

Test EBV Quant (System Panther Fusion®)

Do diagnostyki *in vitro*

Tylko na eksport poza USA

SPIS TREŚCI

Informacje ogólne	2
Zastosowanie	2
Podsumowanie i objaśnienie testu	2
Zasady procedury	2
Ostrzeżenia i środki ostrożności	3
Wymagania dotyczące przechowywania odczynników i postępowania z nimi	6
Pobieranie, przetwarzanie i przechowywanie próbek	7
Próbki w aparacie systemu Panther Fusion	8
Transport próbek	8
Panther Fusion System	9
Odczynniki i materiały dostarczane dla testu EBV Quant Panther Fusion	9
Materiały wymagane i dostępne osobno	10
Materiały opcjonalne	11
Procedura testu w systemie Panther Fusion	11
Uwagi dotyczące procedur	13
Kontrola jakości	14
Kalibracja testu	14
Kontrole ujemne i dodatnie	14
Kontrola wewnętrzna	14
Interpretacja wyników	15
Ograniczenia	16
Skuteczność	17
Granica wykrywalności przy zastosowaniu 1. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO	17
Zakres liniowy	18
Dolna granica oznaczenia ilościowego przy zastosowaniu 1. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO	18
Potwierdzenie dolnej granicy oznaczenia ilościowego dla różnych genotypów EBV	19
Identyfikowalność według 1. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO	20
Precyzja w obrębie laboratorium	21
Substancje powodujące potencjalne interferencje	21
Swoistość analityczna	23
Korelacja metod	24
Przenoszenie/zanieczyszczenie krzyżowe	24
Bibliografia	25
Dane kontaktowe i historia wersji	26

Informacje ogólne

Zastosowanie

Test Panther Fusion® EBV Quant to w pełni zautomatyzowany test PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR) oparty na amplifikacji kwasów nukleinowych *in vitro* przeznaczony do ilościowego oznaczania DNA wirusa Epsteina-Barr (EBV) w ludzkim osoczu EDTA.

Test Panther Fusion EBV Quant jest przeznaczony do użycia pomocniczo podczas diagnozowania i zarządzania leczeniem pacjentów po przeszczepie narządów litych oraz pacjentów po przeszczepie hematopoetycznych komórek macierzystych.

Test Panther Fusion EBV Quant nie jest przeznaczony do stosowania jako test przesiewowy na obecność wirusa EBV w krwi lub produktach krwiopochodnych. Ten test przeznaczony jest do użytkowania z systemem Panther Fusion.

Podsumowanie i objaśnienie testu

EBV to wszechobecny wirus o liniowym, dwuniciowym DNA o wielkości 172 kb, należący do rodziny wirusów opryszczki. Istnieją dwa główne genotypy wirusa EBV, typ 1 i 2, rozróżniane na podstawie różnic w genie *EBNA-2*.

Po zakażeniu pierwotnym wirus EBV przedostaje się do krążących limfocytów B i pozostaje w nich w formie latentnej. Szacuje się, że zakażenie wirusem EBV obejmuje 90% populacji ludzi na świecie.¹ U osób z prawidłową odpornością zakażenie wirusem EBV może przebiegać bezobjawowo w dzieciństwie. Zakażenie wirusem EBV może jednak prowadzić do mononukleozy zakaźnej² u osób dorosłych i jest związane z różnymi typami raków: chłoniakami, białaczkami, nowotworami złośliwymi nabłonka i rakiem żołądka.³

W przypadku osób o obniżonej odporności, np. u biorców przeszczepów i osób zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV), reaktywacja wirusa EBV może skutkować złośliwą limfoproliferacją i jest istotną przyczyną zachorowalności i śmiertelności. Większość nowotworów związanych z wirusem EBV, występujących pod nazwą potransplantacyjnych chorób limfoproliferacyjnych (PTLD), pojawia się zazwyczaj w ciągu pierwszego roku od przeszczepu.³

Ilościowe oznaczenie oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych w próbkach krwi pełnej lub osocza jest preferowaną metodą monitorowania zakażenia i choroby spowodowanych wirusem EBV u biorców przeszczepów, ponieważ jest szybkie, czułe, wygodne i nieinwazyjne. W ramach najnowszych wytycznych zalecane jest cotygodniowe monitorowanie wiremii wirusa EBV w celu ułatwienia decyzji o rozpoczęciu leczenia skierowanego przeciwko wirusowi EBV i monitorowania odpowiedzi na leczenie.⁴

W zasadzie wyższe wartości wiremii wirusa korelują ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na chorobę związaną z wirusem EBV.⁵ Z tego względu ilościowe oznaczenie DNA wirusa EBV w połączeniu z obrazem klinicznym i innymi markerami laboratoryjnymi jest kluczowe w leczeniu pacjentów zakażonych wirusem EBV.

Zasady procedury

Przetwarzanie próbek, w tym liza komórek, wychwytywanie kwasów nukleinowych, amplifikacja i detekcja, na potrzeby testu Panther Fusion EBV Quant jest wykonywane w systemie Panther Fusion w sposób w pełni zautomatyzowany. Test Panther Fusion EBV Quant jest ukierunkowany na silnie konserwatywny gen *EBNA-1*, aby zapewnić dokładne ilościowe oznaczenie DNA wirusa EBV. Test jest standaryzowany do 1. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO (kod NIBSC: 09/260) dla EBV.⁶

Przetwarzanie próbki i wychwyt kwasu nukleinowego: Kontrola wewnętrzna (IC-B) jest dodawana automatycznie do każdej próbki poprzez obróbkę odczynnika wychwytyjącego systemu Panther Fusion (Fusion Capture Reagent-B) (wFCR-B) do monitorowania interferencji podczas przetwarzania próbki, amplifikacji i wykrywania spowodowanych brakiem działania odczynnika lub substancjami hamującymi. Próbkę są najpierw dodawane do Fusion Capture Reagent-B (FCR-B) i odczynnika Fusion Enhancer Reagent-B (FER-B) w celu uwolnienia kwasu nukleinowego do hybrydyzacji z cząstkami magnetycznymi. Wychwytywane cząstki są następnie oddzielane od pozostałości matrycy próbki w polu magnetycznym w serii etapów przemycania łagodnym detergentem. Wychwycony kwas nukleinowy jest następnie poddany elucji z cząstek magnetycznych za pomocą odczynnika o niskiej sile jonowej (bufor elucyjny Panther Fusion).

Uwaga: System Panther Fusion doda odczynnik IC-B do odczynnika FCR-B. Odczynnik powstały po dodaniu odczynnika IC-B do odczynnika FCR-B nazywany jest wFCR-B.

Amplifikacja PCR i wykrywanie fluorescencji: Liofilizowana, pojedyncza porcja mieszaniny reakcyjnej Master Mix do reakcji PCR jest rekonstruowana przy użyciu buforu do rekonstrukcji Panther Fusion I, a następnie łączona z eluowanym kwasem nukleinowym w próbce reakcyjnej. Odczynnik Panther Fusion Oil dodaje się, aby zapobiec parowaniu podczas reakcji PCR. Następnie amplifikacja sekwencji docelowych podczas reakcji PCR zachodzi w obecności swoistych starterów przednich i wstecznych oraz sondy generującej sygnał fluorescencyjny.

Wartość Ct generowana przez system Panther Fusion jest proporcjonalna do stężenia wirusa EBV w badanej próbce. Stężenie próbki jest określone przez oprogramowanie systemu Panther Fusion przy użyciu wartości Ct uzyskanych dla każdej reakcji i przez porównanie ich z krzywą kalibracyjną. Wyniki na obecność wirusa EBV uzyskane dla próbek osocza są podawane w następujących jednostkach: j.m./ml i $\log_{10}$ j.m./ml. Elementy szukane i kanały użyte do ich wykrycia w systemie Panther Fusion zostały zestawione w tabeli poniżej:

Element szukany	Szukany gen	Kanał przyrządu
EBV	EBNA-1	HEX
Kontrola wewnętrzna	Nie dotyczy	Quasar® 705

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Do diagnostyki *in vitro*.
- Do użycia przez profesjonalistów.
- Przed wykonaniem testu uważnie przeczytaj całą ulotkę załączoną do opakowania i *Instrukcja obsługi systemu Panther®/Panther Fusion*.
- Odczynnik wzmacniający Panther Fusion-B (FER-B) jest żrący, szkodliwy po połknięciu i powoduje poważne oparzenia skóry i uszkodzenie oczu.
- Test ten powinien wykonywać jedynie personel odpowiednio przeszkolony w zakresie stosowania tego testu oraz z zakresu postępowania z materiałem zakaźnym. Jeśli dojdzie do rozlania, natychmiast zdezynfekować, stosując odpowiednie procedury w miejscu pracy.

- F. Próbkki mogą być zakaźne. W czasie wykonywania tego testu przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności. Właściwe metody postępowania z próbkami oraz utylizacji próbek powinien określić kierownik laboratorium. Do wykonania opisywanej tutaj procedury diagnostycznej może być dopuszczony wyłącznie personel odpowiednio przeszkolony w zakresie postępowania z materiałami zakaźnymi.⁷
- G. Przestrzegać rutynowych środków ostrożności stosowanych w laboratorium. Nie pipetować ustami. Nie jeść, nie pić i nie palić w wyznaczonych obszarach pracy. Podczas pracy z próbkami i odczynnikami należy nosić jednorazowe, bezpudrowe rękawiczki, okulary ochronne i fartuchy laboratoryjne. Po zakończeniu pracy z próbkami i odczynnikami należy umyć ręce.
- H. Stosować wyłącznie dostarczone lub określone jednorazowe wyposażenie laboratoryjne.
- I. Powierzchnie robocze, pipety i inne wyposażenie należy regularnie odkażać, stosując roztwór podchlorynu sodu w stężeniu od 2,5% do 3,5% (od 0,35 M do 0,5 M).
- J. Wszystkie materiały, które miały kontakt z preparatami i odczynnikami należy usuwać zgodnie z obowiązującymi przepisami krajowymi, międzynarodowymi i regionalnymi.
- K. Podczas transportu próbek należy utrzymywać właściwe warunki przechowywania, aby zapewnić integralność próbek. Nie oceniono stabilności próbek w warunkach transportu innych niż zalecane.
- L. Nie dopuszczać do zanieczyszczenia krzyżowego podczas etapów pracy z próbkami. Zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć kontaminacji poprzez rozprzestrzenienie się aerozolu w czasie odkręcania lub zdejmowania zakrętek z próbek. W próbkach może występować niezwykle wysokie stężenie wirusów lub innych organizmów. Dopilnować, aby pojemniki na próbki nie wchodziły we wzajemny kontakt oraz utylizować zużyte materiały tak, aby nie przenosić ich nad otwartymi pojemnikami. Zmienić rękawiczki, jeżeli miały kontakt z próbkami.
- M. Nie używać odczynników, kalibratorów lub kontroli po upływie daty ważności.
- N. Składniki testu należy przechowywać w zalecanych warunkach przechowywania. Aby uzyskać więcej informacji, patrz *Wymagania dotyczące przechowywania odczynników i postępowania z nimi* i *Procedura testu w systemie Panther Fusion*.
- O. Nie należy łączyć żadnych odczynników analitycznych ani płynów. Nie wolno dopełniać butelek z odczynnikami lub płynami; system Panther Fusion weryfikuje poziomy odczynników.
- P. Unikać kontaminacji odczynników przez drobnoustroje i nukleazy.
- Q. Wymagania dotyczące kontroli jakości muszą być zgodnie z przepisami lokalnymi, stanowymi lub federalnymi lub wymaganiami dotyczącymi akredytacji i standardowych procedur kontroli jakości laboratorium.
- R. Nie wolno używać wkładu testowego, jeśli torebka do przechowywania utraciła szczelność lub jeśli folia wkładu testowego jest naruszona. W powyższych przypadkach należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Hologic.
- S. Nie wolno używać pakietów płynu, jeśli plomba foliowa jest naruszona. W takich przypadkach należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Hologic.
- T. Należy postępować z wkładami testowymi w sposób ostrożny. Nie upuszczać ani nie odwracać wkładów testowych. Unikać dłuższego wystawiania na światło otoczenia.

U. Niektóre odczynniki w tym zestawie są oznakowane symbolami zagrożenia i bezpieczeństwa.

Uwaga: Stosowane informacje dotyczące zagrożeń są określone przez klasyfikacje kart charakterystyki substancji (Safety Data Sheets, SDS) obowiązujące w UE. Informacje dotyczące zagrożeń występujących w konkretnym regionie opisano w kartach SDS właściwych dla regionów. Dokumenty te znajdują się w bibliotece kart charakterystyki pod adresem www.hologicsds.com. Więcej informacji na temat symboli zawiera legenda symboli dostępna pod adresem www.hologic.com/package-inserts.

Informacje o zagrożeniach zgodne z wymogami UE	
Wkład testowy Panther Fusion EBV Quant ALFA-CYKLODEKSTRYNA 20–25%	
—	H412 – Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P273 – Unikać uwolnienia do środowiska. P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierdzonego zakładu utylizacji odpadów.
Odczynnik przechwytyjący Panther Fusion Capture Reagent-B (FCR-B) HEPES 15–20% LAURYLOSIARCZAN LITU 10–15% KWAS BURSZTYNOWY 1–5% WODOROTLENEK LITU, MONOHYDRAT 1-5%	
—	H412 – Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki. P273 – Unikać uwolnienia do środowiska. P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierdzonego zakładu utylizacji odpadów.
 Odczynnik wzmacniający Panther Fusion B (FER-B) WODOROTLENEK LITU, MONOHYDRAT 5–10%	
NIEBEZPIECZEŃSTWO H302 – Działa szkodliwie po połknięciu. H314 – Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu.  P264 – Dokładnie umyć twarz, ręce i wszelkie narażone powierzchnie skóry po użyciu. P270 – Nie jeść, nie pić i nie palić podczas używania produktu. P330 – Wypłukać usta. P501 – Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierdzonego zakładu utylizacji odpadów. P260 – Nie wdychać pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. P280 – Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. P301 + P330 + P331 - W PRZYPADKU POŁKNIECIA: wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów. P303 + P361 + P353 - W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ (lub z włosami): Natychmiast zdjąć całą zanieczyszczoną odzież. Spłukać skórę pod strumieniem wody [lub prysznicem]. P304 + P340 - W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić mu warunki do swobodnego oddychania. P305 + P351 + P338 - W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. P310 – Natychmiast skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUĆ lub lekarzem. P321 – Zastosować określone leczenie (patrz dodatkowa instrukcja w zakresie pierwszej pomocy na etykiecie). P363 – Wyprać zanieczyszczoną odzież przed ponownym użyciem. P405 – Przechowywać pod zamknięciem.	

Wymagania dotyczące przechowywania odczynników i postępowania z nimi

A. Poniższa tabela zawiera wymagania dotyczące przechowywania i użytkowania tego testu.

Odczynnik	Przechowywanie nieotwartych odczynników	Stabilność w aparacie/ po otwarciu ¹	Przechowywanie otwartych odczynników
Wkład testowy Panther Fusion EBV Quant	2°C do 8°C	60 dni	2°C do 8°C ²
Odczynnik przechwytyjący Panther Fusion Capture Reagent-B (FCR-B)	15°C do 30°C	30 dni	15°C do 30°C
Odczynnik wzmacniający Panther Fusion B (FER-B)	15°C do 30°C	30 dni	15°C do 30°C
Kontrola wewnętrzna Panther Fusion B (IC-B)	2°C do 8°C	(W wFCR-B)	Nie dotyczy
Bufor elucyjny Panther Fusion	15°C do 30°C	60 dni	15°C do 30°C
Olej Panther Fusion	15°C do 30°C	60 dni	15°C do 30°C
Bufor do rekonstrukcji Panther Fusion I	15°C do 30°C	60 dni	15°C do 30°C
Kalibratory Panther Fusion EBV Quant (1–5)	-15°C do -35°C	Fiolka jednorazowego użytku	Nie dotyczy – do jednorazowego użytku
Kontrola wysoko dodatnia Panther Fusion EBV–BKV Quant	-15°C do -35°C	Fiolka jednorazowego użytku	Nie dotyczy – do jednorazowego użytku
Kontrola nisko dodatnia Panther Fusion EBV–BKV Quant	-15°C do -35°C	Fiolka jednorazowego użytku	Nie dotyczy – do jednorazowego użytku
Kontrola ujemna Panther Fusion Transplant (III)	-15°C do -35°C	Fiolka jednorazowego użytku	Nie dotyczy – do jednorazowego użytku

Po wyjęciu odczynników z systemu Panther Fusion należy natychmiast ponownie umieścić je w miejscu o temperaturze odpowiedniej do ich przechowywania.

¹ Stabilność odczynnika w aparacie rozpoczyna się od momentu umieszczenia odczynnika w systemie Panther Fusion dla wkładu testowego Panther Fusion EBV Quant oraz odczynników FCR-B, FER-B i IC-B. Stabilność odczynnika w aparacie dla bufora do rekonstrukcji Panther Fusion I, bufora elucyjnego Panther Fusion i odczynnika olejowego Panther Fusion rozpoczyna się od momentu pierwszego użycia pakietu odczynników.

² Po usunięciu z systemu Panther Fusion wkład testowy należy umieścić w szczelnym opakowaniu ze środkiem osuszającym, w miejscu o zalecanej temperaturze dla przechowywania.

B. Robocze odczynniki przechwytyjące Panther Fusion B (wFCR-B) i odczynniki wzmacniające Panther Fusion B (FER-B) są stabilne przez 60 dni, gdy są zamknięte korkiem i przechowywane w temperaturze od 15°C do 30°C. Nie należy przechowywać go w lodówce.

C. Należy utylizować wszelkie nieużyte odczynniki, których termin stabilności minął.

D. W trakcie obchodzenia się z odczynnikami i ich przechowywania unikać zanieczyszczenia krzyżowego.

E. **Nie zamrażać odczynników.**

F. **Nie zamrażać ponownie kontroli ani kalibratorów.**

G. Nieotwarte wkłady, kalibratory (1–5) oraz kontrole są stabilne przez okres do 18 miesięcy po wyprodukowaniu, gdy przechowywane są w zalecanych warunkach. Należy przestrzegać terminu przydatności wskazanego na opakowaniu.

Pobieranie, przetwarzanie i przechowywanie próbek

Próbki pobrane – materiał kliniczny pobrany od pacjenta i umieszczony w odpowiednim systemie transportowym. W przypadku testu Panther Fusion EBV Quant termin ten odnosi się do próbek krwi pełnej pobranych do probówek z antykoagulantami EDTA do przygotowywania próbek osocza lub probówek do przygotowania osocza (PPT).

Próbki – jest to bardziej ogólny termin opisujący każdy materiał przeznaczony do badań w systemie Panther Fusion, w tym materiał do badań, kalibratory i kontrole.

Uwaga: Z wszystkimi próbkami należy obchodzić się tak, jak gdyby zawierały czynniki potencjalnie zakaźne. Przestrzegać uniwersalnych środków ostrożności.

Uwaga: Starać się unikać zanieczyszczenia krzyżowego w czasie etapów pracy z materiałem. Należy na przykład wyrzucać zużyty materiał bez przemieszczania go nad otwartymi probówkami.

Uwaga: Do przechowywania próbek zalecane są wyłącznie plastikowe probówki wtórne.

A. Pobieranie próbek

Do przygotowania osocza można użyć preparatów krwi pełnej zebranych w poniższych szklanych lub plastikowych probówkach:

- Probówki zawierające antykoagulanty EDTA
- Probówki do przygotowania osocza (PPT)

B. Przetwarzanie próbek

1. Osocze: Krew pełna może być przechowywana w temperaturze od 2°C do 30°C i musi być odwirowana w ciągu 24 godzin od pobrania próbki. Osocze można przygotować z probówek pierwotnych z EDTA lub PPT. Oddzielić osocze od skoagulowanych krwinek czerwonych, postępując zgodnie z instrukcjami producenta używanej probówki. Osocze może być badane w systemie Panther Fusion w probówce pierwotnej lub przeniesione do probówki dodatkowej, takiej jak probówka Aptima® do porcjowania preparatów (SAT).

Aby zapewnić odpowiednią objętość próbki, należy zapoznać się z poniższą tabelą:

Tabela 1: Minimalna objętość próbki

Probówka (rozmiar i typ)	Minimalna objętość dla 1 replikatu
Probówka do porcjowania próbek Aptima (SAT)	0,6 ml
12x75 mm	0,9 ml
13x100 mm	0,9 ml
13x100 mm z żelem	0,7 ml
16x100 mm z żelem	1,1 ml

Jeśli próbki nie będą testowane natychmiast, osocze można przechować pod warunkiem zapewnienia mu warunków opisanych w sekcji *Warunki przechowywania próbek*.

W przypadku przeniesienia do probówki dodatkowej osocze można zamrozić w temperaturze -20°C. Osocza nie należy zamrażać w pierwotnych probówkach do pobierania próbek z EDTA.

C. Warunki przechowywania próbek

Próbki można przechowywać w następujących warunkach:

1. Stabilność osocza

- Nieprzetworzone próbki zachowują stabilność przez 24 godziny w temperaturze od 2°C do 30°C po odwirowaniu.
- Nieprzetworzone próbki zachowują stabilność przez 5 dni w temperaturze od 2°C do 8°C po odwirowaniu.
- Zarówno nieprzetworzone, jak i przetworzone próbki przechowywane w temperaturze -20°C pozostają stabilne przez 60 dni.
- Zamrożone próbki zachowują stabilność do trzech cykli zamrażania/rozmrężania.

Próbki w aparacie systemu Panther Fusion

Próbki osocza można pozostawić w systemie Panther Fusion bez nakrętki na maksymalnie 8 godzin. Probki można wyjąć z systemu Panther Fusion i poddać badaniu, o ile całkowity czas przebywania w systemie nie przekracza 8 godzin przed pipetowaniem próbki przez system Panther Fusion.

Transport próbek

Warunki przechowywania podczas transportu próbek muszą być zgodnie z opisem w *Pobieranie, przetwarzanie i przechowywanie próbek*.

Uwaga: *Próbki należy przysyłać zgodnie z odpowiednimi krajowymi, międzynarodowymi i regionalnymi przepisami transportowymi.*

Panther Fusion System

System Panther Fusion jest zintegrowanym systemem do wykonywania testów kwasów nukleinowych, w którym wszystkie etapy niezbędne do wykonania różnych testów Panther Fusion są całkowicie zautomatyzowane, począwszy od przetwarzania próbki przez amplifikację do wykrywania i redukcji danych.

Odczynniki i materiały dostarczane dla testu EBV Quant Panther Fusion

Opakowanie testu

Podzespoły	Nr kat.	Przechowywanie
Kalibratory testów Panther Fusion EBV Quant PCAL 1 qEBV, pudełka po 3 szt. PCAL 2 qEBV, pudełka po 3 szt. PCAL 3 qEBV, pudełka po 3 szt. PCAL 4 qEBV, pudełka po 3 szt. PCAL 5 qEBV, pudełka po 3 szt.	PRD-07159	-15°C do -35°C
Kontrola testów Panther Fusion EBV–BKV Quant Próbówka z kontrolą wysoko dodatnią Panther Fusion HPC, 5 szt. w opakowaniu Próbówka z kontrolą nisko dodatnią Panther Fusion LPC, 5 szt. w opakowaniu Próbówka z kontrolą ujemną NC III Transplant, 5 szt. w opakowaniu	PRD-07158	-15°C do -35°C
Wkłady testowe Panther Fusion EBV Quant, 96 testów Wkład testowy Panther Fusion qEBV, 12 testów, pudełka po 8 szt.	PRD-07157	2°C do 8°C
Kontrole wewnętrzne Panther Fusion-B 960 testów Próbówka kontroli wewnętrznej Panther Fusion-B, pudełka po 4 szt.	PRD-06234	2°C do 8°C
Testy z odczynnikiem ekstrakcyjnym Panther Fusion B 960 Butelka odczynnika przechwytyjącego Panther Fusion B, 240 testów, pudełka po 4 szt. Butelka odczynnika wzmacniającego Panther Fusion B, 240 testów, pudełka po 4 szt.	PRD-06232	15°C do 30°C
Testy z buforem elucyjnym Panther Fusion, 2400 Opakowanie buforów elucyjnych Panther Fusion, 1200 testów, pudełka po 2 szt.	PRD-04334	15°C do 30°C
Testy z buforem do rekonstytucji Panther Fusion I, 1920 Opakowanie buforów do rekonstytucji Panther Fusion I, 960 testów, pudełka po 2 szt.	PRD-04333	15°C do 30°C
Testy z olejem Panther Fusion, 1920 Olej Panther Fusion, 960 testów, pudełka po 2 szt.	PRD-04335	15°C do 30°C

Materiały wymagane i dostępne osobno

Uwaga: Dostarczane materiały Hologic mają następujące numery katalogowe, chyba że podano inne dane.

Materiał	Nr kat.
Panther® System	303095
Panther Fusion Module	PRD-04173
Panther Fusion System	PRD-04172
Panther System, Continuous Fluid and Waste (Panther Plus)	PRD-06067
Zestaw płynów do testu Aptima® (Roztwór do płukania Aptima, bufor do płynu dezaktywującego Aptima, odczynnik olejowy Aptima)	303014 (1000 testów)
Zestawy wieloprobówkowe (MTU)	104772-02
Zestaw torby na odpady Panther	902731
Ośłona pojemnika na odpady Panther	504405
Albo zestaw wstępny do aparatu Panther System zawiera zestawy MTU, torby na odpady, pokrywy pojemników na odpady, płyny testowe i odczynniki Auto Detect*	303096 (5000 testów)
Końcówki, 1000 µl, z filtrami, z detekcją cieczy, przewodzące, jednorazowego użytku: <i>Nie wszystkie produkty są dostępne we wszystkich regionach. W celu uzyskania informacji na temat dostępności produktu w wybranym regionie należy skontaktować się z odpowiednim przedstawicielem.</i>	901121 (10612513 Tecan) 903031 (10612513 Tecan) MME-04134 (30180117 Tecan) MME-04128
Tace na próbki Panther Fusion, 1008 testów, 18 tac w pudełku	PRD-04000
Zamienne stałe korki Hologic (jednorazowe korki do próbek)	PRD-06720 (100 korków na opakowanie)
Wybielacz, roztwór podchlorynu sodu w stężeniu od 5% do 8,25% (od 0,7 M do 1,16 M) Instrukcje dotyczące przygotowywania rozcieńczonego roztworu podchlorynu znajdują się w <i>Podręczniku operatora systemu Panther/Panther Fusion</i> .	—
Rękawiczki jednorazowe, bezpudrowe	—
Wzmocnione plastikiem osłony stołu laboratoryjnego	—
Niestrzępiące się ściereczki	—
Pipetor	—
Końcówki	—
Opcje próbek do pobierania krwi (EDTA i PPT): 13 mm x 100 mm 12 mm x 75 mm 16 mm x 100 mm	—
Wirówka	—
Wstrząsarka	—

*Potrzebne jedynie dla testów Panther Aptima TMA.

Materiały opcjonalne

Material	Nr kat.
Probówki dodatkowe w opcjach:	
12 mm x 75 mm	—
13 mm x 100 mm	—
16 mm x 100 mm	—
Opakowanie probówek do porcjowania próbek Aptima (SAT) (100 probówek w woreczku)	FAB-18184
Zakrętki probówek transportowych (opakowanie 100 szt.) <i>zakrętka do SAT</i>	504415
Rozcieńczalnik do próbek Aptima	PRD-03003
Zestaw rozcieńczalnika do próbek Aptima <i>zawiera rozcieńczalnik Aptima do próbek, 100 SAT i 100 zakrętek</i>	PRD-03478
Pipety transportowe	—
Kołyska do probówek	—

Procedura testu w systemie Panther Fusion

Uwaga: Dodatkowe informacje dotyczące procedury – patrz Instrukcja obsługi systemu Panther/Panther Fusion.

A. Przygotowanie obszaru roboczego

1. Przetrzeć powierzchnie robocze roztworem podchlorynu sodu w stężeniu od 2,5% do 3,5% (od 0,35 M do 0,5 M). Roztwór podchlorynu sodu powinien mieć kontakt z powierzchniami przez co najmniej minutę, a następnie powinien zostać spłukany wodą dejonizowaną. Nie wolno dopuszczać do wyschnięcia roztworu podchlorynu sodu. Zakryć powierzchnię stołu czystymi, wzmocnionymi plastikami, chłonnymi osłonami stołu laboratoryjnego.
2. Oczyszczyć odrębną powierzchnię roboczą jako miejsce do przygotowania próbek. Postępować zgodnie z procedurą opisaną powyżej (etap A.1).
3. Wyczyścić wszystkie pipety. Postępować zgodnie z procedurą czyszczenia opisaną powyżej (etap A.1).

B. Przygotowanie kalibratorów i kontroli

Przed przystąpieniem do przetwarzania kalibratory i kontrole powinny osiągnąć temperaturę od 15°C do 30°C w sposób opisany poniżej:

1. Wyjąć kalibratory i kontrole z miejsca przechowywania (-15°C do -35°C) i umieścić w temperaturze 15°C do 30°C. Podczas całego procesu rozmrażania delikatnie odwracać każdą probówkę, aby dokładnie wymieszać próbki. Przed użyciem należy upewnić się, że zawartość próbki jest całkowicie rozmrożona.

Opcja. Probówki z kalibratorem i kontrolą można umieścić na wytrząsarce do probówek w celu dokładnego wymieszania. Przed użyciem należy upewnić się, że zawartość próbki jest całkowicie rozmrożona.

Uwaga: Unikać tworzenia nadmiernej piany podczas odwracania kalibratora i kontroli. Piana negatywnie wpływa na wykrywanie poziomu przez system Panther Fusion.

2. Po rozmrożeniu zawartości próbki osuszyć jej zewnętrzną część czystą, suchą ściereczką jednorazowego użytku.

3. Aby zapobiec kontaminacji, nie należy w tym momencie otwierać próbek.

C. Przygotowanie odczynnika

1. Wyjąć butelki zawierające odczynniki IC-B, FCR-B i FER-B z miejsca przechowywania.
2. Wymieszać FCR-B do pełnego zawieszenia koralików. Na tym etapie unikać tworzenia piany.
3. Otworzyć butelki zawierające odczynniki IC-B, FCR-B i FER-B i wyrzucić zakrętki. Otworzyć drzwi odczynników TCR na górnej wnęce systemu Panther Fusion.
4. Umieścić butelki z odczynnikami IC-B, FCR-B i FER-B na odpowiednich pozycjach karuzeli TCR.
5. Zamknąć drzwi odczynników TCR.

Uwaga: System Panther Fusion doda odczynnik IC-B do odczynnika FCR-B. Odczynnik powstały po dodaniu odczynnika IC-B do odczynnika FCR-B nazywany jest wFCR-B (roboczy FCR-B). Jeżeli odczynniki wFCR-B i FER-B zostaną usunięte z systemu, należy zamknąć je za pomocą nowych zatyczek i natychmiast umieścić je w miejscu o odpowiednich warunkach do przechowywania.

D. Obchodzenie się z próbkami

Uwaga: Przed załadowaniem próbek do systemu Panther Fusion należy przygotować je zgodnie z instrukcjami zawartymi w sekcji *Pobieranie, przetwarzanie i przechowywanie próbek*.

Przed włożeniem do statywu sprawdzić próbki. Jeśli próbka na próbki zawiera pęcherzyki powietrza lub ma mniejszą objętość niż zazwyczaj, należy delikatnie postukać w dno próbki, aby zawartość znalazła się na dnie.

E. Postępowanie z próbkami osocza

1. Należy upewnić się, że przetworzone próbki w próbkach pierwotnych lub nierozcieńczone próbki w próbkach dodatkowych były odpowiednio przechowywane, zgodnie z instrukcjami zawartymi w sekcji *Pobieranie, przetwarzanie i przechowywanie próbek*.
2. Upewnić się, że zamrożone próbki są dokładnie rozmrożone. Rozmrożone próbki należy wirować przez 3 do 5 sekund w celu dokładnego wymieszania.
3. Przed rozpoczęciem obróbki próbki powinny osiągnąć temperaturę od 15°C do 30°C. Dodatkowe informacje dotyczące systemu znajdują się w *Próbki w aparacie systemu Panther Fusion*.
4. Upewnić się, że każda próbka pierwotna lub wtórna zawiera odpowiednią próbkę. Minimalna objętość próbki dla 1 replikatu – patrz Tabela 1.
5. Tuż przed umieszczeniem próbek w statywie na próbki odwirować każdą próbkę przy 1000-3000 g przez 10 minut. Na tym etapie nie należy zdejmować zakrętek.

Zobacz etap F.2 poniżej, aby uzyskać informacje dotyczące ładowania statywu i zdjęcia zakrętek.

F. Przygotowanie systemu

1. Instrukcje dotyczące ustawiania systemu Panther Fusion, w tym ładowania próbek, odczynników, wkładów testowych i płynów uniwersalnych, zawierają *Instrukcja obsługi systemu Panther/Panther Fusion* i *Uwagi dotyczące procedur*.
2. Załadowanie próbek do statywów na próbki. Wykonać następujące czynności dla każdej próbki na próbki (próbka oraz, jeśli to konieczne, kalibratory i kontrole):

- a. Poluzować jedną zakrętkę próbówki na próbki, ale jeszcze jej nie zdejmować.
***Uwaga:** Zachować szczególną ostrożność, aby uniknąć kontaminacji poprzez rozprzestrzenienie się aerozolu. Delikatnie poluzować zakrętki na próbkach.*
- b. Załadować próbówki na próbki do statywów na próbki.
- c. Powtórzyć etapy 2.a i 2.b dla każdej pozostałej próbki.
- d. Po załadowaniu próbek do statywu na próbki, zdjąć i wyrzucić każdą zakrętkę próbówki na próbki z jednego statywu na próbki. Aby uniknąć kontaminacji, nie przenosić zakrętki nad innymi statywami na próbki lub próbówkami na próbki.
- e. W razie potrzeby użyć nowej, jednorazowej pipety do usuwania pęcherzyków powietrza lub piany. Pęcherzyki powietrza w próbówce wpływają negatywnie na wykrywanie poziomu przez system Panther Fusion.
- f. Po zdjęciu ostatniej zakrętki, załadować statyw z próbkami do wnęki na próbki.
***Uwaga:** Jeśli jednocześnie przeprowadzane są inne testy i typy próbek, należy zabezpieczyć mocowniki próbek przed załadowaniem statywu na próbki do wnęki na próbki.*
- g. Potworzyć etapy 2.a do 2.f dla kolejnego statywu na próbki.

Uwagi dotyczące procedur

A. Kalibratory i kontrole

1. Probówki z kalibratorami qEBV (5 próbek), kontrolą nisko dodatnią EBV–BKV (LPC), kontrolą wysoko dodatnią EBV–BKV (HPC) i transplantacyjną kontrolą ujemną (NC III) można umieścić na dowolnej pozycji w statywie na próbki i w dowolnym torze wnęki na próbki w systemie Panther Fusion. Pipetowanie kalibratora i kontroli rozpocznie się po załadowaniu próbek EBV do systemu. Pipetowanie próbek pobranych od pacjentów rozpocznie się po spełnieniu jednego z dwóch następujących warunków:
 - a. Kalibratory i kontrole są w trakcie przetwarzania przez system.
 - b. Zarejestrowano w systemie ważne wyniki dla kalibratorów i kontroli.
2. Po odpipetowaniu kalibratorów i kontroli i przetworzeniu ich na potrzeby testu Panther Fusion EBV Quant można testować próbki. Wyniki kalibracji ważne są przez 60 dni, a wyniki kontroli do 30 dni (częstotliwość konfigurowana przez administratora), **chyba że**:
 - a. Wyniki kalibratora są nieważne.
 - b. Wyniki kontroli są nieważne.
 - c. Operator żąda uruchomienia nowych kontroli/kalibratorów w oprogramowaniu systemu Panther Fusion.
3. Kalibracja jest wymagana dla każdej nowej partii wkładu testowego ładowanej do systemu Panther Fusion przed użyciem go do przetwarzania próbek.
4. Każdą próbkę z kalibratorem i każdą próbkę z kontrolą można przetestować tylko raz.

Kontrola jakości

Kalibracja testu

Aby wygenerować ważne wyniki, należy wykonać kalibrację testu. Pięć kalibratorów dodatknych jest testowanych trzykrotnie za każdym razem, gdy do systemu Panther Fusion ładowana jest nowa seria wkładów testowych. Raz ustalona kalibracja testu jest ważna przez maksymalnie 60 dni. Oprogramowanie systemu Panther Fusion alarmuje operatora, gdy wymagana jest kalibracja.

Podczas przetwarzania oprogramowanie Panther Fusion automatycznie sprawdza ważność krzywej kalibracyjnej. Jeśli kalibracja nie przejdzie pomyślnie kontroli ważności, system Panther Fusion automatycznie unieważnia próbki, których to dotyczy – w takiej sytuacji konieczne będzie przetestowanie nowego zestawu kalibratorów testów przed zapipetowaniem jakichkolwiek dodatkowych próbek.

Domyślnie test będzie przetwarzał próbki jako nierozcieńczone osocze.

Kontrole ujemne i dodatnie

Aby wygenerować ważne wyniki, należy przetestować zestaw kontroli testu. Jeden replikat NC III (kontrola ujemna przeszczepu), LPC (niska kontrola dodatnia) i HPC (wysoka kontrola dodatnia) musi zostać zbadana za każdym razem, gdy do systemu Panther Fusion ładowana jest nowa seria wkładów z testem lub gdy upłynął termin ważności bieżącego zestawu ważnych kontroli dla aktywnej serii wkładów.

System Panther Fusion jest skonfigurowany w taki sposób, aby kontrole testów były przeprowadzane w odstępach czasu określonych przez administratora, wynoszących maksymalnie 30 dni. Oprogramowanie systemu Panther Fusion ostrzega operatora, gdy wymagane są kontrole testów, i nie rozpoczyna nowych testów, dopóki kontrole testów nie zostaną załadowane i nie rozpoczną przetwarzania.

Podczas przetwarzania kryteria akceptacji kontroli testów są automatycznie weryfikowane przez system Panther Fusion. Aby wygenerować prawidłowe wyniki, kontrole testów muszą przejść serię kontroli ważności wykonywanych przez system Panther Fusion.

Jeśli kontrole testów przejdą wszystkie kontrole ważności, są uznawane za ważne przez określony przez administratora przedział czasu. Kiedy upłynie określony czas, system Panther Fusion wyłączy kontrole testów — wówczas konieczne będzie przetestowanie nowego zestawu kontroli testów przed rozpoczęciem pipetowania jakichkolwiek nowych próbek.

Jeśli którakolwiek z kontroli testów nie przejdzie pomyślnie kontroli ważności, system Panther Fusion automatycznie unieważnia próbki, których to dotyczy – w takiej sytuacji konieczne będzie przetestowanie nowego zestawu kontroli testów przed rozpoczęciem pipetowania jakichkolwiek dodatkowych próbek.

Kontrola wewnętrzna

W trakcie procesu ekstrakcji do każdej próbki dodawana jest kontrola wewnętrzna. Podczas przetwarzania kryteria akceptacji kontroli wewnętrznej są automatycznie weryfikowane przez oprogramowanie systemu Panther Fusion. Wykrywanie kontroli wewnętrznej nie jest wymagane dla próbek, które są dodatnie względem wirusa EBV. Kontrola wewnętrzna musi być wykryta we wszystkich próbkach, które są ujemne względem wirusa EBV; próbki, które nie spełniają tych kryteriów, zostaną zgłoszone jako nieważne. Każda próbka z wynikiem Nieważnym musi zostać ponownie przebadana.

Oprogramowanie aparatu systemu Panther Fusion umożliwia przeprowadzenie dokładnej weryfikacji procesów, gdy procedury są wykonywane zgodnie z instrukcjami zawartymi w tej ulotce załączonej do opakowania oraz w *Panther/Panther Fusion System Operator's Manual (Instrukcji obsługi systemu Panther/Panther Fusion)*.

Interpretacja wyników

System Panther Fusion automatycznie określa stężenie DNA wirusa EBV dla próbek i kontroli poprzez porównanie wyników z krzywą kalibracyjną. Stężenia DNA wirusa EBV podawane są w j.m./mL i $\log_{10}$ j.m./mL. Interpretacja wyników przedstawiona jest w Tabeli 2.

Tabela 2: Interpretacja wyniku osocza

Zgłoszone wyniki testu EBV Quant		
j.m./ml	Wartość $\log_{10}$	Interpretacja
Nie wykryto	Nie wykryto	Nie wykryto DNA wirusa EBV.
wykryto <120	<2,08	Wykryto DNA wirusa EBV, ale poziom jest poniżej dolnej granicy oznaczania ilościowego (LLoQ).
120 do 1,50E09	2,08 do 9,18	Stężenie DNA wirusa EBV mieści się w zakresie liniowym od LLoQ do ULoQ j.m./ml.
>1,50E09	>9,18	Stężenie DNA wirusa EBV jest powyżej górnej granicy oznaczania ilościowego (ULoQ).
Nieważny ^a	Nieważny ^a	Wystąpił błąd w czasie tworzenia wyniku. Trzeba ponownie przetestować próbki.

^a Nieważne wyniki są wyświetlane niebieską czcionką.

Ograniczenia

- A. Niniejszy test powinien być wykonywany wyłącznie przez osoby przeszkolone w zakresie tej procedury testowej. Nieprzestrzeganie tych instrukcji może spowodować uzyskanie błędnych wyników.
- B. Wiarygodne wyniki zależą od właściwego pobrania próbek, ich transportu, przechowywania i obróbki.
- C. Należy unikać skażenia, zachowując dobre praktyki laboratoryjne i przestrzegając procedur określonych w niniejszej ulotce załączonej do opakowania.
- D. Choć rzadko, mutacje w wysoce konserwatywnych regionach genomu wirusowego objętych starterami i/lub sondami w teście Panther Fusion EBV Quant mogą powodować zaniżenie ilości lub niewykrycie wirusa.
- E. Wyniki ujemne nie wykluczają zakażenia wirusem EBV i nie należy ich stosować jako wyłącznej podstawy do podejmowania decyzji o ustalaniu leczenia lub postępowania.
- F. Wynik dodatni wskazuje na wykrycie kwasu nukleinowego odpowiedniego wirusa. Kwas nukleinowy może pozostać nawet po wyeliminowaniu wirusa.

Skuteczność

Granica wykrywalności przy zastosowaniu 1. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO

Granica wykrywalności (LoD) testu jest definiowana jako stężenie DNA wirusa EBV, które jest wykrywane z 95-procentowym lub większym prawdopodobieństwem zgodnie z dokumentem CLSI EP17-A2.⁸

Granica wykrywalności według próbek wzorcowych WHO w osoczu

LoD określono poprzez badanie paneli 1. międzynarodowego wzorca WHO (kod NIBSC: 09/260) dla wirusa EBV rozcieńczonego w ludzkim osoczu ujemnym względem wirusa EBV. Zbadano dwadzieścia (20) replikatów każdego rozcieńczenia z każdą z trzech partii odczynników, co daje w sumie 60 replikatów na rozcieńczenie. Przeprowadzono analizę probitową w celu wygenerowania przewidywanych granic wykrywalności. Wartości LoD przedstawione w Tabeli 3 to wyniki z partii odczynnika o najwyższej przewidywanej granicy wykrywalności. LoD dla testu Panther Fusion EBV Quant wykorzystującego 1. międzynarodową próbkę wzorcową WHO wynosi 54,1 j.m./ml dla osocza.

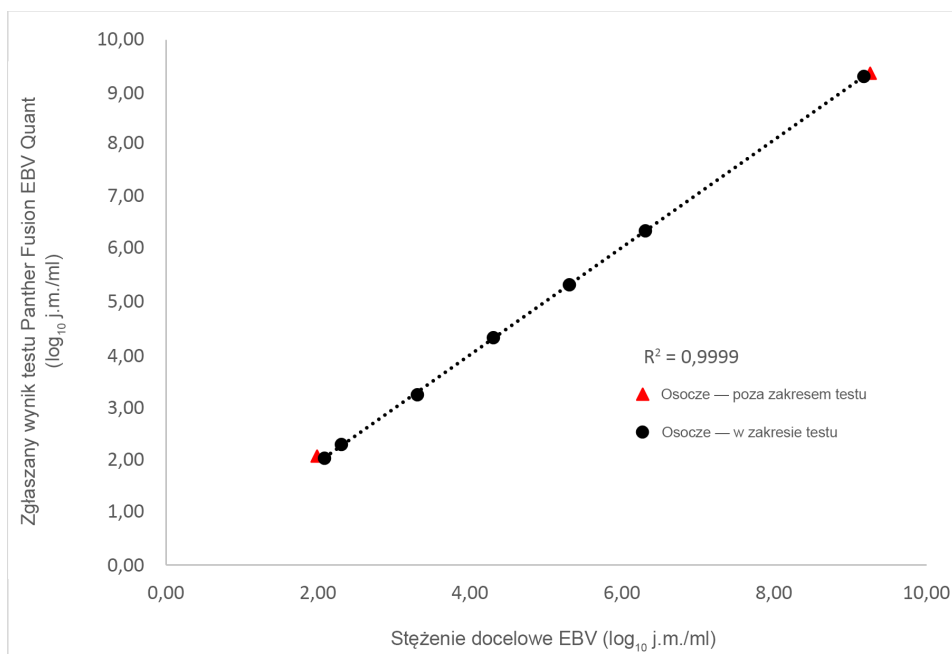
Tabela 3: Granica wykrywalności dla osocza przy zastosowaniu 1. międzynarodowego wzorca WHO dla wirusa EBV

Przewidywana granica wykrywalności	Stężenie (j.m./ml)
10%	1,5
20%	2,4
30%	3,6
40%	5,1
50%	7,2
60%	10,2
70%	14,8
80%	22,4
90%	38,0
95%	54,1

Zakres liniowy

Zakres liniowy w osoczu

Zakres liniowy został ustalony poprzez badanie paneli DNA wirusa EBV rozcieńczonego w EBV-ujemnym ludzkim osoczu zgodnie z CLSI EP06-A.⁹ Panele miały stężenie od 1,98 log j.m./ml do 9,26 log j.m./ml. Test Panther Fusion EBV Quant wykazał liniowość w całym badanym zakresie. Górna granica oznaczenia ilościowego (ULoQ) testu wynosi 9,18 log j.m./ml, jak pokazano na Rysunek 1.



Rysunek 1. Liniowość w osoczu

Dolna granica oznaczenia ilościowego przy zastosowaniu 1. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO

Dolna granica oznaczenia ilościowego (LLoQ) jest definiowana jako najniższe stężenie, przy którym RNA wirusa EBV jest wiarygodnie oznaczane ilościowo, zgodnie z CLSI EP17-A2.⁸ Całkowity błąd oszacowano za pomocą modelu Westgarda: Całkowity błąd (TE) = |obciążenie| + 2 SD. W celu zapewnienia precyzji i dokładności pomiarów ustalono, że błąd całkowity testu Panther Fusion EBV Quant może wynosić 1,2 log j.m./ml, przy obciążeniu względem prawdziwości i SD wynoszącym odpowiednio ≤ 0,5 log j.m./ml i ≤ 0,35 log j.m./ml.

Dolna granica oznaczenia ilościowego przy zastosowaniu międzynarodowej próbki wzorcowej WHO

LLoQ określono poprzez badanie paneli 1. międzynarodowego wzorca WHO (kod NIBSC: 09/260) dla wirusa EBV rozcieńczonego w ludzkim osoczu ujemnym względem wirusa EBV. Zbadano dwadzieścia (20) replikatów każdego rozcieńczenia z każdą z trzech partii odczynników, co daje w sumie 60 replikatów na rozcieńczenie. Wyniki LLoQ dla trzech serii odczynników przedstawia Tabela 4. Wartość LLoQ wygenerowana zgodnie z 1. międzynarodową próbką wzorcową WHO dla EBV w osoczu wynosi 120 j.m./ml (2,08 log j.m./ml).

Tabela 4: Oznaczenie LLoQ przy zastosowaniu 1. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO dla EBV rozcieńczonego w osoczu

Partia odczynników	N	N wykrytych	Stężenie docelowe (log j.m./ml)	Test EBV Quant (log j.m./ml)	SD (log j.m./ml)	Obciążenie (log j.m./ml)	Obliczony TE (log j.m./ml)
1	20	20	1,93	2,06	0,21	0,2	0,6
	20	20	2,08	2,33	0,21	0,3	0,7
	20	20	2,18	2,45	0,13	0,3	0,5
	20	20	2,26	2,44	0,15	0,2	0,5
2	20	20	1,93	1,61	0,30	0,3	0,9
	20	20	2,08	1,79	0,23	0,3	0,8
	20	20	2,18	2,00	0,18	0,2	0,6
	20	20	2,26	2,09	0,17	0,2	0,5
3	20	20	1,93	1,75	0,20	0,2	0,6
	20	20	2,08	1,88	0,25	0,2	0,7
	20	20	2,18	2,09	0,12	0,1	0,4
	20	20	2,26	2,04	0,15	0,2	0,5

SD = odchylenie standardowe ≤ 0,35 (log j.m./ml).

|Obciążenie|=odchylenie od prawdy ≤ 0,5 (log j.m./ml).

Rozcieńczenie odpowiadające stężeniu LLoQ i testowane dla każdej partii odczynnika jest zaznaczone na szaro.

Potwierdzenie dolnej granicy oznaczenia ilościowego dla różnych genotypów EBV

Dolna granica oznaczenia ilościowego dla różnych genotypów w osoczu

Granice LLoQ ustaloną z zastosowaniem wzorca WHO oceniono przy użyciu genotypów wirusa EBV 1 (Raji, Akata i B95-8) i 2 (AG876, P3H1 i Jijoye). Genotypy te w stężeniu 3X LLoQ dodano do ludzkiego osocza ujemnego względem wirusa EBV. Trzy replikaty każdego z elementów panelu przebadano przy użyciu jednej partii odczynników. Wyniki przedstawione są w Tabeli 5.

Tabela 5: Potwierdzenie LLoQ w osoczu w zależności od genotypu w osoczu

Izolat (genotyp)	N	N wykrytych	Stężenie docelowe (log j.m./ml)	Test EBV Quant (log j.m./ml)	SD (log j.m./ml)	Obciążenie (log j.m./ml)
Raji (genotyp 1)	3	3	2,56	2,84	0,12	0,3
Akata (genotyp 1)	3	3	2,56	2,95	0,11	0,4
B95-8 (genotyp 1)	3	3	2,56	2,59	0,08	0,1
AG876 (genotyp 2)	3	3	2,56	2,72	0,23	0,2
P3H1 (genotyp 2)	3	3	2,56	2,91	0,07	0,4
Jijoye (genotyp 2)	3	3	2,56	2,75	0,16	0,2

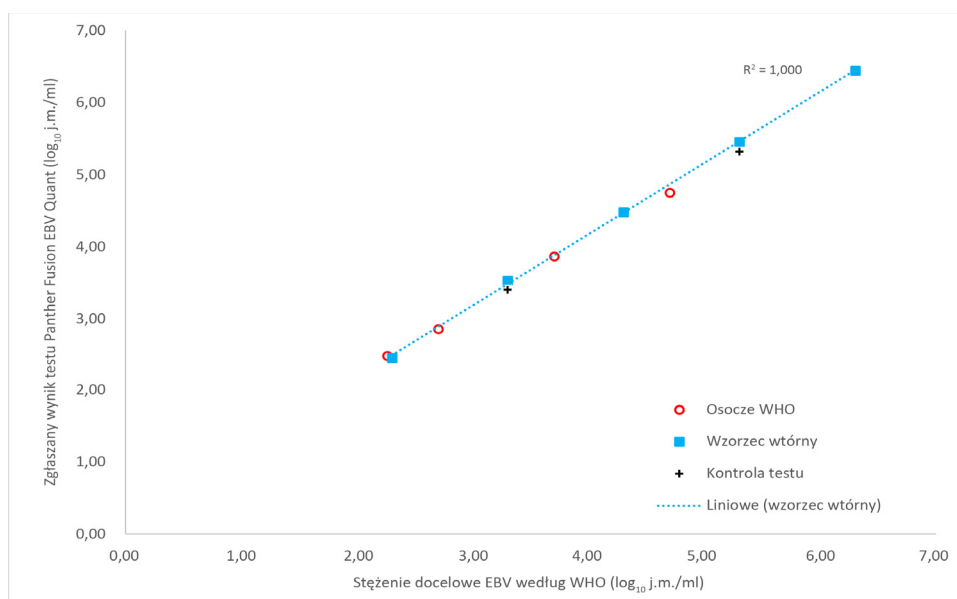
SD = odchylenie standardowe.

Identyfikowalność według 1. międzynarodowej próbki wzorcowej WHO

W trakcie opracowywania i wytwarzania produktu stosowano serię wzorców wtórnych o znanych stężeniach, aby zapewnić identyfikowalność z próbką wzorcową WHO. 1. wzorec WHO dla wirusa EBV rozcieńczono i przetestowano razem z wzorcami wtórnymi oraz kontrolami i kalibratorami używanymi do testu Panther Fusion EBV Quant w celu oceny identyfikowalności zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie CLSI EP32-R.¹⁰ Stężenia wzorców wtórnych wynosiły od 2,30 do 6,30 log₁₀ j.m./ml.

Identyfikowalność według próbki wzorcowej WHO w osoczu

Badane stężenia 1. wzorca WHO dla wirusa EBV wynosiły od 2,26 do 4,70 log₁₀ j.m./ ml. Wyniki dla paneli osocza WHO, wtórnych próbek wzorcowych, kontroli testu i kalibratorów testu odzyskano zgodnie z oczekiwaniami w całym zakresie liniowym testu, jak widać na Rysunek 2.



Rysunek 2. Identyfikowalność pomiędzy stężeniami docelowymi EBV pierwszej próbki wzorcowej WHO a stężeniami zgłaszanymi w teście Panther Fusion EBV Quant (próbka wzorcowa WHO rozcieńczona w osoczu)

Precyzja w obrębie laboratorium

Aby ocenić precyzję w obrębie laboratorium, wykonano panel 2-elementowy poprzez rozcieńczenie DNA EBV w osoczu EBV-ujemnym. Panele dodatnie z próbkami osocza zostały przebadane przez 2 operatorów z użyciem 3 partii odczynników w 3 systemach Panther Fusion w ciągu 6 nienastępujących po sobie dni testowych. Każdy element panelu został przetestowany trzykrotnie w każdej serii. Wyniki przeanalizowano zgodnie z zaleceniami CLSI EP-05-A3¹¹.

Tabela 6 przedstawia odtwarzalność wyników testów (w log j.m./ml) dla panelu dodatniego pomiędzy urządzeniami, pomiędzy operatorami, pomiędzy partiami wkładów, pomiędzy seriami, w obrębie serii i ogólnie.

Tabela 6: Odtwarzalność testu Panther Fusion EBV Quant w próbkach osocza

N	Średnie stężenie (log j.m./ml)	Pomiędzy partiami	Pomiędzy urządzeniami	Pomiędzy operatorami	Pomiędzy dniami	Pomiędzy seriami	W obrębie seriami	Ogółem
		SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD
30	2,32	0,02	0,12	0,13	0,17	0,05	0,17	0,29
30	4,58	0,19	0,18	0,11	0,17	0,02	0,17	0,16

SD = odchylenie standardowe.

Substancje powodujące potencjalne interferencje

Podatność testu Panther Fusion EBV Quant na zakłócenia spowodowane podwyższonymi poziomami substancji endogennych, antykoagulantów lub leków powszechnie przepisywanych pacjentom po przeszczepach została oceniona przy użyciu matryc ujemnych względem osocza testowanych w obecności wirusa EBV w osoczu o stężeniu 2,56 log j.m./ml lub przy jego braku. Stężenia testowe dla każdej substancji zakłócającej wybrano w oparciu o dostępne odniesienia literaturowe i wytyczne CLSI EP07¹² i EP37.¹³

Nie zaobserwowano, aby potencjalnie zakłócające substancje endogenne (Tabela 7) obecne w próbkach osocza miały jakikolwiek wpływ na dokładność oznaczania ilościowego wykonywanego przy użyciu testu.

Tabela 7: Substancje endogenne

Substancja powodująca potencjalne interferencje	Liczba replikatów	Badane stężenie
Albumina	3	375 mg/dl
Bilirubina sprzężona	3	40 mg/dl
Hemoglobina	3	1000 mg/dl
Heparyna	3	0,66 mg/dl
DNA genomu człowieka	3	0,2 mg/ml
Trójglicerydy	3	3,45 mg/dl
Bilirubina niesprężona	3	0,40 mg/dl

Nie zaobserwowano, aby substancje egzogenne, które przedstawia Tabela 8, miały jakikolwiek wpływ na dokładność oznaczania ilościowego wykonywanego przy użyciu testu.

Tabela 8: Substancje egzogenne

Substancja powodująca potencjalne interferencje	Liczba replikatów	Badane stężenie
Acyklowir	3	6,6 mg/dl
Azatiopryna	3	0,258 mg/dl
Cefotetan	3	71,1 mg/dl
Cydofowir	3	12,4 mg/dl
Klawulanian potasu	3	1,47 mg/ml
Cyklosporyna	3	0,180 mg/dl
EDTA	3	0,099 mg/dl
Ewerolimus	3	0,0183 mg/dl
Flukonazol	3	2,55 mg/dl
Foscarnet	3	108 mg/dl
Gancyklowir	3	3,96 mg/dl
Letermowir	3	3,9 mg/dl
Mykofenolan mofetylu	3	18,1 mg/dl
Kwas mykofenolowy	3	18,1 mg/dl
Piperacylina	3	110 mg/dl
Prednizon	3	0,0099 mg/dl
Sirolimus	3	0,0213 mg/dl
Cytrynian sodu	3	3200 mg/dl
Sulfametoksazol	3	35,7 mg/dl
Takrolimus	3	0,0144 mg/dl
Tazobaktam sodu	3	10,2 mg/dl
Fumaran dizoproksylu tenofowiru	3	0,0978 mg/dl
Tikarcylina disodowa	3	151 mg/dl
Trimetoprim	3	4,2 mg/dl
Walacyklowir	3	3,83 mg/dl
Walgancyklowir	3	4,83 mg/dl
Wankomycyna	3	12 mg/dl

Swoistość analityczna

Potencjalna reaktywność krzyżowa z patogenami (Tabela 9) została oceniona przy użyciu matryc ujemnych względem wirusa EBV testowanych w obecności wirusa EBV w osoczu o stężeniu 2,56 log j.m./ml lub przy jego braku. Patogeny badano w najwyższym dostępnym stężeniu. Nie zaobserwowano żadnej reakcji krzyżowej ani zakłócenia dokładności oznaczania ilościowego.

Tabela 9: Patogeny badane pod kątem swoistości analitycznej

Mikroorganizm/patogen	Stężenie	Mikroorganizm/patogen	Stężenie
ADV-4	1,00E+04 TCID ₅₀ /ml	Ludzki wirus paragrypy	1,00E+05 j.m./ml
<i>Aspergillus niger</i>	1,00E+06 CFU/ml	Grypa typu A	1,00E+05 j.m./ml
BKV	5,00E+06 cz. wir./ml	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,00E+06 cz. wir./ml
<i>Candida albicans</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Chlamydia trachomatis</i>	1,00E+06 IFU/ml	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+06 CCU/ml
<i>Clostridium perfringens</i>	1,00E+06 cz. wir./ml	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1,00E+06 cz. wir./ml
CMV	1,00E+05 cz. wir./ml	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Propionibacterium acnes</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E+06 CFU/ml	Rinowirus	1,00E+06 cz. wir./ml
<i>Enterococcus faecalis</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Salmonella enterica</i>	1,00E+06 CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	1,00E+06 CFU/ml	<i>Staphylococcus aureus</i>	1,00E+06 CFU/ml
HBV	1,00E+05 j.m./ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,00E+06 CFU/ml
HCV	1,00E+04 j.m./ml	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,00E+06 CFU/ml
HIV-1	1,00E+05 j.m./ml	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/ml
HPV-18 (zakażone komórki HeLa)	1.00E+05 komórek/ml	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,00E+06 CFU/ml
Ludzki herpeswirus typu 6	1,00E+05 cz. wir./ml	<i>Trichomonas vaginalis</i>	1,00E+05 Trofozoity/ml
Ludzki herpeswirus typu 7	1,00E+03 TCID ₅₀ /ml	Wirus ospy wietrznej i półpaśca	1,00E+05 cz. wir./ml
Ludzki herpeswirus typu 8	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1,00E+06 CFU/ml
Ludzki metapneumowirus	1,00E+03 j.m./ml	Wirus Zika	1,00E+05 TCID ₅₀ /ml

CCU/ml = jednostki zmiany kolonii/ml.

CFU (j.t.k.)/ml = Jednostki tworzące kolonie na ml.

kopie/ml = liczba kopii na ml.

j.t.i./ml = jednostki tworzące inkluzje na ml.

j.m./ml = jednostki międzynarodowe na ml.

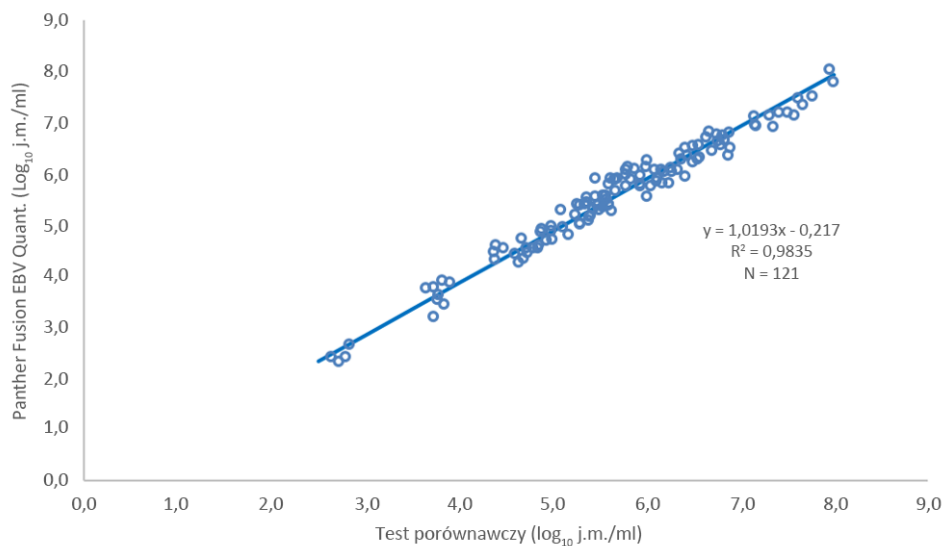
TCID₅₀/ml = jednostki dawki zakaźnej dla hodowli tkankowej na ml.

Korelacja metod

Badanie zostało zaprojektowane zgodnie z dokumentem CLSI EP09c.¹⁴

Korelacja metod dla osocza

Skuteczność testu Panther Fusion EBV Quant porównano ze skutecznością testu porównawczego poprzez zbadanie próbek pobranych retrospektywnie oraz próbek utworzonych sztucznie reprezentujących cały zakres liniowy. Do regresji liniowej wykorzystano łącznie 121 próbek w zakresie liniowym wspólnym dla obu testów dla regresji Deminga i wykazano współczynnik korelacji na poziomie 98,35%, tak jak pokazano w Rysunek 3.



Rysunek 3. Korelacja między obciążeniem wirusem EBV w teście ilościowym Panther Fusion EBV i teście porównawczym w badaniu próbek osocza

Przenoszenie/zanieczyszczenie krzyżowe

Przenoszenie zostało ocenione przy użyciu próbek podłoża STM, do których dodano wysokie miano wirusa EBV (1,5E+09 j.m./ml), przeplatanych pomiędzy próbkami EBV-ujemnymi w układzie szachownicy. Testy przeprowadzono w 5 seriach. Ogólny wskaźnik przenoszenia wyniósł 0,67% (1/150).

Bibliografia

1. Tzellos S, Farrell PJ. 2012. Epstein-Barr Virus Sequence Variation—Biology and Disease. *Pathogens*. 1(2):156–174. doi.org/10.3390/pathogens1020156
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis. (2016). <https://www.cdc.gov/epstein-barr/about-mono.html>
3. Kimura H, Kwong Y-L. 2019. EBV Viral Loads in Diagnosis, Monitoring, and Response Assessment. *Front. Oncol.* 9:62.
4. Nijland, ML, Kersten MJ, Pals ST, Bemelman FJ, ten Berge JJM. 2016 Transplantation Direct 2016;2: e48 doi: 10.1097/TXD.0000000000000557
5. 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. *Haematol.* 2016;107(7):803-811. doi:10.3324/haematol.2016.144428
6. 1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques (NIBSC 09/260, version 4.0).
7. Clinical & Laboratory Standards Institute. Document M29. Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. CLSI Web site <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m29/> (April 4, 2022)
8. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2012. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guidelines – Second Edition. CLSI Document EP17-A2. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.
9. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2003. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guidelines. CLSI document EP06-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
10. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2006. Metrological Traceability and Its Implementation; A Report. CLSI document EP32-R. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
11. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2014. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline – Third Edition. CLSI document EP05-03. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
12. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2018. Interference Testing in Clinical Chemistry – Third Edition. CLSI document EP07, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
13. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2018. Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry. CLSI document EP37, 1st Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
14. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2018. Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. CLSI document EP09c, 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Dane kontaktowe i historia wersji



Diagenode S.A.
3, Rue du Bois Saint Jean
4102 Seraing, Belgia



Osoba odpowiedzialna w Wielkiej Brytanii:
Hologic Ltd.
Oaks Business Park, Crewe Road
Wythenshawe, Manchester, M23 9HZ
Wielka Brytania

Sponsor w Australii:
Hologic (Australia i Nowa Zelandia) Pty Ltd
Macquarie Park, NSW 2113

Adres e-mail i numer telefonu działu pomocy technicznej i obsługi klienta właściwe dla danego kraju można znaleźć na stronie www.hologic.com/support.

Hologic, Aptima, Panther i Panther Fusion oraz powiązane logo są znakami towarowymi i/lub zastrzeżonymi znakami towarowymi firmy Hologic, Inc. i/lub jednostek zależnych w Stanach Zjednoczonych i/lub innych państwach.

Quasar jest zastrzeżonym znakiem towarowym i posiada licencję Biosearch Technologies, Inc.

Wszystkie inne znaki towarowe, które mogą się pojawić w tej ulotce załączonej do opakowania, należą do ich odpowiednich właścicieli.

Opisywany produkt może być objęty co najmniej jednym patentem USA spośród wymienionych na stronie www.hologic.com/patents.

©2022-2025 Hologic, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

AW-26019-3401 Wer. 002
2025-03

Historia wersji	Data	Opis
AW-26019 Wer. 003	marzec 2025 r.	<i>Ta wersja jest zgodna z AW-26019-001 wer. 003.</i> (This version aligns with AW-26019-001 Rev. 003.)