

cobas[®] EBV

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

Do stosowania w diagnostyce in vitro

cobas[®] EBV	P/N: 08688206190
cobas[®] EBV/BKV Control Kit	P/N: 08688214190
cobas[®] Buffer Negative Control Kit	P/N: 07002238190

Spis treści

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

Nieklinična ocena wiarygodności	19
Najważniejsze parametry działania testu	19
Granica wykrywalności (LoD)	19
Zakres liniowości	20
Dokładność wewnątrz laboratorium	21
Weryfikacja genotypu	21
Swoistość	22
Swoistość analityczna	22
Swoistość analityczna — substancje interferujące	22
Korelacja metody	23
Błąd całego systemu	24
Kontaminacja pomiędzy próbkami	24
Dodatkowe informacje	25
Najważniejsze cechy testu	25
Oznaczenia	26
Wytwórca i dystrybutorzy	27
Znaki towarowe i patenty	27
Copyright	27
Piśmiennictwo	28
Wersja dokumentu	30

Zastosowanie

cobas® EBV to test do amplifikacji kwasu nukleinowego w warunkach *in vitro* do ilościowego oznaczania DNA wirusa Epsteina-Barra (EBV) w ludzkim osoczu z krwi pobranej na EDTA.

Test **cobas® EBV** jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w diagnostyce i leczeniu zakażeń EBV u pacjentów po przeszczepach. U pacjentów monitorowanych pod kątem EBV można użyć seryjnych pomiarów poziomu DNA do wskazania potrzeby potencjalnych zmian leczenia i do oceny odpowiedzi wirusa na leczenie.

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

Podsumowanie oraz objaśnienie testu

Informacje podstawowe

Pacjenci po przeszczepach narażeni są na podwyższone ryzyko wielu zakażeń bakteryjnych i wirusowych, które wykazują większe prawdopodobieństwo wywołania ciężkiego niepożądanego wpływu na zdrowie w populacji po przeszczepach w porównaniu z ogólną, zdrową populacją. To zwiększone ryzyko w części wynika z osłabionego działania układu odpornościowego spowodowanego przez leki immunosupresyjne przyjmowane przez pacjentów po przeszczepach w celu zmniejszenia ryzyka odrzucenia przeszczepu.^{1,2}

EBV należy do grupy wirusów opryszczki. Jest to wirus z dwuniciowego kwasu rybonukleinowego (DNA) o długości około 172 kb w otoczce. Na podstawie różnic w genie EBNA-2 zidentyfikowano dwa główne genotypy EBV, typ 1 i typ 2. Zakażenia EBV są dość powszechne u ludzi, zakażonych jest ponad 90% dorosłych, a uśpione zakażenie utrzymuje się przez cały czas życia. Wirus EBV wywołuje zakaźną mononukleozę u podgrupy nowo zakażonych nastolatków i dorosłych, wiąże się go też z kilkoma typami nowotworów, włącznie z rakiem nosogardła, chłoniakiem Burkitta i chłoniakiem Hodgkina. EBV może wywoływać zaburzenia limfoproliferacyjne u osób z wrodzonym lub nabytym upośledzeniem odporności, włącznie z pacjentami po przeszczepach oraz pacjentami z wirusem ludzkiego upośledzenia odporności/zespołem nabytego upośledzenia odporności (HIV/AIDS).³

U pacjentów po przeszczepach EBV może wywołać chorobę przez reaktywację utajonego wirusa z komórek pamięci B lub przez nową infekcję zasadniczą, zwłaszcza u ujemnych względem EBV biorców przeszczepów, którzy otrzymali przeszczep od dawców dodatnich względem EBV.³ W przypadku takich pacjentów najcięższą postacią choroby związanej z EBV jest poprzyszczepowa choroba limfoproliferacyjna (PTLD) prowadząca do niekontrolowanej proliferacji limfocytów, zwykle typu B.⁴ Ogólnie >70% przypadków PTLD u pacjentów po przeszczepach wiązanych jest z zakażeniem EBV. Najwyższe ryzyko wystąpienia PTLD zachodzi podczas pierwszego roku po przeszczepie i >90% przypadków PTLD, które występują w tym okresie wiąże się z EBV. Do 20% przypadków PTLD występujących w ciągu pierwszego roku po przeszczepie jest ujemnych względem EBV.^{4,5}

Czynniki ryzyka dla wczesnego PTLD obejmują ujemny względem EBV w chwili przeszczepu status serologiczny biorcy, młodszy wiek, ekspozycję na przeciwciała powodujące deplecję limfocytów oraz typ przeszczepianego narządu.^{5,6}

Wczesne rozpoznanie zasadniczych zakażeń EBV i monitorowanie poziomu DNA może wspierać szybką interwencję terapeutyczną zapobiegającą postępowi choroby związanej z EBV. Wytyczne zalecają regularne monitorowanie EBV z użyciem ilościowych testów kwasów nukleinowych (NAT), w szczególności u ujemnych pod względem EBV biorców od dawców wysokiego ryzyka.^{4,5} Choć dokładna wartość poziomu wirusów we krwi wciąż podlega dyskusjom ze względu na zmienność pomiędzy oznaczeniami, pojęcie krytycznej wartości progowej wydaje się być poprawne i było zgłaszane w badaniach naukowych wykazujących, że wyższy poziom DNA EBV koreluje ze zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby EBV i PTLD.^{4,5,7} Do oznaczania poziomu EBV stosowano zarówno próbki osocza, jak i krwi pełnej, ale dowody sugerują, że osocze daje bardziej swoiste wyniki w zakresie wykrywania PTLD.^{4,5,7,8}

Powszechne postępowanie terapeutyczne mające na celu zmniejszenie poziomu DNA EBV i zapobieganie wystąpienia PTLD obejmuje zmniejszenie dawek leków immunosupresyjnych i leczenie przeciwciałami powodującymi deplecję limfocytów B.⁷ Leczenie zapobiegawcze mające na celu obniżenie poziomu DNA EBV jest skuteczne u większości

pacjentów, choć u do 20% pacjentów może i tak rozwinąć się PTLT, zwłaszcza u pacjentów, u których upłynął ponad rok od przeszczepu⁷.

Większość testów laboratoryjnych do ilościowego oznaczania EBV nie została wystandaryzowana, co prowadzi do zmienności międzylaboratoryjnej oraz zmienności pomiędzy oznaczeniami w wynikach poziomu DNA i wyklucza porównanie poziomów DNA uzyskiwanych przez różne laboratoria i testy⁷. W celu rozwiązania problemu WHO utworzyło międzynarodowy standard oznaczania ilościowego EBV, umożliwiając zgłaszanie ustandaryzowanym testom podawanie wyników w IU/ml⁹. Formalna ocena powtarzalności i ważności poziomu DNA EBV jest kluczowa do zapewnienia spójnych wyników z różnych laboratoriów w celu poprawy opieki klinicznej pacjentom narażonym na podwyższone ryzyko chorób związanych z EBV oraz PTLT.

Uzasadnienie badań NAT

Przed przeszczepem określa się status serologiczny dawcy i biorcy względem EBV, aby ułatwić określenie ryzyka biorcy względem powikłań związanych z EBV, jednak status serologiczny nie jest dostatecznie czuły ani precyzyjny do monitorowania pacjentów po przeszczepie. Metody namnażania EBV są powolne i mają niską wartość predykcyjną w tych warunkach. Bezpośrednia detekcja DNA wirusa EBV za pomocą PCR w czasie rzeczywistym potencjalnie oferuje szeroki zakres dynamiczny, precyzję, wysoką czułość i swoistość.

Objaśnienie testu

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

Zasady procedury

Test **cobas® EBV** opiera się na całkowicie zautomatyzowanym przygotowaniu próbek (ekstrakcji i oczyszczaniu kwasów nukleinowych), po którym przeprowadzana jest amplifikacja i detekcja podczas reakcji PCR. **cobas® 6800/8800 System** składa się z modułu podawania próbek, modułu transferu, modułu przetwarzania oraz modułu analitycznego.

Automatyczne przetwarzanie danych jest prowadzone przez oprogramowanie **cobas® 6800/8800**, które przypisuje wynik testu dla wszystkich badań jako: nie wykryto materiału docelowego, wykryto DNA EBV < dolnej granicy oznaczalności, wykryto DNA EBV > górnej granicy oznaczalności lub wartość w liniowym zakresie oznaczalności (dolna granica oznaczalności < x < górna granica oznaczalności). Wyniki można analizować bezpośrednio na ekranie systemu, można je eksportować lub wydrukować w postaci raportu.

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

Wybiórczą amplifikację docelowego kwasu nukleinowego z próbki osiąga się przez zastosowanie dwóch starterów, dla których obszarami docelowymi są swoiste dla wirusa docelowego, wysoce konserwatywne rejony EBV znajdujące się w genie EBV EBNA-1 oraz w genie EBV BMRF. Selektywna amplifikacja DNA-QS uzyskiwana jest przy użyciu starterów wiodącego i odwrotnego o swoistej sekwencji, które wybierane są tak, aby nie były homologiczne z genomem EBV. Do amplifikacji wykorzystywana jest termostabilna polimeraza DNA. Sekwencje docelowa oraz DNA-QS są amplifikowane jednocześnie przy użyciu uniwersalnego profilu amplifikacji PCR ze wstępnie zdefiniowanymi etapami temperatury i liczby cykli. Mastermiks zamiast trifosforanu deoksytymidyny (dTTP) zawiera trifosforan deoksyurydyny (dUTP), który jest wbudowywany do nowo syntetyzowanego DNA (amplikonu)^{10–12}. Wszystkie zanieczyszczające

amplikony z poprzednich reakcji PCR eliminowane są podczas pierwszego cyklu termicznego reakcji za pomocą znajdującego się w mieszaninie PCR enzymu AmpErase. Jednak nowo powstałe amplikony nie są eliminowane, gdyż enzym AmpErase jest inaktywowany w temperaturze przekraczającej 55°C.

Odczynnik Master Mix **cobas®** EBV zawiera dwie sondy wykrywające swoiste dla badanych sekwencji EBV i jedną dla DNA-QS. Sondy znakowane są za pomocą swoistych dla sekwencji docelowych fluorescencyjnych barwników reporterowych, pozwalających na równoczesne wykrywanie docelowej sekwencji EBV i DNA-QS w dwóch różnych kanałach detekcji^{13, 14}. Sygnał fluorescencyjny nienaruszonych sond jest tłumiony przez barwnik wygaszający. Podczas amplifikacji PCR hybrydyzacja sondy do swoistej sekwencji jednoniciowej matrycy DNA powoduje rozszczepienie nici przez polimerazę DNA dzięki jej aktywności nukleolitycznej w kierunku 5' do 3', co powoduje rozdzielanie barwników reporterowych i wygaszających oraz wygenerowanie sygnału fluorescencyjnego. Z każdym cyklem PCR generowana jest zwiększająca się liczba rozszczepionych sond i jednocześnie wzrasta sumaryczny sygnał barwnika reporterowego. Wykrycie w czasie rzeczywistym i rozróżnienie produktów PCR ma miejsce poprzez pomiar fluorescencji uwolnionych barwników reporterowych reprezentujących docelowe wirusy i DNA-QS.

Odczynniki i materiały

Odczynniki i kontrole do testu cobas® EBV

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

Tabela 1 cobas® EBV

cobas® EBV Przechowywać w temperaturze 2–8°C Kaseta na 192 testów (P/N 08688206190)		
Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw 192 testów
Roztwór proteinazy (PASE)	Bufor Tris, < 0,05% EDTA, chlorek wapnia, octan wapnia, 8% proteinazy EUH210: Karta charakterystyki dostępna na żądanie. EUH208: Zawiera subtylizynę. Może powodować wystąpienie reakcji alergicznej.	22,3 ml
DNA Quantitation Standard (DNA QS)	Bufor Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% konstruktu innego niż DNA EBV zawierającego starter wiążący region inny niż EBV oraz region unikatowej sondy (niezakaźny DNA), < 0,002% Poli-rA RNA (syntetyczny), < 0,1% azydku sodu	21,2 ml
Elution Buffer (EB)	Bufor Tris, 0,2% metylo-4-hydroksybenzoesan	21,2 ml
Mastermiks 1 (MMX-R1)	Octan magnezu, wodorotlenek potasu, < 0,1% azydku sodu	7,5 ml
Odczynnik EBV Master Mix 2 (EBV MMX-R2)	Bufor trycynowy, octan potasu, < 18% dimetylosulfotlenku, glicerol, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% starterów wiodącego i odwrotnego dla EBV, < 0,01% starterów wiodącego i odwrotnego standardu ilościowego, < 0,01% znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond oligonukleotydowych, swoistych dla EBV i standardu ilościowego EBV, < 0,01% aptameru oligonukleotydowego, < 0,1% polimerazy DNA Z05D, < 0,10% enzymu AmpErase (uracylo-N-glikozylazy) (bakteryjnej), < 0,1% azydku sodu	9,7 ml

Tabela 2 cobas® EBV/BKV Control Kit

cobas® EBV/BKV Control Kit			
Przechowywać w temperaturze 2–8°C (P/N 08688214190)			
Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw	Symbol bezpieczeństwa i ostrzeżenie*
EBV/BKV Low Positive Control (EBV L(+))C	< 0,001% syntetycznego (plazmidowego) DNA EBV opłaszczanego białkiem kapsydowym bakteriofaga lambda, prawidłowe osocze ludzkie, bez DNA EBV wykrywalnego metodami PCR. 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  OSTRZEŻENIE H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P272: Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wnosić poza miejsce pracy. P280: Stosować rękawice ochronne. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P362 + P364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. P501: Zawartość/pojemnik usuwać do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów. 55965-84-9 Masa reakcyjna: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [WE nr 247-500-7] i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu [WE nr 220-239-6] (3:1)
EBV/BKV High Positive Control (EBV/BKV H(+))C	< 0,001% syntetycznego (plazmidowego) DNA EBV opłaszczanego białkiem kapsydowym bakteriofaga lambda, prawidłowe osocze ludzkie, bez DNA EBV wykrywalnego metodami PCR. 0,1% substancji konserwującej ProClin® 300**	4 ml (8 × 0,5 ml)	  OSTRZEŻENIE H317: Może powodować reakcję alergiczną skóry. P261: Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P272: Zanieczyszczonej odzieży ochronnej nie wnosić poza miejsce pracy. P280: Stosować rękawice ochronne. P333 + P313: W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. P362 + P364: Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. P501: Zawartość/pojemnik usuwać do autoryzowanego zakładu utylizacji odpadów. 55965-84-9 Masa reakcyjna: 5-chloro-2-metylo-4-izotiazolin-3-onu [WE nr 247-500-7] i 2-metylo-2H-izotiazol-3-onu [WE nr 220-239-6] (3:1)

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

** Substancja niebezpieczna.

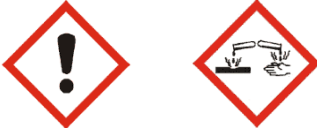
Tabela 3 cobas® Buffer Negative Control Kit

cobas® Buffer Negative Control Kit
Przechowywać w temperaturze 2–8°C
(P/N 07002238190)

Elementy zestawu	Skład odczynników	Ilość na zestaw
cobas® Buffer Negative Control (BUF (-) C)	Bufor Tris, < 0,1% azydku sodu, EDTA, < 0,002% poly rA RNA (syntetycznego)	16 ml (16 × 1 ml)

Odczynniki cobas omni do przygotowywania próbek

Tabela 4 Odczynniki cobas omni do przygotowywania próbek*

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

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

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

*** Substancja niebezpieczna.

Wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania odczynników

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

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

Tabela 5 Przechowywanie odczynników (umieszczonych poza systemem)

Odczynnik	Temperatura przechowywania
cobas® EBV – 192	2–8°C
cobas® EBV/BKV Control Kit	2–8°C
cobas® Buffer Negative Control Kit	2–8°C
cobas omni Lysis Reagent	2–8°C
cobas omni MGP Reagent	2–8°C
cobas omni Specimen Diluent	2–8°C
cobas omni Wash Reagent	15–30°C

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

Tabela 6 Warunki dotyczące daty ważności odczynników wymuszane przez systemy cobas® 6800/8800 System

Odczynnik	Data ważności zestawu	Stabilność otwartego zestawu	Liczba przebiegów pracy, do których można wykorzystać zestaw	Stabilność na pokładzie urządzenia (łącznie czas w urządzeniu poza lodówką)
cobas® EBV – 192	Nieprzekroczona	90 dni od pierwszego użycia	Maksymalnie 40 przebiegów	Maksymalnie 40 godzin
cobas® EBV/BKV Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy ^a	Nie dotyczy	Maksymalnie 8 godzin
cobas® Buffer Negative Control Kit	Nieprzekroczona	Nie dotyczy ^a	Nie dotyczy	Maksymalnie 10 godzin
cobas omni Lysis Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie*	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas omni MGP Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie*	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas omni Specimen Diluent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie*	Nie dotyczy	Nie dotyczy
cobas omni Wash Reagent	Nieprzekroczona	30 dni od umieszczenia w systemie*	Nie dotyczy	Nie dotyczy

^a Odczynniki jednorazowego użytku

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

Wymagane materiały dodatkowe

Tabela 7 Materiały i materiały zużywalne do użytku z systemami **cobas®** 6800/8800 System

Material	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Worek na odpady stałe	07435967001
Worek na odpady stałe i pojemnik na odpady stałe lub	07435967001 i 07094361001 lub
Worek na odpady stałe z wkładką i szufladą zestawu	08030073001 i 08387281001
Pojemnik na odpady stałe	07094361001
Probówki wtórne cobas omni 13×75 (opcjonalnie)	06438776001

Wymagane urządzenia i oprogramowanie

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

Tabela 8 Urządzenia

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

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z podręcznikiem użytkownika i/lub instrukcją obsługi systemów **cobas®** 6800/8800.

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

Wymagania dotyczące środków ostrożności i użytkowania

Ostrzeżenia i środki ostrożności

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

- Do stosowania wyłącznie w diagnostyce *in vitro*.
- Test **cobas®** EBV nie został zaprojektowany jako badanie przesiewowe na obecność wirusa EBV we krwi lub produktach krwiopochodnych.
- Ze wszystkimi próbkami pacjentów należy obchodzić się tak jak z materiałem zakaźnym, stosując procedury dobrej praktyki laboratoryjnej, takie jak określone w dokumentach Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories oraz CLSI Document M29-A4.^{15, 16} Procedurę tę powinien wykonywać wyłącznie personel doświadczony w obchodzeniu się z materiałem zakaźnym, użytkowaniu testu **cobas®** EBV i systemu **cobas®** 6800/8800.
- Wszystkie materiały pochodzenia ludzkiego należy uważać za potencjalnie zakaźne i postępować z nimi z zastosowaniem ogólnych środków ostrożności. W przypadku rozlania materiału należy natychmiast zdezynfekować świeżo przygotowanym 0,5% roztworem podchlorynu sodu w destylowanej lub dejonizowanej wodzie (wybielacz rozcieńczony w stosunku 1:10) lub postępować zgodnie z procedurami przyjętymi w danej instytucji.
- Zestaw **cobas®** EBV/BKV Control Kit zawiera osocze pochodzące z krwi ludzkiej. Materiał źródłowy prze-testowano metodami PCR i wykazano w nim akceptowalne ślady niskiego poziomu DNA EBV. Żadna ze znanych metod badania nie może zaoferować całkowitej pewności, że produkty otrzymane z ludzkiej krwi nie będą przenosić czynników zakaźnych.
- **Nie zamrażać krwi pełnej ani innych próbek przechowywanych w probówkach pierwotnych.**
- W celu zagwarantowania optymalnego działania testu należy stosować wyłącznie dostarczone lub wymienione potrzebne materiały zużywalne.
- Karty charakterystyki (ang. Safety Data Sheet, SDS) są dostępne na żądanie w miejscowym przedstawicielstwie firmy Roche.
- Ściśle przestrzegać podanych procedur i wytycznych w celu zapewnienia prawidłowego wykonania testu. Wszelkie odchylenia od procedur i wytycznych mogą mieć wpływ na optymalną skuteczność testu.
- Jeżeli w trakcie pracy z próbkami i ich przygotowywania nie stosuje się odpowiedniej kontroli kontaminacji pomiędzy próbkami, może dojść do uzyskania fałszywie dodatnich wyników.

Użytkowanie odczynników

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

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

Dobra praktyka laboratoryjna

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

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

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

Wszystkie próbki należy przechowywać w określonych temperaturach.

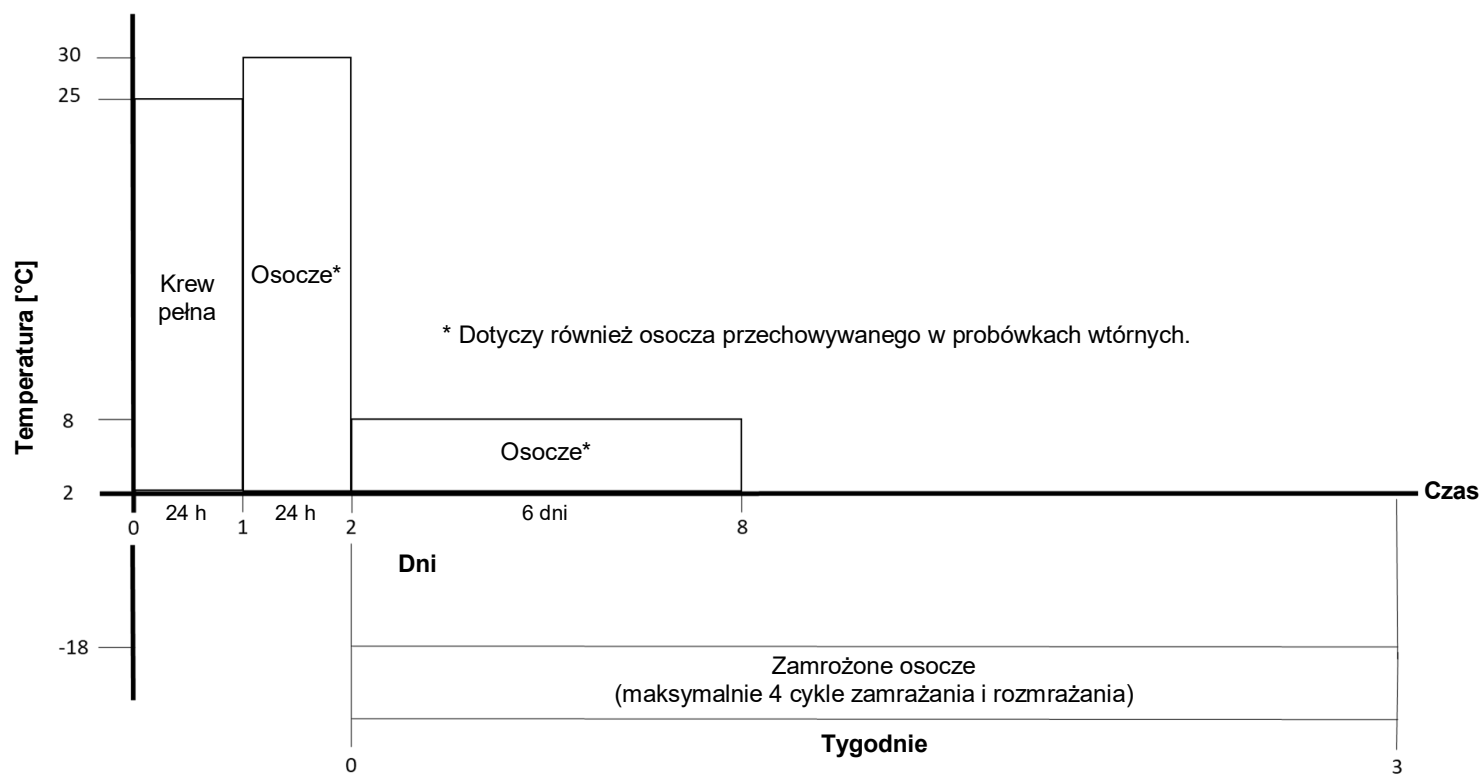
Podwyższona temperatura ma wpływ na stabilność próbek.

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

Próbki

- Krew pełną należy pobierać do probówek do otrzymywania nierozcieńczonego osocza BD Vacutainer® PPT™, przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant. Należy przestrzegać instrukcji producenta probówek do pobierania próbek. Należy zapoznać się z Ryc. 1.
- Krew pełna pobrana do probówek przeznaczonych do metod diagnostyki molekularnej BD Vacutainer® PPT™ lub do sterylnych probówek zawierających EDTA jako antykoagulant może być przechowywana i/lub transportowana do 24 godzin w temperaturze od 2°C do 25°C przed przygotowaniem osocza. Wirowanie powinno być przeprowadzane zgodnie z instrukcjami producenta.
- Po rozdzieleniu próbki, osocza można przechowywać przez 24 godziny w temperaturze 2–30°C w probówkach podstawowych lub wtórnych, a następnie:
 - Przechowywać w probówkach podstawowych lub wtórnych do 6 dni w temperaturze 2–8°C.
 - Przechowywać w probówkach wtórnych do 3 tygodni w temperaturze ≤ –18°C.
- próbki osocza zachowują stabilność przez maksymalnie cztery cykle zamrażania/rozmarzania w przypadku zamrożenia w temperaturze ≤ –18°C.

Ryc. 1 Warunki przechowywania próbek



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

Instrukcja użytkowania

Uwagi proceduralne

- Nie należy używać odczynników testu **cobas® EBV**, **cobas® EBV/BKV Control Kit**, **cobas® Buffer Negative Control Kit** i odczynników **cobas omni** po upływie ich daty ważności.
- Nie wykorzystywać ponownie materiałów zużywalnych. Są one przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku.
- Instrukcje dotyczące prawidłowej konserwacji urządzeń zawiera podręcznik użytkownika i/lub instrukcja obsługi systemów **cobas® 6800/8800 Systems**.

Wykonywanie testu cobas® EBV

Test **cobas® EBV** można przeprowadzić przy użyciu jednej minimalnej objętości próbki 200 µl. Procedurę wykonywania testu opisano szczegółowo w Podręczniku użytkownika i/lub instrukcji obsługi systemów **cobas® 6800/8800**. Na Ryc. 2 podsumowano tę procedurę.

Ryc. 2 Procedura testu **cobas® EBV**

1	Utwórz zlecenie/zlecenia
2	Uzupełnienie odczynników i materiałów zużywalnych po monitorowaniu przez system: • uzupełnij odczynnik płuczący, odczynnik do lizy oraz rozcieńczalnik, • uzupełnij płytki do przetwarzania oraz płytki amplifikacyjne, • uzupełnij szklane cząstki magnetyczne, • uzupełnij odczynniki specyficzne dla testu, • uzupełnij kasety z kontrolami, • uzupełnij statywy na końcówki, • Wymień statyw na niedrożne końcówki
3	Rozpocznij przebieg przez wybranie przycisku Rozpocznij manualnie w interfejsie użytkownika lub ustaw rozpoczęcie go automatycznie po 120 minutach bądź zapełnieniu partii.
4	Sprawdź i wyeksportuj wyniki
5	Wyładuj odczynniki i materiały zużywalne: • Wyjmij płytki do amplifikacji z modułu analitycznego • Wyjmij puste kasety z kontrolami • Usuń odpady stałe • Usuń odpady płynne

Wyniki

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

Kontrola jakości i ważność wyników

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

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

Znaczniki kontroli

Tabela 9 Oflagowania kontroli ujemnej i kontroli dodatnich

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

Jeśli partia kontroli zostanie unieważniona, należy powtórzyć badanie wszystkich próbek odnośnej partii.

Interpretacja wyników

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

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

Tabela 10 Interpretacja wyników dla poszczególnych materiałów docelowych

Wyniki	Interpretacja
Target Not Detected	Nie wykryto EBV DNA. Podać wynik jako „Nie wykryto EBV”.
< Titer Min	Obliczone miano jest niższe od dolnej granicy oznaczalności testu (LLoQ). Podać wynik jako „Wykryto EBV, miano poniżej (miano min.)”. Miano min. = 35,0 IU/ml
Titer	Obliczone miano znajduje się w zakresie liniowym testu — jest większe lub równie mianu min. oraz mniejsze lub równe mianu maks. Podać wynik jako „Wykryto (miano) EBV”.
> Titer Max ^a	Obliczone miano jest wyższe od górnej granicy oznaczalności testu (ULoQ). Podać wynik jako „Wykryto EBV, miano powyżej (miano maks.)”. Miano maks. = 1,0E+08 IU/ml

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

Ograniczenia metody

- Test **cobas**® EBV został oceniony jedynie pod kątem stosowania z **cobas**® EBV/BKV Control Kit, **cobas**® Buffer Negative Control Kit, **cobas omni** MGP Reagent, **cobas omni** Lysis Reagent, **cobas omni** Specimen Diluent i **cobas omni** Wash Reagent do użytku z **cobas**® 6800/8800 Systems.
- Uzyskanie wiarygodnych wyników zależy od prawidłowych procedur pobierania, przechowywania i wykorzystywania próbek.
- Test ten został zatwierdzony wyłącznie do badania osocza krwi pobranej na EDTA. Badanie innych rodzajów próbek przy użyciu testu **cobas**® EBV może dawać nieprawidłowe wyniki. Pomiarów wirerii w osoczu nie można bezpośrednio porównać z wiracją w innych typach próbek.
- Na oznaczenie ilościowe DNA wirusa EBV wpływ mogą mieć: metoda pobrania próbki, czynniki zależne od pacjenta (tj. wiek, obecność objawów) i (lub) stadium zakażenia.
- Podobnie jak w przypadku każdego testu molekularnego, mutacje w obrębie regionów docelowych testu **cobas**® EBV mogą wpływać na wiązanie startera i/lub sondy oraz spowodować zaniżenie miana lub niewykrycie wirusa.
- Z uwagi na różnice pomiędzy technologiami zaleca się, aby przed zmianą stosowanych metod użytkownik przeprowadził w laboratorium badania korelacji stosowanych metod w celu określenia występujących między nimi różnic jakościowych. Użytkownicy powinni postępować zgodnie z własnymi określonymi zasadami/procedurami.
- Test **cobas**® EBV nie jest przeznaczony do wykorzystania jako badanie przesiewowe na obecność wirusa EBV we krwi lub produktach krwiopochodnych.

Niekliniczna ocena wiarygodności

Najważniejsze parametry działania testu

Granica wykrywalności (LoD)

Międzynarodowy standard WHO

Granice wykrywalności testu **cobas® EBV** określono dzięki analizie seryjnych rozcieńczeń 1. międzynarodowego wzorca WHO dla DNA wirusa Epsteina-Barra do testów wykonywanych techniką amplifikacji kwasu nukleinowego (1. międzynarodowy wzorzec WHO EBV) uzyskanego z NIBSC (NIBSC 09/260), w ludzkim osoczu z krwi pobranej na EDTA ujemnym pod względem EBV. Panel składający się z sześciu poziomów stężeń i kontroli ślepej był testowany na trzech seriach odczytników **cobas® EBV**, wielu przebiegach, dniach, operatorach i aparatach.

Wyniki dla osocza z krwi pobranej na EDTA przedstawia Tabela 11 do Tabela 13. Badanie wykazało, że dla najmniej czułej serii stężenie, dla którego oczekuje się 95% trafności w analizie PROBIT wynosi 18,8 IU/ml przy 95% przedziale ufności od 14,5 do 27,5 IU/ml w osoczu z krwi pobranej na EDTA. Najniższe stężenie z odsetkiem trafności $\geq 95\%$ wynosi 20,0 IU/ml w osoczu z krwi pobranej na EDTA.

Tabela 11 Granica wykrywalności w osoczu z krwi pobranej na EDTA, seria 1

Stężenie wejściowe (DNA EBV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	62	98,4
20,0	63	61	96,8
10,0	63	53	84,1
5,0	63	37	58,7
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	18,8 IU/ml 95% przedział ufności: 14,5–27,5 IU/ml		

Tabela 12 Granica wykrywalności w osoczu z krwi pobranej na EDTA, seria 2

Stężenie wejściowe (DNA EBV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	63	100,0
10,0	63	58	92,1
5,0	63	35	55,6
2,5	63	20	31,8
0,0	63	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	12,4 IU/ml 95% przedział ufności: 10,0–17,0 IU/ml		

Tabela 13 Granica wykrywalności w osoczu z krwi pobranej na EDTA, seria 3

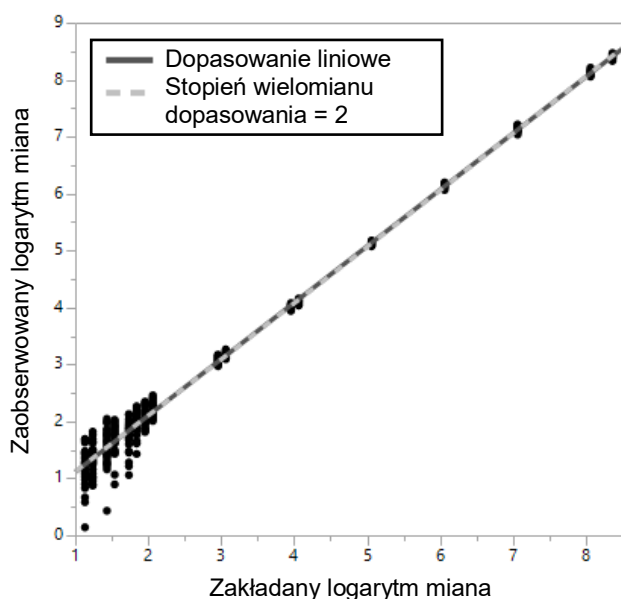
Stężenie wejściowe (DNA EBV IU/ml)	Liczba ważnych powtórzeń testu	Liczba wyników dodatnich	Odsetek trafności w %
50,0	63	63	100,0
35,0	63	63	100,0
20,0	63	62	98,4
10,0	63	48	76,2
5,0	63	38	60,3
2,5	63	26	41,3
0,0	63	0	0,0
LoD w analizie PROBIT przy 95% trafności	18,6 IU/ml 95% przedział ufności: 14,4–27,1 IU/ml		

Zakres liniowości

Liniowość testu **cobas®** EBV oceniono, wykorzystując rozcieńczenia seryjne zawierające 17 elementów panelu z DNA genotypu 1 EBV pokrywającymi zakres liniowy testu. Użyto wyższego miana podstawowego DNA lambda do przygotowania 11 elementów panelu obejmującego cały zakres liniowości. Użyto próbki klinicznej do przygotowania 6 elementów panelu obejmującego pośredni i niższy poziom zakresu liniowości.

Wszystkie elementy panelu testowano w 36 powtórzeniach w obrębie trzech serii odczynników testu **cobas®** EBV, a wyniki badania przedstawia Ryc. 3.

Wykazano, że test **cobas®** EBV jest liniowy w zakresie od $1,40E+01$ IU/ml do $2,30E+08$ IU/ml i wykazuje bezwzględne odchylenie od bardziej dopasowanej regresji nieliniowej wynoszące najwyżej $\pm 0,1 \log_{10}$ w ludzkim osoczu z krwi pobranej na EDTA (patrz Ryc. 3). W zakresie liniowym dokładność testu mieściła się w granicach $\pm 0,2 \log_{10}$.

Ryc. 3 Określanie zakresu liniowego w osoczu z EDTA

Dokładność wewnątrz laboratorium

Precyzję testu **cobas**® EBV określono dzięki analizie rozcieńczeń seryjnych wysokiego miana DNA EBV (genotyp 1) w osoczu z krwi pobranej na EDTA ujemnym dla EBV. Sześć poziomów rozcieńczeń zbadano w 72 powtórzeniach dla każdego poziomu w trzech seriach odczynników testu **cobas**® EBV przy użyciu trzech urządzeń oraz trzech operatorów przez 12 dni. Każda próbka przechodziła całą procedurę testu **cobas**® EBV na w pełni zautomatyzowanych **cobas**® 6800/8800 Systems. Dlatego podana dokładność odzwierciedla wszystkie aspekty procedury badawczej. Wyniki przedstawia Tabela 14.

Test **cobas**® EBV wykazywał wysoką precyzję dla trzech serii odczynników badanych w zakresie stężeń od 1,08E+02 IU/ml do 5,40E+07 IU/ml.

Tabela 14 Precyzja wewnątrzlaboratoryjna testu **cobas**® EBV

Stężenie nominalne [IU/ml]	Stężenie zakładane [IU/ml]	Osocze krwi pobranej na EDTA			
		Seria nr 1	Seria nr 2	Seria nr 3	Wszystkie serie
		OS	OS	OS	Pulowane OS
5,00E+07	5,40E+07	0,03	0,04	0,04	0,04
1,00E+06	1,08E+06	0,02	0,03	0,02	0,02
1,00E+05	1,08E+05	0,02	0,02	0,03	0,02
1,80E+04	1,08E+04	0,04	0,02	0,03	0,03
1,80E+03	1,08E+03	0,05	0,05	0,05	0,05
1,00E+02	1,08E+02	0,17	0,18	0,15	0,17

Weryfikacja genotypu

Wydajność testu **cobas**® EBV dla genotypu 2 EBV oceniano na podstawie:

- Weryfikacji granicy wykrywalności
- Weryfikacji zakresu liniowości

Weryfikacja granicy wykrywalności dla genotypu 2

DNA EBV dla genotypu 2 rozcieńczono do trzech poziomów stężeń w ujemnym względem EBV osoczu z krwi pobranej na EDTA. Określenie odsetka trafności przeprowadzono w 63 powtórzeniach dla każdego poziomu. Badania przeprowadzono z użyciem trzech serii odczynników **cobas**® EBV, w kilku przebiegach, przez kilka dni, w wykonaniu różnych operatorów i z użyciem różnych analizatorów. Wyniki dowodzą, że test **cobas**® EBV wykrywał DNA EBV genotypu 2 w stężeniu 18,8 IU/ml z odsetkiem trafności wynoszącym $\geq 95\%$.

Weryfikacja zakresu liniowości dla genotypu 2

Szereg rozcieńczeń stosowany podczas weryfikacji badania liniowości genotypów testu **cobas**® EBV zawierał osiem elementów panelu rozciągającego się na zakres liniowości oznaczenia. Badanie przeprowadzono z trzema partiami odczynnika **cobas**® EBV; zbadano 12 powtórzeń na poziom w osoczu krwi pobranej na EDTA.

Dla genotypu 2 zweryfikowano zakres liniowości testu **cobas**® EBV.

Swoistość

Swoistość testu **cobas®** EBV określono na podstawie analizy próbek EBV-ujemnego osocza z krwi pobranej na EDTA od indywidualnych dawców. Sto jeden pojedynczych próbek osocza z EDTA zbadano przy użyciu trzech serii odczynników testu **cobas®** EBV. Wszystkie badane próbki były ujemne pod względem DNA EBV. W panelu testu swoistość testu **cobas®** EBV wynosiła 100% (dolny jednostronny 95% przedział ufności wynoszący 97,08%).

Swoistość analityczna

Swoistość analityczną testu **cobas®** EBV oceniono w panelu rozcieńczeń drobnoustrojów do stężenia $1,00E+06$ jednostek/ml (komórek/ml, CFU/ml, IFU/ml, CCU/ml) dla bakterii i drożdży oraz $\geq 1,00E+05$ jednostek/ml (IU/ml, kopii/ml, komórek/ml, TCID₅₀/ml) dla wirusów w dodatnim pod względem DNA EBV i ujemnym pod względem DNA EBV osoczu z krwi pobranej na EDTA. Dwa swoiste badane organizmy podano w Tabeli 15. Każdy element panelu został przebadany przy użyciu testu **cobas®** EBV. Żaden z patogenów innych niż EBV nie zakłócał wiarygodności testu.

Tabela 15 Drobnoustroje badane pod kątem reaktywności krzyżowej

Wirusy	Bakterie	Drożdżaki
Adenowirus typ 5	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Poliomawirus BK	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Wirus cytomegalii	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
Wirus zapalenia wątroby typu B	<i>Clostridium perfringens</i>	
Wirus zapalenia wątroby typu C	<i>Enterococcus faecalis</i>	
Wirus Herpes Simplex typu 1	<i>Escherichia coli</i>	
Wirus Herpes Simplex typu 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Ludzki wirus opryszczki typu 6	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Ludzki wirus opryszczki typu 7	<i>Mycobacterium avium</i>	
Ludzki wirus opryszczki typu 8	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Ludzki wirus upośledzenia odporności 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Ludzki wirus upośledzenia odporności 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Wirus brodawczaka ludzkiego	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
Wirus JC	<i>Salmonella enterica</i>	
Parwovirus B19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Simian Virus 40		
Wirus ospy wietrznej-półpaśca		

Swoistość analityczna — substancje interferujące

Podwyższone poziomy trójglicerydów (33,0 g/l), bilirubiny związanej (0,2 g/l), bilirubiny niezwiązanej (0,2 g/l), albuminy (60,0 g/l), hemoglobiny (2,0 g/l) i ludzkiego DNA (2 mg/l) w próbkach badano z i bez DNA EBV. Wykazano, że testowane interferencje endogenne nie zakłócały działania testu **cobas®** EBV.

Dodatkowo składniki leków wymienione w Tabeli 16 badano w stężeniu trzy razy C_{max} z i bez DNA EBV.

Żadna z potencjalnie zakłócających substancji nie wykazywała interferencji z testem.

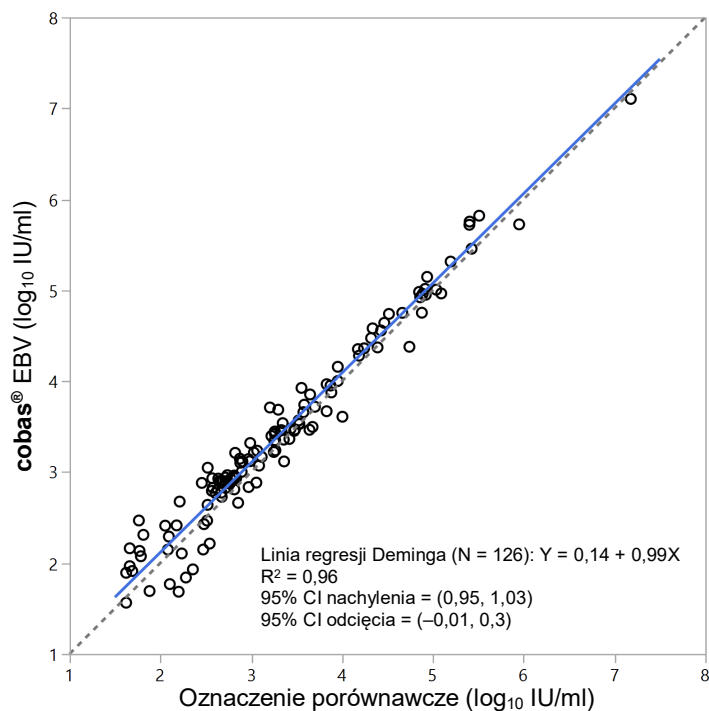
Tabela 16 Składniki leków badane pod kątem interferencji z ilościowym oznaczeniem DNA EBV w teście cobas® EBV

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

Korelacja metody

Wydajność testu cobas® EBV oceniono względem oznaczenia porównawczego przez analizę próbek osocza z krwi pobranej na EDTA od pacjentów zakażonych wirusem EBV. Próbkę osocza z krwi pobranej na EDTA w zakresie oznaczenia obu testów zbadano w pojedynczych powtórzeniach. Przeprowadzono analizę regresji Deminga.

Rys. 4 zawiera wyniki regresji Deminga.

Rys. 4 Analiza regresji testu cobas® EBV w odniesieniu do oznaczenia porównawczego

Błąd całego systemu

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

Wyniki tego badania wykazały, że we wszystkich powtórzeniach stwierdzono ważność i reaktywność względem sekwencji docelowej EBV, co dało częstość występowania błędu systemowego na poziomie 0% (górny jednostronny 95% przedział ufności wynoszący 2,95%).

Kontaminacja pomiędzy próbkami

Częstość występowania kontaminacji pomiędzy próbkami w teście **cobas**® EBV określono przez oznaczenie 240 powtórzeń próbek osocza ujemnego dla EBV i 225 powtórzeń próbek wysokiego miana EBV na poziomie około $2,00\text{E}+07$ IU/ml. Łącznie wykonano pięć przebiegów z użyciem próbek dodatnich i ujemnych w układzie naprzemiennym.

Wszystkie 240 powtórzeń ujemnej próbki było ważnych i dało wynik ujemny, dając współczynnik kontaminacji krzyżowej wynoszący 0% (górny jednostronny 95% przedział ufności wynoszący 1,24%).

Dodatkowe informacje

Najważniejsze cechy testu

Rodzaj próbki	Osocze krwi pobranej na EDTA
Wymagana ilość próbki	350 µl*
Objętość przetwarzania	200 µl
Czułość analityczna	18,8 IU/ml
Zakres liniowości	35,0 IU/ml – 1E+08 IU/ml
Swoistość	100%
Wykrywane genotypy	Genotypy 1 i 2 EBV

* Dla próbek wtórnych **cobas omni** zidentyfikowano objętość martwą wynoszącą 150 µl. Inne próbki używane do testów mogą mieć inną objętość martwą i wymagać większej lub mniejszej objętości minimalnej.

Oznaczenia

Na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR stosuje się następujące oznaczenia.

Tabela 17 Oznaczenia stosowane na etykietach produktów diagnostycznych Roche PCR

	Oprogramowanie pomocnicze		Dolna granica przypisanego zakresu		Kontrola ujemna
	Autoryzowany Przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej		Górna granica przypisanego zakresu		Kontrola dodatnia
	Arkusze kodów kreskowych		Przechowywać z dala od światła		Próba kontrolna
	Kod partii		Zawartość wystarczająca na <n> testów		Przypisany zakres (kopie/ml)
	Zagrożenie biologiczne		Przestrzegać zakresu temperatury		Przypisany zakres (IU/ml)
	Numer katalogowy		Plik definicji testów		Procedura standardowa
	Sprawdź w instrukcji obsługi		Wytwórca		Procedura ultraczuła
	Zawartość zestawu		Termin ważności		Kopie QS na reakcję PCR, użyć kopii QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.
	Dystrybucja		Numer pozycji handlu globalnego		IU QS na reakcję PCR, użyć jednostek międzynarodowych (IU) QS na reakcję PCR w obliczeniach wyników.
	Wyłącznie do oceny działania w badaniach IVD		Numer seryjny		
Rx Only	Tylko Stany Zjednoczone: Prawo federalne zezwala na sprzedaż tego urządzenia wyłącznie lekarzowi lub na zamówienie takiego lekarza.		Data produkcji		
	Wyrób do diagnostyki <i>in vitro</i>		Nie używać повторно		

Linia pomocy technicznej dla klientów w Stanach Zjednoczonych 1-800-526-1247

Wytwórca i dystrybutorzy

Tabela 18 Wytwórca i dystrybutorzy



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



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

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

Znaki towarowe i patenty

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

Copyright

©2019 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Piśmiennictwo

1. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:453-5. doi: 10.1038/bmt.2009.254. PubMed PMID: 19861977.
2. Green M. Introduction: Infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:3-8. doi: 10.1111/ajt.12093. PubMed PMID: 23464993.
3. Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000;343:481-92. doi: 10.1056/NEJM200008173430707. PubMed PMID: 10944566.
4. Styczynski J, van der Velden W, Fox CP, et al.; Sixth European Conference on Infections in Leukemia, a joint venture of the Infectious Diseases Working Party of the European Society of Blood and Marrow Transplantation (EBMT-IDWP), the Infectious Diseases Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC-IDG), the International Immunocompromised Host Society (ICHS) and the European Leukemia Net (ELN). Management of Epstein-Barr Virus infections and post-transplant lymphoproliferative disorders in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Sixth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6) guidelines. *Haematologica*. 2016;101:803-11. doi:10.3324/haematol.2016.144428. Review. PubMed PMID: 27365460; PubMed Central PMCID: PMC5004459.
5. Allen UD, JK Preiksaitis; AST Infectious Diseases Community of Practice. Epstein-Barr virus and posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13 Suppl 4:107-20. doi: 10.1111/ajt.12104. PubMed PMID: 23465004.
6. San-Juan R, Comoli P, Caillard S, Moulin B, Hirsch HH, P Meylan; ESCMID Study Group of Infection in Compromised Hosts. Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 7:109-18. doi: 10.1111/1469-0691.12534. PubMed PMID: 24475976.
7. Nijland ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, Ten Berge IJ. Epstein-Barr virus-positive posttransplant lymphoproliferative disease after solid organ transplantation: pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Transplant Direct*. 2015;2:e48. . doi: 10.1097/TXD.0000000000000557. eCollection 2016 Jan. PubMed PMID: 27500242; PubMed Central PMCID: PMC4946499.
8. Tsai DE, Douglas L, Andreadis C, et al. EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: results of a two-arm prospective trial. *Am J Transplant*. 2008;8:1016-24. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02183.x. PubMed PMID: 18312608.
9. Fryer JF, Heath AB, Wilkinson DE, et al.; Collaborative Study Group. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein-Barr virus for nucleic acid amplification techniques. *Biologicals*. 2016;44:423-33. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.04.010. Epub 2016 Jul 22. PubMed PMID: 27461128.
10. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PubMed PMID: 2227421.
11. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PubMed PMID: 7845459.
12. Mol CD, Arvai AS, Slupphau G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-78. PubMed PMID: 7697717.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992;10:413-7. PubMed PMID: 1368485.
14. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. doi: 10.1101/gr.6.10.986. PubMed PMID: 8908518.

15. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Wersja dokumentu

Informacje dotyczące wersji dokumentu	
Doc Rev. 1.0 07/2019	Pierwsza publikacja.