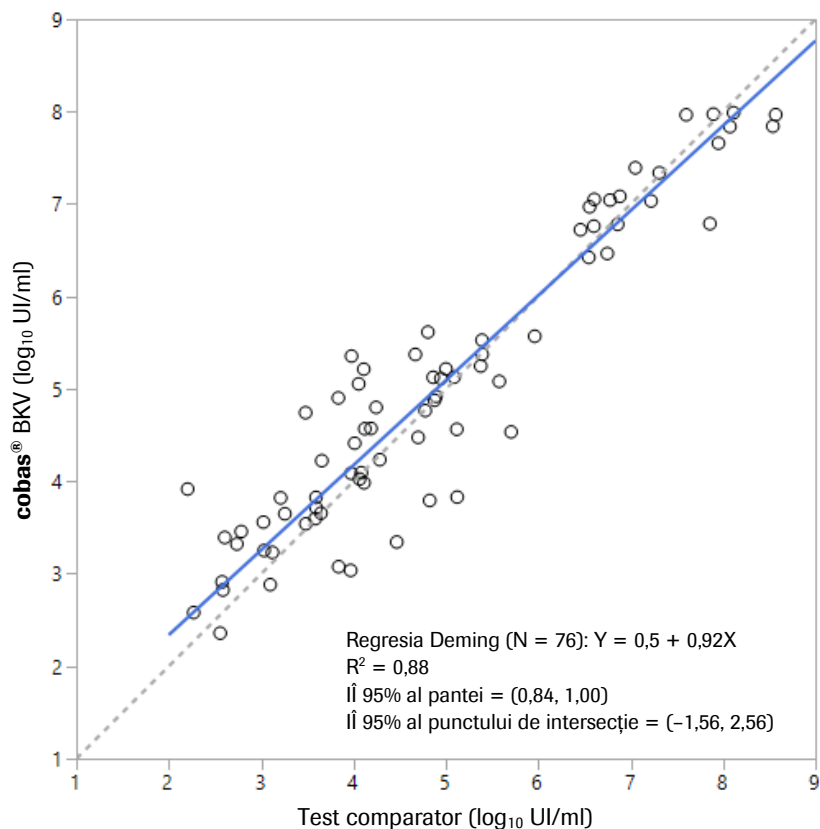
Clasa de medicamente	Ingredient activ	Concentrație	Numele medicamentului generic
Antimicrobian	Clotrimazol	100 µg/ml	Gyne-Lotrimin 7
	Metronidazol	701 µmol/l	Arilin rapid Supozitoare vaginale Cremă Vagi Metro Gel Nidazea
Hormoni steroizi estrogen	Estradiol	4,41 nmol/l	Estrace
Analgezice	Clorhidrat de fenazopiridină	200 µg/ml	Azo Standard
	Acetaminofen	1324 µmol/l	Acetaminofen
Lubrifiant	Propilenglicol	1000 µg/ml	K-Y UltraGel
Medicamente antiinflamatoare nesteroidiene	Acid acetilsalicilic	3,62 mmol/l	Acid acetilsalicilic
	Naproxen	2170 µmol/l	Naproxen
	Ibuprofen	2425 µmol/l	Ibuprofen
Nu este cazul	Talc	0,05% (m/v)	Pudră de talc

Corelarea metodei

Performanța **cobas®** BKV a fost evaluată în raport cu un test comparator, prin analizarea specimenelor de urină de la pacienți infectați cu BKV. Specimenele de urină, din intervalul de cuantificare al ambelor teste, au fost testate ca replicări unice. A fost desfășurată analiza de regresie Deming.

Rezultatele regresiei Deming sunt prezentate în Figura 8.

Figura 8 Analiza regresiei **cobas®** BKV față de un test comparator



Contaminare încrucișată

Rata de contaminare încrucișată pentru **cobas®** BKV a fost stabilită prin testarea a 240 de replicări ale unei probe matrice negative la BKV și a 225 de replicări ale unei probe de ADN BKV cu titru ridicat la aproximativ $1,00E+09$ UI/ml. În total, au fost efectuate cinci rulări cu probe pozitive și negative într-o configurație de tip grilă.

Toate cele 240 de replicări ale probei negative au fost negative, rezultând într-o rată de contaminare încrucișată de 0,0% (interval de încredere superior unilateral de 95% de 1,24%).

Evaluarea performanței cheie realizată pe sistemele cobas® 6800/8800

Reproductibilitatea cobas® BKV pentru tipul de probă plasmă EDTA

Reproductibilitatea cobas® BKV a fost evaluată pentru factori (lotul reactivului, centrul de testare, zilele lotului și de testare) care ar putea să afecteze rezultatele raportate în testarea clinică de rutină. Evaluarea a fost efectuată la 3 centre de testare, folosind 3 loturi de reactivi, cu un panel de probe pozitive și negative, rezultând un număr total de 270 teste per concentrație (fără a include controalele). Panelurile au fost realizate din plasmă EDTA care a fost BKV VCA IgG negativă și au fost testate pentru BKV cu un protocol de eliberare NAT pentru plasmă la care s-a adăugat un standard internațional OMS BKV sau un ADN de virus cultivat cu genotip lb BKV (cel mai frecvent genotip). Doi operatori din fiecare centru au testat fiecare lot de reactivi timp de 5 zile. Au fost efectuate două rulări (1 rulare = 1 lot; 1 lot = 1 panel + 3 controale) în fiecare zi și au fost efectuate 3 replicări ale fiecărei componente a panelului pentru fiecare rulare. Rezultatele evaluării sunt rezumate în Tabelul 26.

Tabelul 26 Procentul atribuibil al varianței totale (%TV), abaterea standard (SD) a preciziei totale și CV (%) lognormală a concentrației ADN BKV ($\log_{10}$ UI/ml) după membrul de panel pozitiv

Concentrația de ADN BKV estimată ($\log_{10}$ UI/ml)	Media observată ^a concentrația ADN BKV ($\log_{10}$ UI/ml)	Numărul de teste ^b	Lot %TV ^c (CV%) ^d	Centru %TV ^c (CV%) ^d	Zi/Operat or %TV ^c (CV%) ^d	Lot %TV ^c (CV%) ^d	În cadrul lotului %TV ^c (CV%) ^d	Precizia totală SD ^e	CV (%) lognormal precizie totală ^d
1,81	1,74	270	9% (20,63)	6% (17,69)	0% (0,00)	7% (19,15)	78% (68,05)	0,304	79,43
3,70	3,52	270	10% (9,79)	10% (9,57)	14% (11,44)	25% (15,16)	40% (19,38)	0,131	30,91
4,70	4,51	270	3% (4,42)	24% (13,46)	0% (0,00)	56% (20,58)	17% (11,27)	0,118	27,71
5,70	5,54	270	7% (5,66)	28% (11,50)	0% (0,00)	40% (13,85)	25% (10,84)	0,094	21,94
7,70	7,62	269	4% (3,27)	49% (11,00)	0% (0,00)	13% (5,60)	34% (9,10)	0,068	15,74

^a Calculată folosind procedura SAS MIXED.

^b Numărul de teste valide cu nivel ADN detectabil.

^c %TV = contribuția procentuală a varianței totale.

^d CV% = coeficientul de variație ca procent lognormal = $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Calculat folosind variabilitatea totală din procedura SAS MIXED

Notă: Acest tabel include numai rezultatele cu nivel ADN detectabil. SD = abatere standard. CV = coeficient de variație; BKV = virus BK.

cobas® BKV a prezentat reproductibilitate clinică acceptabilă la concentrații din întregul interval liniar. În plus, sistemul a detectat 100% din 3 × probe LLoQ. Sistemele **cobas®** 6800 și **cobas®** 8800 au în comun un sistem modular și au prezentat echivalență la folosirea **cobas®** BKV. Toate limitele de încredere 95% (CL) estimate pentru diferența dintre 2 măsurări de la același subiect au fost de cel mult $\pm 0,84 \log_{10}$ UI/ml, indicând faptul că testul poate să evalueze modificări în nivelurile ADN BKV care se consideră a fi semnificative clinic.

Din cele 270 de teste valide pentru membri panelului negativ efectuate cu sistemele **cobas®** 6800/8800, toate probele au indicat un rezultat „Target Not Detected”, de aceea, concordanța procentuală negativă (NPA) a fost de 100% cu ÎI 95% cuprins între 98,6% și 100%.

Performanța **cobas®** BKV pentru tipul de probă plasmă EDTA

Performanța clinică a **cobas®** BKV a fost evaluată în continuare la trei centre de testare prin măsurarea nivelurilor de ADN BKV în probe clinice (pure și diluate) de la pacienți infectați și neinfecți cu BKV și probe de plasmă EDTA prelucrate la care s-a adăugat virus BKV cultivat, în comparație cu un test bine-stabilit pentru acid nucleic dezvoltat în laborator (LDT) (comparator BKV LDT). Dintre toate probele testate cu **cobas®** BKV și testul BKV comparator, a existat un total de 550 de probe (217 de probe clinice pure și 303 diluate de la 129 subiecți cu transplant și 30 de probe prelucrate) care au fost valide în ambele teste și evaluabile pentru analiza de concordanță clinică (Tabelul 27).

Tabelul 27 Analiza de concordanță între **cobas®** BKV și comparatorul LDT pe rezultatele legate de nivelul ADN BKV pentru toate probele

cobas® BKV (log ₁₀ UI/ml)	Comparator BKV LDT (log ₁₀ UI/ml) Target Not Detected	Comparator BKV LDT (log ₁₀ UI/ml) < LLoQ (< 2,3)	Comparator BKV LDT (log ₁₀ UI/ml) Între 2,3 și < 3,0	Comparator BKV LDT (log ₁₀ UI/ml) Între 3,0 și < 3,7	Comparator BKV LDT (log ₁₀ UI/ml) Între 3,7 și 4,4	Comparator BKV LDT (log ₁₀ UI/ml) > 4,4	Total
Target Not Detected	107	7	5	0	0	0	119
< LLoQ (< 2,3)	23	51	39	0	0	0	113
Între 2,3 și < 3,0	0	3	40	62	1	0	106
Între 3,0 și < 3,7	0	0	1	71	42	0	114
Între 3,7 și 4,4	0	0	0	0	26	26	52
> 4,4	0	0	0	0	1	45	46
Total	130	61	85	133	70	71	550
Concordanța coloanei (%)	(130/130) 100,0%	(61/61) 100,0%	(80/85) 94,1%	(133/133) 100,0%	(69/70) 98,6%	(71/71) 100,0%	-
(Scor ÎI 95%) ^a	(97,1%, 100%)	(94,1%, 100,0%)	(87,0%, 97,5%)	(97,2%, 100,0%)	(92,3%, 99,7%)	(94,9%, 100,0%)	-

Notă: ÎI = interval de încredere; LLoQ = limita inferioară de cuantificare a comparatorului BKV LDT (200 UI/ml = 2,3 log₁₀ UI/ml). Abaterea standard a comparatorului BKV LDT estimată la 0,37 log₁₀ UI/ml (studiu de precizie analitică BKV LDT de la Universitatea din Indiana). Concentrația analitului de 3,0 log₁₀ UI/ml a reprezentat LLoQ + 2σ, 3,7 log₁₀ UI/ml a reprezentat LLoQ + 4σ și 4,4 log₁₀ UI/ml a reprezentat LLoQ + 6σ cu un interval de gamă de 2σ. Perechile de probe evaluabile pentru analiza concordanței clinice au fost incluse în acest tabel.

^a Independența presupusă între toate probele.

Rezultatele discordante au fost definite ca cele care se află la peste un pătrățel distanță de diagonală (indicat prin umbrire). Pentru Target Not Detected (TND) după concordanța coloanei LDT, celulele **cobas®** BKV Target Not Detected și < LLoQ (< 2,3) au fost combinate. Motivul adăugării celulelor < LLoQ și TND adiacente pentru coloana TND este acela că diferența dintre TND și < LLoQ nu este semnificativă clinic și că acestea se află analitic la capătul inferior al intervalului de măsurare, ceea ce poate să fie influențat de o eroare aleatorie.

Dintre cele 43 de probe negative la ADN BKV colectate pentru estimarea NPA cu **cobas®** BKV, 43 de probe au fost negative după **cobas®** BKV, astfel NPA a fost 100% cu ÎI exact 95% de între 91,8% și 100%.

Concordanța între **cobas®** BKV și comparatorul BKV LDT a fost evaluată și folosind diferite praguri clinice (Tabelul 28).

Tabelul 28 Rezumatul concordanței **cobas®** BKV și comparatorului BKV LDT folosind diferite praguri pentru toate probele

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

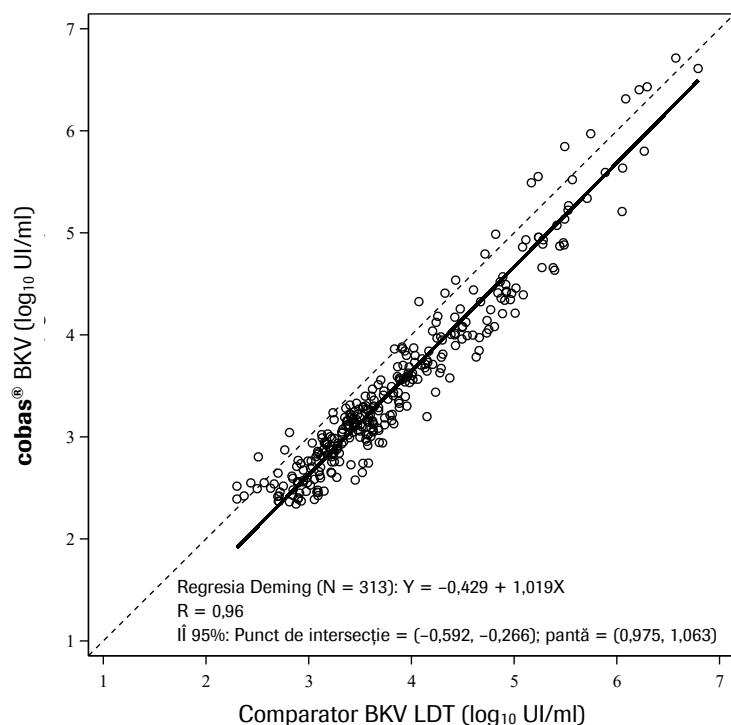
Notă: Probele cu rezultate Target Not Detected au fost clasificate drept < valoarea limită în UI/ml.

LLoQ = limita inferioară de cuantificare a comparatorului BKV LDT (200 UI/ml = 2,3 log₁₀ UI/ml).

Intervalul de încredere (ÎI) 95% calculat prin metoda scorului care presupune independența tuturor probelor.

* Praguri de 1000 UI/ml = 3,0 log₁₀ UI/ml și 10.000 UI/ml = 4,0 log₁₀ UI/ml.

Dintre toate probele testate cu **cobas®** BKV care au fost pozitive la BKV cu testul BKV comparator, a existat un total de 313 (133 de probe clinice pure și 159 de probe diluate de la 68 subiecți cu transplant și 21 probe prelucrate) care au fost evaluabile pentru analiza de corelație la trei centre de testare (Figura 9).

Figura 9 Corelația între **cobas®** BKV și comparatorul BKV LDT pentru toate probele: Grafic de regresie liniară Deming al nivelurilor de ADN (log₁₀ UI/ml)

Analiza suplimentară a graficului de comparație pentru diferențele de nivel ADN a indicat o diferență sistematică între ambele teste care este uniformă în intervalul liniar de suprapunere. Îl 95% al punctului de intersecție al liniei ajustate în graficele de comparație a fost (între $-0,404$ și $-0,168$), ceea ce se situează în limita $\pm 0,74 \log_{10}$ UI/ml (± 2 ori abaterea standard de precizie analitică a comparatorului BKV LDT). În plus, decalajul mediu a fost estimat la $-0,357 \log_{10}$ UI/ml și folosind ecuația liniei ajustate în graficele de comparație, diferența sistematică între cele două teste a fost $-0,343 \log_{10}$ UI/ml și $-0,362 \log_{10}$ UI/ml pentru probele cu niveluri ADN de 3 și respectiv 4 $\log_{10}$ UI/ml.

Reproductibilitatea cobas® BKV pentru tipul de probă urină stabilizată

Reproductibilitatea cobas® BKV a fost evaluată pentru factori (lotul reactivului, centrul de testare, zilele lotului și de testare) care ar putea să afecteze rezultatele raportate în testarea clinică de rutină. Evaluarea a fost efectuată la 3 centre de testare, folosind 3 loturi de reactivi, cu un panel de probe pozitive și negative, rezultând un număr total de 270 teste per concentrație (fără a include controalele). Panelurile au fost realizate din probe de urină stabilizată cu cobas® PCR Media care au fost confirmate negative la ADN BKV folosind un protocol de eliberare al testului pentru acidul nucleic din urină (NAT) și la care s-au adăugat standardul internațional OMS BKV sau ADN-ul virusului BKV genotip Ia. Doi operatori din fiecare centru au testat fiecare lot de reactivi timp de 5 zile. Au fost efectuate două rulări (1 rulare = 1 lot; 1 lot = 1 panel + 3 controale) în fiecare zi și au fost efectuate 3 replicări ale fiecărei componente a panelului pentru fiecare rulare. Rezultatele evaluării sunt rezumate în Tabelul 29.

Tabelul 29 Procentul atribuibil al varianței totale (%TV), abaterea standard (SD) a preciziei totale și CV (%) lognormală a concentrației ADN BKV ($\log_{10}$ UI/ml) după membrul de panel pozitiv (urină stabilizată)

Concentrația AND BKV estimată	Concentrația ADN BKV medie observată ^a	Numărul de teste ^b	Lot %TV ^c (CV%) ^d	Centru %TV ^c (CV%) ^d	Zi/ Operator %TV ^c (CV%) ^d	Lot %TV ^c (CV%) ^d	În cadrul lotului %TV ^c (CV%) ^d	Precizia totală SD ^e	Precizia totală CV(%) ^d
2,78	2,92	270	59% (12,64)	0% (1,15)	0% (0,00)	0% (0,00)	40% (10,41)	0,071	16,47
3,70	3,78	270	47% (8,14)	2% (1,62)	8% (3,31)	0% (0,00)	43% (7,72)	0,051	11,83
4,70	4,80	270	38% (5,02)	2% (1,28)	6% (2,07)	0% (0,00)	53% (5,96)	0,035	8,17
5,70	5,70	270	21% (3,12)	0% (0,00)	0% (0,00)	0% (0,00)	79% (6,12)	0,030	6,87
7,70	7,69	270	2% (1,51)	19% (4,84)	6% (2,79)	0% (0,00)	73% (9,53)	0,048	11,17

Notă: Acest tabel include numai rezultatele cu nivel ADN detectabil. SD = abatere standard; CV = coeficient de variație procentual; BKV = virus BK.

^a Calculată folosind procedura SAS MIXED.

^b Numărul de teste valide cu nivel ADN detectabil.

^c %TV = contribuția procentuală a varianței totale.

^d CV % = coeficientul de variație ca procent lognormal = $\sqrt{10^{[SD^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

^e Calculat folosind variabilitatea totală din procedura SAS MIXED.

cobas® BKV a prezentat reproductibilitate clinică acceptabilă la concentrații din întregul interval liniar. În plus, sistemul a detectat 100% din $3 \times$ probe LLoQ. Sistemele cobas® 6800 și cobas® 8800 au în comun un sistem modular și au prezentat echivalență la folosirea cobas® BKV. Toate limitele de încredere 95% (CL) estimate pentru diferența dintre 2 măsurări de la același subiect au fost de cel mult $\pm 0,20 \log_{10}$ UI/ml, indicând faptul că testul poate să evalueze modificări în nivelurile ADN BKV care se consideră a fi semnificative clinic. Sistemul a indicat o concordanță procentuală negativă de 99,26% cu

un ÎI de 97,3–99,9%. Dintre cele 270 de teste valide pentru membrii panelului negativ, 2 probe (0,74%) au indicat un nivel de ADN < pozitivitate LLoQ. Continuarea investigației pentru aceste rezultate a indicat că nu au fost asociate cu un anumit aparat/centru sau lot de reactivi. Secvențierea suplimentară a ADN-ului a confirmat prezența BKV. Secvențele BKV identificate au fost diferite de cele ale controlului pozitiv și tulpinii BKV folosite pentru pregătirea panelului, excluzând contaminarea din timpul pregătirii panelului și sugerând urme de virurie într-unul dintre cele 25 de specimene de urină din proba de urină cumulată care a fost folosită pentru pregătirea panelului negativ.

Performanța cobas® BKV pentru tipul de probă urină stabilizată

Performanța clinică a cobas® BKV a fost evaluată în continuare la trei centre de testare prin măsurarea nivelurilor de ADN BKV în probe clinice de urină de la pacienți infectați și neinfecțiați cu BKV care au fost stabilizate în cobas® PCR Media, în comparație cu un LDT bine-stabilit (comparator BKV LDT).

Dintre toate probele testate cu cobas® BKV și testul BKV comparator, a existat un total de 308 de probe de urină pure stabilizate în cobas® PCR Media de la 84 de subiecți cu transplant care au fost valide în ambele teste și evaluabile pentru analiza de concordanță clinică (Tabelul 30).

Tabelul 30 Analiza de concordanță între cobas® BKV și comparatorul LDT pe rezultatele legate de nivelul ADN BKV ($\log_{10}$ UI/ml) pentru toate probele (urină stabilizată)

cobas® BKV ($\log_{10}$ UI/ml)	Comparator BKV LDT Target Not Detected	Comparator BKV LDT < LLoQ (< 3,0)	Comparator BKV LDT Între 3,0 și < 3,3	Comparator BKV LDT Între 3,3 și < 3,6	Comparator BKV LDT Între 3,6 și 3,9	Comparator BKV LDT > 3,9	Total
Target Not Detected	62	6	0	0	0	0	68
< LLoQ (< 3,0)	4	22	0	0	0	1	27
Între 3,0 și < 3,3	0	2	0	0	0	0	2
Între 3,3 și < 3,6	0	0	6	3	0	0	9
Între 3,6 și 3,9	0	0	2	11	10	0	23
> 3,9	0	0	0	2	8	169	179
Total	66	30	8	16	18	170	308
Concordanța coloanei (%)	(66/66) 100,0%	(30/30) 100,0%	(6/8) 75,0%	(14/16) 87,5%	(18/18) 100,0%	(169/170) 99,4%	-
(Scor ÎI 95%) ^a	(94,5%, 100,0%)	(88,6%, 100,0%)	(40,9%, 92,9%)	(64,0%, 96,5%)	(82,4%, 100,0%)	(96,7%, 99,9%)	-

Notă: ÎI = interval de încredere; LLoQ = limita inferioară de cuantificare a comparatorului BKV LDT (1000 UI/ml = 3,0 $\log_{10}$ UI/ml); LDT = test dezvoltat în laborator; BKV = virus BK.

Abaterea standard a comparatorului BKV LDT estimată la 0,15 $\log_{10}$ UI/ml (studiu de validare a comparatorului BKV LDT).

Concentrația analitului de 3,3 $\log_{10}$ UI/ml a reprezentat LLoQ + 2 σ , 3,6 $\log_{10}$ UI/ml a reprezentat LLoQ + 4 σ și 3,9 $\log_{10}$ UI/ml a reprezentat LLoQ + 6 σ cu un interval de gamă de 2 σ .

Perechile de probe evaluabile pentru analiza concordanței clinice au fost incluse în acest tabel.

^a Independența presupusă între toate probele.

Secvențierea ADN pe probe reprezentative de la subiecți cu o abatere consecventă a rezultatelor cu mai mult de 1 log₁₀ UI/ml a nivelului de ADN nu a indicat nepotriviri de secvență pentru orice ținte de primer sau sondă pentru testul **cobas®** BKV. Rezultatele discordante au fost definite ca cele care se află la peste un pătrățel distanță de diagonală (indicat prin umbrire). Pentru Target Not Detected (TND) după concordanța coloanei LDT, celulele **cobas®** BKV Target Not Detected și < LLoQ (< 3,0) au fost combinate. Motivul adăugării celulelor < LLoQ și TND adiacente pentru coloana TND este acela că diferența dintre TND și < LLoQ nu este semnificativă clinic și că acestea se află analitic la capătul inferior al intervalului de măsurare, ceea ce poate să fie influențat de o eroare aleatorie. Dintre cele 66 de probe negative la ADN BKV colectate pentru estimarea NPA cu **cobas®** BKV, 61 au furnizat rezultate valide, toate cele 61 probe au fost negative după **cobas®** BKV, astfel NPA a fost 100% cu Î exact 95% de între 94,1% și 100%.

Concordanța între **cobas®** BKV și comparatorul BKV LDT a fost evaluată și folosind diferite praguri clinice (Tabelul 31).

Tabelul 31 Rezumatul concordanței **cobas®** BKV și comparatorului BKV LDT folosind diferite praguri pentru toate probele (urină stabilizată)

Prag*	Concordanță procentuală < pragul Î 95% (n/N)	Concordanță procentuală ≥ pragul Î 95% (n/N)
Target Not Detected	93,9% (62/66) (85,4%, 97,6%)	97,5% (236/242) (94,7%, 98,9%)
LLoQ (3,0 log ₁₀ UI/ml)	97,9% (94/96) (92,7%, 99,4%)	99,5% (211/212) (97,4%, 99,9%)
4,0 log ₁₀ UI/ml	90,9% (130/143) (85,1%, 94,6%)	99,4% (164/165) (96,6%, 99,9%)
7,0 log ₁₀ UI/ml	97,2% (242/249) (94,3%, 98,6%)	94,9% (56/59) (86,1%, 98,3%)

Notă: Probele cu rezultate Target Not Detected au fost clasificate drept < valoarea limită în UI/ml.

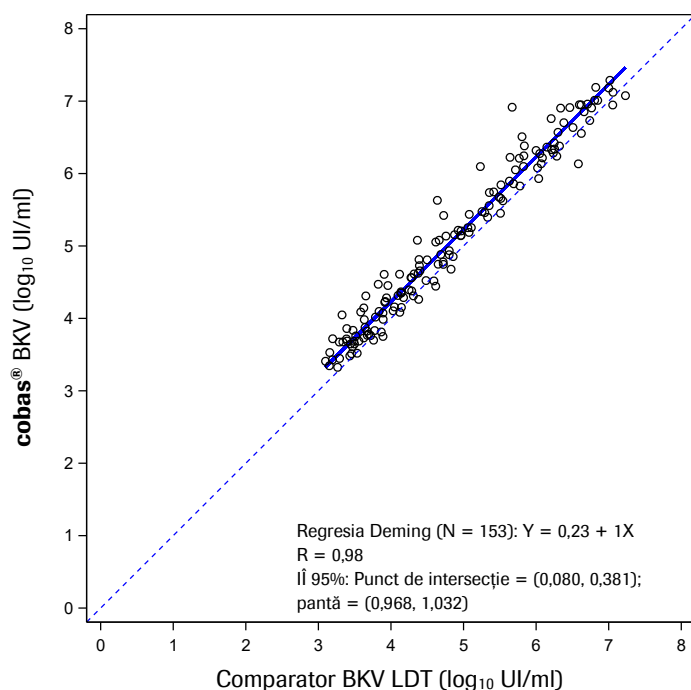
LLoQ = limita inferioară de cuantificare a comparatorului BKV LDT (1000 UI/ml = 3,0 log₁₀ UI/ml).

Intervalul de încredere (Î) 95% calculat prin metoda scorului care presupune independența tuturor probelor.

* Praguri de 10.000 UI/ml = 4,0 log₁₀ UI/ml și 10.000.000 UI/ml = 7,0 log₁₀ UI/ml.

Dintre toate probele testate cu **cobas®** BKV care au fost pozitive la BKV cu testul BKV comparator, a existat un total de 153 de probe clinice pure de urină stabilizate în **cobas®** PCR Media de la 55 subiecți cu transplant care au fost evaluabile pentru analiza de corelație la trei centre de testare (Figura 10).

Figura 10 Corelația între **cobas®** BKV și comparatorul BKV LDT pentru toate probele: Grafic de regresie liniară Deming al nivelurilor de ADN ($\log_{10}$ UI/ml) (urină stabilizată)



Analiza suplimentară a graficului de comparație pentru diferențele de nivel ADN a indicat o diferență sistematică între ambele teste care este uniformă în intervalul liniar de suprapunere. IÎ 95% al punctului de intersecție al liniei ajustate în graficele de comparație a fost (între 0,168 și 0,488), ceea ce se situează în limita $\pm 0,5 \log_{10}$ UI/ml. În plus, decalajul mediu a fost estimat la $0,231 \log_{10}$ UI/ml și folosind ecuația liniei ajustate în graficele de comparație, diferența sistematică între cele două teste a fost $0,248 \log_{10}$ UI/ml și $0,188 \log_{10}$ UI/ml pentru probele cu niveluri ADN de $4 \log_{10}$ UI/ml și $7 \log_{10}$ UI/ml, respectiv.

Echivalența sistemelor / compararea sistemelor

Echivalența sistemelor **cobas®** 5800, **cobas®** 6800 și **cobas®** 8800 a fost demonstrată prin studii de performanță. Rezultatele prezentate în instrucțiunile de utilizare susțin performanțe echivalente pentru toate sistemele.

Informații suplimentare

Componente de testare cheie

Tip probă	Plasmă EDTA	Urină stabilizată în cobas® PCR Media
Cantitate minimă de probă necesară	350 µl*	550 µl*
Volum de procesare a probei	200 µl	400 µl
Sensibilitate analitică	21,5 UI/ml (interval de încredere bilateral 95%: 16,3–32,4 UI/ml)	12,2 UI/ml (interval de încredere bilateral 95%: 9,2–18,3 UI/ml)
Interval liniar	Între 21,5 UI/ml și 1E+08 UI/ml	Între 200 UI/ml și 1E+08 UI/ml
Specificitate	100%	100%
Subtipuri detectate	Subtipuri I BKV (cu subgrupurile Ia, Ib și Ic), II, III și IV	

* A fost identificat un volum mort de 150 µl pentru tuburile secundare **cobas® omni**. Este posibil ca alte tuburi folosite pentru testare să aibă un volum mort diferit și să necesite un volum minim mai mic sau mai mare. Pentru informații suplimentare, contactați reprezentantul tehnic local Roche.

Simboluri

Următoarele simboluri sunt utilizate pe etichetele produselor de diagnostic Roche PCR.

Tabelul 32 Simboluri utilizate pe etichetele produselor de diagnostic Roche PCR

 Age/DOB	Vârsta sau data nașterii	 Dispozitiv nedestinat testării în proximitatea pacientului	 Dispozitiv nedestinat autotestării	 QS IU/PCR	Copii UI per reacție PCR, utilizați Unitățile Internaționale (UI) QS per reacție PCR pentru calcularea rezultatelor.
 SW	Software auxiliar	 Distribuitor (Notă: Țara/regiunea aplicabilă poate fi indicată sub simbol.)	 A nu se reutiliza	 SN	Număr de serie
 Assigned Range [copies/mL]	Interval atribuit (copii/mL)	 Feminin	 Exclusiv pentru evaluarea performanței IVD	 Site	Centru
 Assigned Range [IU/mL]	Interval atribuit (UI/mL)	 GTIN	Cod articol internațional (Global Trade Item Number)	 Procedure Standard	Procedură standard
 EC REP	Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană	 Importator	 IVD	 STERILE EO	Sterilizat cu oxid de etilenă
 BARCODE	Fișa de date cu coduri de bare	 LLR	Limita inferioară a intervalului atribuit	 A se păstra la întuneric	
 LOT	Cod lot	 Masculin		 Limită de temperatură	
 Riscuri biologice		 Producător		 TDF	Fișier de definire a testului
 REF	Număr de catalog	 CONTROL -	Control negativ	 ↑↑	Cu această parte în sus
 CE	Marcajul de conformitate CE; acest dispozitiv este conform cu cerințele aplicabile pentru marcajul CE aferent unui dispozitiv medical destinat diagnosticării <i>in vitro</i> .	 NON STERILE	Nesteril	 Procedure UltraSensitive	Procedură ultrasensibilă
 Collect Date	Data colectării	 ? Nume pacient		 UDI	Identificator unic dispozitiv
 Consultări instrucțiunile de utilizare		 # Număr pacient		 ULR	Limita superioară a intervalului atribuit
 Σ	Conține o cantitate suficientă pentru <n> teste	 Dezlipiți aici		 Urine Fill Line	Linie de umplere urină
 CONTENT	Conținut kit	 CONTROL +	Control pozitiv	 Rx Only	Numai pentru SUA: Legea federală permite vânzarea acestui dispozitiv numai de către sau la comanda unui medic.
 CONTROL	Control	 QS copies / PCR	Copii QS per reacție PCR, utilizați copii QS per reacție PCR pentru calcularea rezultatelor.	 Termen de valabilitate	
 Data fabricării					
 Dispozitiv destinat testării în proximitatea pacientului					
 Dispozitiv destinat autotestării					

Asistență tehnică

Pentru asistență tehnică, vă rugăm să contactați reprezentanța locală din regiunea dvs.:
https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Producător și importator

Tabelul 33 Producător și importator



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

Fabricat în SUA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Mărci comerciale și brevete

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

Copyright

©2023 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Referințe

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:453-5. PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. PMID: 23464993.
3. Morel V, Martin E, Francois C, et al. A Simple and Reliable Strategy for BK Virus Subtyping and Subgrouping. *J Clin Microbiol*. 2017;55:1177-85. PMID: 28151406.
4. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009;199:837-46. PMID: 19434930.
5. Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *J Infect*. 2014;68 Suppl 1:S2-8. PMID: 24119828.
6. Hirsch HH, Randhawa PS, AST Infectious Diseases Community of Practice. BK polyomavirus in solid organ transplantation-Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:e13528. PMID: 30859620.
7. Ambalathingal GR, Francis RS, Smyth MJ, Smith C, Khanna R. BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30:503-28. PMID: 28298471.
8. Yamada Y, Tsuchiya T, Inagaki I, Seishima M, Deguchi T. Prediction of Early BK Virus Infection in Kidney Transplant Recipients by the Number of Cells With Intranuclear Inclusion Bodies (Decoy Cells). *Transplant Direct*. 2018;4:e340. PMID: 29464201.
9. Nickeleit V, Singh HK. Polyomaviruses and disease: is there more to know than viremia and viruria? *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20:348-58. PMID: 25933251.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
11. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PMID: 7845459.
12. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78. PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.
15. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Centers for Disease Control and 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. Goetsch HE, Zhao L, Gnegy M, et al. Fate of the Urinary Tract Virus BK Human Polyomavirus in Source-Separated Urine. *Appl Environ Microbiol*. 2018;84. PMID: 29374036.
18. Boan P, Hewison C, Swaminathan R, et al. Optimal use of plasma and urine BK viral loads for screening and predicting BK nephropathy. *BMC Infect Dis*. 2016;16:342. PMID: 27448566.

Versiune document

Informații versiune document	
Doc Rev. 2.0 09/2022	Prima pagină și tabelele 2 și 3 au fost actualizate cu numere P/N suplimentare pentru kiturile de control. A fost actualizată secțiunea cu Mărci comerciale și brevete, inclusiv linkul. Contactați reprezentantul local Roche dacă aveți orice fel de întrebări.
Doc Rev. 3.0 05/2023	S-a readus volumul minim al probei la nivelul inițial din secțiunea Instrucțiuni de utilizare și din secțiunea Componente de testare cheie. A fost actualizată declarația autorității competente. Nota de subsol omisă a fost adăugată la Tabelul 20. Corecturi minore de formulare. A fost actualizată marca cobas®. Contactați reprezentantul local Roche dacă aveți orice fel de întrebări.

Rezumatul raportului privind siguranța și performanța poate fi găsit accesând următorul link:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>.