

Charakterystyka testu cobas® DPX przeznaczanego do badania dawców krwi na obecność DNA parwowirusa B19 (B19V) i RNA HAV przy użyciu analizatora cobas® 6800 oraz aparatu cobas p 680 firmy Roche

Evaluation of the Roche cobas® DPX Test performed on the cobas® 6800 system and cobas p 680 instrument for parvovirus B19 DNA and HAV RNA detection in blood donations

Aneta Kopacz¹, Dorota Kubicka-Russel¹, Grzegorz Liszewski¹, Paulina Zwolińska¹,
Ewa Sulkowska¹, Aleksandra Kalińska¹, Jolanta Korzeniowska²,
Magdalena Łętowska¹, Piotr Grabarczyk¹

¹Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

²Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Lublinie

Streszczenie

Wstęp. Test cobas® DPX typu multiplex jest przeznaczony do badań dawców krwi w analizatorze cobas® 6800 firmy Roche. Wykorzystuje metodę real-time PCR i służy do ilościowego badania kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) parwowirusa B19 (B19V) oraz wykrywania kwasu rybonukleinowego RNA wirusa zapalenia wątroby typu A (HAV) w ludzkim osoczu. Opcjonalnym elementem systemu jest cobas p 680 — w pełni zautomatyzowane urządzenie pipetujące przeznaczone do pulowania pojedynczych próbek osocza.

Cel. Celem badań była ocena przydatności testów cobas® DPX do prowadzenia badań w krwiodawstwie. Przeanalizowano między innymi czułość wykrywania markerów, poprawność identyfikacji donacji zakażonych oraz ryzyko wystąpienia wyników fałszywych.

Materiał i metody. Czułość analityczną określano, badając w 24 powtórzeniach każdą próbkę z panelu rozcieńczeń materiału referencyjnego Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) genotypów B19V (09/110) — sześć rozcieńczeń genotypów 1–3 (31,6–0,1 IU/ml) oraz IS WHO RNA HAV (00/562) zawierających 10–0,03 IU/ml. Poprawność identyfikacji zakażeń testem DPX oceniono, badając w ośmiu pulach 767 donacji, w tym jedną z wysoką wiremią B19V.

Wyniki. Czułość analityczna testu cobas® DPX na poziomie 95% wykrywalności (LOD) (95-proc. przedział ufności) wyniosła 8,70 (4,92–21,69) IU/ml dla genotypu 1; 37,80 (22,24–93,65) IU/ml dla genotypu 2 i 29,84 (19,04–65,60) IU/ml dla genotypu 3 DNA B19V oraz 0,82 (0,49–1,96) IU/ml dla RNA HAV. Wyniki badań imitujących badania przeglądowe były zgodne z wynikami spodziewanymi. W trakcie oceny nie obserwowano wyników fałszywych.

Wnioski. Badanie testem DPX wykonane na cobas® 6800 i p 680 pozwala prawidłowo zidentyfikować DNA-emię B19V, która może spowodować przekroczenie dopuszczalnego poziomu

Autor do korespondencji: mgr Aneta Kopacz, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Wirusologii, ul. Chocimska 5, 02-776 Warszawa, tel.: 22 349 66 46, faks: 22 346 66 03, e-mail: akopacz@ihit.waw.pl

10⁴ IU B19V/ml w puli produkcyjnej składników osoczopochodnych. Równolegle prowadzone jest badanie RNA HAV. W badaniach nie stwierdzono istotnego ryzyka występowania wyników fałszywych.

Słowa kluczowe: DNA B19V, parwovirus B19, RNA HAV, wirus zapalenia wątroby typu A, badania krwiodawców

J. Transf. Med. 2018; 11: 91–99

Summary

Introduction. *The cobas[®] DPX test for use on the cobas[®] 6800 system, is a real-time PCR test for identification and quantitation of human parvovirus B19 (B19V) DNA and detection of hepatitis A virus (HAV) RNA in human plasma. An optional component to the cobas[®] 6800 system is the cobas p 680 instrument that makes pools from individual samples.*

Aim. *Evaluation of the performance of cobas[®] DPX test and demonstration of its ability to detect HAV and polymorphic forms of B19V during plasma testing. Sensitivity, correct identification of reactive donations as well as the risk of false positive results was estimated.*

Material and method. *The analytical sensitivity of cobas[®] DPX test was assessed by testing dilutions of the WHO B19V Genotype 1–3 Reference Panels (09/110) and IS WHO RNA HAV (00/562) dilution panel. Six dilutions of each B19 panel were tested ranging from 31.6 IU/mL to 0.1 IU/mL of genotype 1, 2, 3 and six dilutions of RNA HAV panel ranging from 10–0,03 IU/ml (24 replicates/dilution). Detection and identification of reactive donations tested in minipools were evaluated by testing 767 negative and 1 high DNA B19V reactive donations in 8 pools.*

Results. *The 95% limits of detection [LOD] (95% confidence range) of the cobas[®] DPX test for DNA B19V were respectively: genotype 1 — 8.70 IU/mL (4.92–21.69), genotype 2 — 37.80 IU/ml (22.24–93.65), genotype 3 — 29.84 IU/ml (19.04–65.60) and for RNA HAV were: 0.82 IU/ml (0.49–1.96). Results of the cobas[®] DPX test from samples analyzed in minipools were 100% concordant with the expected results. No false reactive or invalid results were observed during donation screening.*

Conclusion. *The cobas[®] DPX test on the cobas[®] 6800 system allows to identify donations infected with HAV and genotypes 1–3 of B19V that could contaminate plasma production pools with HAV and B19V beyond the acceptable level (> 10⁴ IU/mL, according to recommendations). During the evaluation procedure there was no significant risk of false results.*

Key words: DNA B19V; parwovirus B19; RNA HAV; hepatitis A; blood donation screening

J. Transf. Med. 2018; 11: 91–99

Wstęp

Bezosłonkowy parwovirus B19 (B19V) należy do rodziny *Parvoviridae*. Genom stanowi jednoniciowy kwas deoksyrybonukleinowy (DNA, *deoxyribonucleic acid*). Zakażenia B19V występują powszechnie na całym świecie. Zwiększoną liczbę zachorowań stwierdza się zimą i wiosną, co kilka lat obserwowane są epidemie. Odsetek osób z wytworzonymi przeciwciałami klasy IgG przed 18. rokiem życia może osiągnąć 60% i wzrastać do 80% u osób dorosłych [1]. W Polsce blisko 2/3 populacji nabywa

odporność na zakażenie B19V przed ukończeniem 20. roku życia [2]. U osób immunokompetentnych infekcja przebiega zazwyczaj bezobjawowo lub z mało swoistymi symptomami. Zakażenie B19V stwarza ryzyko wystąpienia istotnych powikłań klinicznych u osób z obniżoną odpornością, z nasiloną odnową układu czerwokrwinkowego oraz u seronegatywnych kobiet ciężarnych. Liczba kopii DNA B19V w ostrej fazie zakażenia może przekraczać 10¹² IU/ml [1].

Jak dotąd wyróżniono trzy główne formy polimorficzne B19V: genotyp 1, 2 i 3. Występowanie

genotypów parwowirusa B19 jest zróżnicowane, przy czym genotyp 1 jest najbardziej rozpowszechniony i występuje na całym świecie [1]. Ponadto w Polsce sporadycznie wykrywa się zakażenia genotypem 2 [3]. Wszystkie znane formy polimorficzne B19V wykazują podobne właściwości biologiczne oraz znaczenie kliniczne [1]. Opisywano trudności w wykrywaniu genotypów 2 i 3 metodami biologii molekularnej. Niektóre testy wykazują obniżoną czułość kliniczną względem form polimorficznych lub ich wcale nie wykrywają [4–6]. Dlatego podkreśla się istotność stosowania testów diagnostycznych o wysokiej czułości w odniesieniu do wszystkich klinicznie ważnych form polimorficznych B19V [7].

Trudności diagnostyczne związane są także z ryzykiem otrzymania wyników fałszywie ujemnych w próbkach z wysokim stężeniem DNA B19V we wczesnej fazie zakażenia, podobnie jak u osób z obniżoną odpornością, kiedy wiramia osiąga wartości 10^{14} IU/ml [8].

Przetoczenie produktu krwiopochodnego uzyskanego z osocza dawcy z wysoką DNA-emią może spowodować zakażenie B19V u biorcy [9–11]. Aby zapobiec przeniesieniu zakażenia parwowirusem B19 z produktem krwiopochodnym, osocze dawców jest badane na obecność DNA B19V przed frakcjonowaniem. W Polsce badania przeglądowe DNA parwowirusa B19 wykonuje się w próbkach od dawców osocza przeznaczonego do produkcji immunoglobulin anty-RhD i anty-HBs (badania w pulach osocza), u dawców, których krwinki używa się do immunizacji, oraz łącznie z badaniem kwasu deoksyrybonukleinowego (RNA, *ribonucleic acid*) HAV w osoczu przeznaczonym do wytwarzania produktów osoczopochodnych zgodnie z wymogami frakcjonatora [12]. Według Farmakopei Europejskiej w puli osocza przeznaczonego do frakcjonowania stężenie DNA B19V nie może przekroczyć wartości 10^4 IU/ml [13]. Dlatego badania DNA B19V należy wykonywać testami umożliwiającymi wykrycie takiego poziomu DNA B19V, aby w puli produkcyjnej stężenie kwasów nukleinowych wirusa nie przekroczyło wartości 10^4 IU/ml.

W Polsce w latach 2013–2016 w osoczu przeznaczonym do frakcjonowania DNA-emią B19V powyżej 10^4 IU/ml wykrywano z częstością 12,5/100 tys. donacji oraz 18,4/100 tys. dawców. W trakcie badań 1 514 615 donacji pobranych od 1 029 535 dawców uzyskano 189 wyników reaktywnych (dane uzyskane z rocznych sprawozdań Regionalnych Centrów Krwiodawstwa i Krwiolęcznictwa (RCKiK) [14].

Wirus zapalenia wątroby typu A (HAV, *Hepatitis A Virus*) jest wirusem RNA należącym

do *Picornaviridae*. Przenosi się przede wszystkim drogą pokarmową i wywołuje wirusowe zapalenie wątroby typu A (WZW A). Wirus nie ma osłonki, co wiąże się z jego wysoką stabilnością oraz opornością na inaktywację. Rozpowszechnienie WZW A zależy od stanu sanitarnego. W krajach o niskim statusie socjalno-ekonomicznym zakażenie HAV, w większości bezobjawowo, przechodzi ponad 90% dzieci poniżej 10. roku życia. W Polsce po 1997 roku obserwowano spadek zapadalności na WZW A (z 10,47/100 tys. w 1997 r. do 0,18/100 tys. w 2005 r.) [15]. Do 2016 roku rejestrowano niewielką liczbę zapaleń wątroby typu A, na przykład w 2008 roku odnotowano około 200 przypadków, a w 2016 roku — tylko 35 przypadków [16]. W 2017 roku nastąpił gwałtowny wzrost zachorowań na wirusowe zapalenie wątroby typu A; odnotowano 3072 takich przypadków, co stanowi blisko 100-krotny wzrost zachorowań w porównaniu z rokiem poprzednim [17].

Okres inkubacji HAV wynosi kilka tygodni. Wiramia, z wykrywanym RNA HAV, jest obserwowana na ogół tylko przez około 2–6 tygodni (sporadycznie ponad rok) po ekspozycji. Najwyższy poziom wirusowego RNA we krwi występuje w czasie ostrych objawów choroby. Wyzdrowienie ma miejsce po około miesiącu. Wirus ten zazwyczaj nie prowadzi do zakażenia przewlekłego. Nie obserwuje się stanu nosicielstwa. U około 0,1% dorosłych zakażenie ma postać nadostrą, groźną dla życia [18].

W literaturze opisywane są pojedyncze przypadki przeniesienia tego zakażenia przez transfuzję [19–20]. Niemniej, ze względu na oporność HAV na procesy inaktywacji, RNA HAV jest badane w osoczu przeznaczonym do frakcjonowania. Według danych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) w Polsce od roku 2015 na obecność RNA HAV i DNA B19V (testy *multiplex*) bada się średnio około 600 tys. donacji rocznie.

Cel

Celem badań były walidacja i ocena przydatności testu cobas DPX, z wykorzystaniem systemu cobas 6800 i cobas p 680 firmy Roche do wykrywania DNA B19V i RNA HAV w osoczu dawców krwi.

Materiał i metody

Test cobas® DPX jest przeznaczony do bezpośredniego, ilościowego oznaczania DNA parwowirusa B19 (B19V, genotypy 1, 2 i 3) oraz jakościowego wykrywania RNA HAV (genotypy 1, 2 i 3) w ludzkim osoczu. Test jest oparty na technice *real-time PCR* i należy do testów typu *duplex*, co

oznacza, że po izolacji kwasów nukleinowych dokonuje się amplifikacji z użyciem mieszaniny primerów skierowanych do genomu dwóch wirusów. Analiza wyniku reaktywnego w systemie cobas 6800 pozwala stwierdzić, który wirus jest obecny w próbce i nie wymaga wykonywania oddzielnego badania różnicującego. Stosując test cobas DPX, uzyskuje się wynik ilościowy DNA B19V — jest to możliwe dzięki wykorzystaniu standardu ilościowego (QS, *quality standard*) kalibrowanego względem standardu międzynarodowego Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) — i wynik jakościowy RNA HAV. Test DPX, dostępny w opakowaniach po 96 sztuk, jest przeznaczony nie do diagnostyki zakażeń parwowirusem B19 i HAV u pacjentów, lecz jedynie do prowadzenia badań dawców krwi. Wykonuje się go za pomocą systemu cobas 6800/8800, w którego skład wchodzi: aparat cobas 6800/8800 firmy Roche do automatycznej izolacji, amplifikacji i detekcji materiału genetycznego wirusów oraz serwer wraz z komputerem i oprogramowaniem zbierającym dane i tworzącym kopie zapasowe. Badania testem DPX mogą być wykonywane w pojedynczych próbkach w aparacie cobas 6800/8800 i w pulach powstałych ze zlania określonej liczby próbek z użyciem aparatu cobas p 680. Systemy cobas 6800/8800 i cobas p 680 są przeznaczone do badania pul uzyskanych przez zlanie osocza z 1, 6, 24, 96 lub 480 donacji.

Przebieg badań

Badania były wykonywane naprzemiennie przez dwoje operatorów i obejmowały:

- **ocenę czułości analitycznej i powtarzalności metody** — walidacji czułości analitycznej wykrywania DNA parwowirusa B19 (B19V, genotypy 1–3) i RNA HAV dokonano przez wielokrotne badania kolejnych sześciu rozcieńczeń standardów WHO zawierających określone stężenie (w IU/ml) materiału genetycznego wirusów: WHO Reference Reagent Parvovirus B19 09/110 (31,6–0,1 IU/ml), WHO RNA HAV 00/562 (10–0,0316 IU/ml). Codziennie do serii badań dołączano 10 próbek ujemnych;
- **ocenę poprawności identyfikacji dodatniej próbki w pulach osocza** — pul było osiem, a każda składała się z 96 donacji (MP96; łącznie zaplanowano badanie 768 donacji). Wśród próbek umieszczono jedną donację z wysoką wiremią ($>10^9$ IU/ml). Taki schemat badania miał pozwolić na ocenę poprawności identyfikacji próbki, w której stężenie DNA B19V przekracza górny zakres liniowości testu (1×10^9 IU/ml);

- **ocenę instrukcji obsługi i działania systemu cobas 6800 i cobas p 680** ze strony operatora;
- **ocenę obsługi oprogramowania zarządzającego systemem cobas 6800 i aparatem cobas p 680;**
- **przygotowanie wskazówek postępowania dla użytkowników testu cobas DPX.**

Wyniki analizy czułości analitycznej testu DPX zostały zestawione z wynikami oceny testu Taqscreen DPX wykonanej dla genotypu 1 B19V w IHiT, a dla genotypów 2 i 3 B19V — w RCKIK w Lublinie [21].

Wyniki

Czułość analityczna i powtarzalność metody

W tabeli 1 przedstawiono wyniki badania testem cobas DPX rozcieńczeń WHO *Reference Reagent DNA Parvovirus B19 09/110* (genotypy 1–3) o stężeniu 31,6–0,1 IU/ml.

Genotyp 1 DNA B19V wykryto we wszystkich 24 próbkach zawierających 31,6 IU/ml i 10 IU/ml, wynik dodatni uzyskano także w 70,83%, 54,17% i 25% próbek o stężeniu odpowiednio 3,16 IU/ml, 1 IU/ml i 0,316 IU/ml oraz w jednej spośród 24 próbek o stężeniu 0,1 IU/ml.

Genotyp 2 DNA B19V wykryto we wszystkich 24 próbkach zawierających 31,6 IU/ml, wynik dodatni uzyskano także w 58,33%, 16,67% i 12,5% próbek o stężeniu odpowiednio 10 IU/ml, 3,16 IU/ml i 1 IU/ml. W próbkach o stężeniu 0,316 IU/ml i mniejszym nie wykryto DNA B19V.

Genotyp 3 DNA B19V wykryto w 95,83% próbek zawierających 31,6 IU/ml, wynik dodatni uzyskano także w 58,33%, 16,67% i 4,16% próbek o stężeniu odpowiednio 10 IU/ml, 3,16 IU/ml i 1 IU/ml. W próbkach o stężeniu 0,316 IU/ml i 0,1 IU/ml nie wykryto DNA B19V.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki wykrywania RNA HAV w rozcieńczeniach (10–0,316 IU/ml) WHO RNA HAV (00/562). We wszystkich 24 próbkach zawierających 10 IU/ml, 3,16 IU/ml i 1 IU/ml wykryto RNA HAV, wynik dodatni uzyskano także w 70,83%, 41,67% i 12,5% próbek o stężeniu odpowiednio 0,316 IU/ml, 0,1 IU/ml i 0,0316 IU/ml.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki analizy statystycznej (analiza Probit) danych dotyczących wykrywalności DNA B19V w panelach rozcieńczeń materiału referencyjnego WHO dla DNA, genotypów 1–3 B19V, oraz wykrywania RNA HAV w IS WHO RNA HAV 00/562.

Czułość analityczna wykrywania genotypu 1 B19V testem cobas DPX, wyrażona jako 50%

Tabela 1. Wyniki badania DNA B19V testem cobas DPX w próbkach rozcieńzonego międzynarodowego panelu referencyjnego Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dla parwowirusa B19, genotyp 1, 2, 3 (kod panelu: 09/110)**Table 1.** DNA B19V results of cobas DPX test in World Health Organization (WHO) International Reference Panel sample dilutions for Parvovirus B19V genotypes 1, 2 and 3 (NIBSC code: 09/110)

	Stężenie DNA B19V [IU/ml]	Liczba próbek badanych	Liczba wyników reaktywnych	Odsetek wyników reaktywnych
Genotyp 1				
	31,6	24	24	100%
	10	24	24	100%
	3,16	24	17	70,83%
	1	24	13	54,17%
	0,316	24	6	25%
	0,1	24	1	4,17%
Genotyp 2				
	31,6	24	24	100%
	10	24	14	58,33%
	3,16	24	4	16,67%
	1	24	3	12,5%
	0,316	24	0	0%
	0,1	24	0	0%
Genotyp 3				
	31,6	24	23	95,83%
	10	24	14	58,33%
	3,16	24	4	16,67%
	1	24	1	4,16%
	0,316	24	0	0%
	0,1	24	0	0%

Tabela 2. Wyniki badania RNA HAV testem cobas DPX w próbkach rozcieńzonego standardu Światowej Organizacji Zdrowia (IS WHO RNA HAV 00/562)**Table 2.** Positivity of RNA HAV for the cobas DPX test in International WHO RNA HAV Standard sample dilutions (IS WHO RNA HAV 00/562)

Stężenie RNA wirusa zapalenia wątroby typu A [IU/ml]	Liczba próbek badanych	Liczba wyników reaktywnych	Odsetek wyników reaktywnych
10	24	24	100%
3,16	24	24	100%
1	24	24	100%
0,316	24	17	70,83%
0,1	24	10	41,67%
0,0316	24	3	12,5%

Tabela 3. Czułość analityczna testu cobas DPX na podstawie wyników wielokrotnego badania rozcieńczeń panelu referencyjnego WHO B19V (genotyp 1–3) oraz IS WHO RNA HAV**Table 3.** Analytical sensitivity of cobas DPX test calculated on results from WHO International Reference Panel sample dilutions for Parvovirus B19V (genotypes 1–3) and IS WHO RNA HAV

Panel WHO (kod)	Liczba próbek	Czułość analityczna, wykrywalność 50% (50-proc. przedział ufności) [IU/ml]	Czułość analityczna, wykrywalność 95% (95%-proc. przedział ufności) [IU/ml]
B19V Genotyp 1 (09/110)	144	0,94 (0,63–1,38)	8,70 (4,92–21,69)
B19V Genotyp 2 (09/110)	144	6,25 (4,41–9,00)	37,80 (22,24–93,65)
B19V Genotyp 3 (09/110)	144	6,92 (5,04–9,59)	29,84 (19,04–65,60)
RNA HAV (00/562)	144	0,13 (0,09–0,18)	0,82 (0,49–1,96)

i 95% wykrywalności (LOD, *limits of detection*), wyniosła odpowiednio 0,94 IU/ml i 8,70 IU/ml. Dla genotypu 2 i 3 B19V czułość analityczna 50% i 95% LOD miała wartości odpowiednio 6,25 IU/ml i 37,80 IU/ml, oraz 6,92 IU/ml i 29,84 IU/ml. Czułość analityczna wykrywania RNA HAV testem cobas DPX wyniosła z kolei 0,13 IU/ml dla 50% LOD oraz 0,82 IU/ml dla 95% LOD.

Poprawność identyfikacji dodatniej próbki w pulach osocza składających się z 96 donacji

Dla jednej z ośmiu badanych pul (MP96) uzyskano wynik reaktywny DNA B19V ($9,24 \times 10^8$ IU/ml) i wynik nieważny (*invalid*) RNA HAV. Następnie zgodnie z algorytmem producenta testu przeprowadzono badania ośmiu minipul (tzw. pul wtórnych), z których każda składała się z osocza pochodzącego z 12 próbek. Dla siedmiu pul wtórnych uzyskano wyniki niereaktywne, a dla jednej — wyniki nieważne (*invalid*) w kierunku DNA B19V i RNA HAV. Następnie indywidualnie zbadano wszystkie 12 próbek wchodzących w skład puli wtórnej, dla której uzyskano wyniki nieważne (*invalid*). W przypadku jednej z nich uzyskano wynik nieważny (*invalid*) badania RNA HAV oraz wynik powyżej wartości odcięcia (*titer max*; górna granica zakresu liniowości dla testu wynosi 1×10^9 IU/ml) badania DNA B19V. Osocze tej donacji rozcieńczono 1 mln razy osoczem, w którym we wcześniejszym badaniu nie stwierdzono DNA B19V i RNA HAV. Rozcieńczoną donację zbadano ponownie testem cobas DPX indywidualnie i uzyskano wynik ilościowy DNA B19V $1,66 \times 10^5$ IU/ml (po uwzględnieniu rozcieńczenia, wiremię w donacji określono na poziomie $1,66 \times 10^{11}$ IU/ml)

oraz wynik RNA HAV niereaktywny. W efekcie przeprowadzonych badań poprawnie zidentyfikowano donację z wysokim stężeniem DNA B19V ($> 10^9$ IU/ml). Podczas badań nie obserwowano wyników fałszywie dodatnich będących skutkiem zanieczyszczeń materiałem biologicznym — tak zwanych kontaminacji (tab. 4).

W trakcie walidacji przeprowadzanych w IHiT i badań w RCKiK w Lublinie czułość analityczna na poziomie 95% wykrywalności (zakres rozcieńczeń: 31,6–0,1 IU/ml) dla DNA B19V wyniosła w teście cobas DPX 8,7 IU/ml dla genotypu 1, 37,8 IU/ml dla genotypu 2 i 29,84 IU/ml dla genotypu 3, a w teście cobas Taqscreen DPX odpowiednio: 11,7 IU/ml, 4,58 IU/ml i 2,31 IU/ml [22].

Pozostałe obserwacje dotyczące użytkowania testu cobas[®] DPX wraz z analizatorem cobas[®] 6800 oraz aparatem cobas p 680 (Roche)

W trakcie oceny stwierdzono, że system cobas 6800, za pomocą którego wykonuje się badanie testem cobas DPX, ma szereg użytecznych funkcji, między innymi podaje informacje o konieczności wykonania tygodniowej konserwacji, o uzupełnieniu materiałów zużywalnych. Monitoruje daty ważności i numery serii odczynników oraz firmowych kontroli dodatnich i ujemnych; wyświetla komunikaty, który z płynów/pojemników/statywów należy opróżnić lub uzupełnić; sprawdza obecność i odpowiednie położenie: kontroli firmowych, statywów z próbkami, materiałami zużywalnymi i odczynnikami. System podaje informacje o nieczytelności kodów kreskowych, a także przewidywany czas zakończenia badania. Po zakończeniu badania w uporządkowany sposób przedstawia wyniki, po-

Tabela 4. Identyfikacja dodatniej donacji z wysokim stężeniem DNA B19V w pulach osocza**Table 4.** Identification of positive sample with high concentration of DNA B19V in plasma pools

badanych pul osocza (pula — 96 donacji)	Liczba	
	dodatnich donacji/ /pul osocza	prawidłowo zidentyfikowanych dodatnich donacji w pulach
8	1	1
Liczba oznaczeń: 8	Identyfikacja zakażonej donacji polegała na zbadaniu 8 pul wtórnych po 12 donacji, a następnie 12 donacji wchodzących w skład reaktywnej puli wtórnej; aby zidentyfikować zakażoną donację, wykonano łącznie 20 oznaczeń (21, licząc konieczność rozcieńczenia próbki o wysokiej wirerii)	

Tabela 5. Czulość analityczna testu cobas DPX w porównaniu z testem cobas Taqscreen DPX**Table 5.** Comparison of analytical sensitivity of cobas® DPX Test (Roche) with cobas Taqscreen DPX test

Standard Światowej Organizacji Zdrowia/WHO Reference Panel	Seria	cobas DPX	Seria	cobas Taqscreen DPX
		Czulość analityczna, wykrywalność 95% [IU/ml]		Czulość analityczna, wykrywalność 95% [IU/ml]
B19V — genotyp 1	09/110	8,7	09/110	11,7
B19V — genotyp 2	09/110	37,8	09/110	4,58
B19V — genotyp 3	09/110	29,84	09/110	2,31
Wirus zapalenia wątroby typu A	00/562	0,8		nieobecny

zwala je dowolnie przeglądać oraz nimi zarządzać. W przypadku wystąpienia awarii program sterujący systemem cobas 6800 i aparatem cobas p 680 generuje komunikaty o zaistniałym problemie i podaje numer błędu. System archiwizuje wyniki oraz komunikaty na dyskach. Wyniki oraz komunikaty można również przysyłać przez sieć internetową. Połączenie internetowe umożliwia również zdalną diagnostykę aparatu przez serwis.

Potwierdzono, że instrukcja obsługi systemu cobas 6800 i cobas p 680, i wykonania testu cobas DPX opisuje poszczególne etapy badania DNA B19V i RNA HAV w sposób umożliwiający operatorowi na samodzielne wykonanie wszystkich etapów badania.

Obsługa oprogramowania aparatu cobas 6800 i cobas p 680 jest analogiczna do obsługi testu cobas MPX.

Omówienie wyników walidacji

W trakcie badań ewaluacyjnych w IHiT stwierdzono, że test cobas DPX firmy Roche wykonywany w systemie cobas 6800 wykrywa z wysoką czułością DNA wirusa B19V o genotypie 1, 2 i 3. Uzyskane wyniki analizy czułości analitycznej wskazują, że badania mogą być prowadzone zarówno w pojedynczych donacjach, jak i w pulach

uzyskanych przez zlanie osocza z większej liczby donacji. Wielkość puli musi uwzględniać najnowsze zalecenia międzynarodowe oraz krajowe dotyczące czułości detekcji poszczególnych wirusów w odniesieniu do pojedynczej donacji.

Porównanie czułości testów cobas DPX i cobas Taqscreen DPX (tab. 5) w wykrywaniu genotypu 1 B19V wskazało na wyższą czułość testu nowej generacji, co jest zgodne z wynikami czułości analitycznej zamieszczonymi w instrukcjach producenta. W przypadku genotypu 2 i 3 parwowirusa B19 zwraca uwagę mniejsza czułość testu cobas DPX w porównaniu z testem cobas Taqscreen DPX. Otrzymane różnice mogą wynikać z materiału użytego do badań. Należy podkreślić, że oceny nie dokonywano, stosując standard międzynarodowy (IS), ale użyto rozcieńczenia materiału referencyjnego (dostarczanego w postaci osocza), który oprócz genotypu 1 obejmuje genotypy 2 i 3. W materiale referencyjnym (WHO Reference Reagent for Parvovirus B19 Genotypes for NAT NIBSC code 09/110) poziom DNA B19V został określony na podstawie średniej otrzymanej z wyników badań ilościowych z 27 laboratoriów i wynosi: 5,98 log₁₀ IU/ml (5,61–6,32 log₁₀ IU/ml) dla genotypu 1; 5,94 log₁₀ IU/ml (5,43–6,52 log₁₀ IU/ml) dla genotypu 2; 5,97 log₁₀ IU/ml (5,21–6,54 log₁₀ IU/ml) dla genotypu 3. Wyniki ilościowe dla materiału refe-

rencyjnego genotypów 2 i 3 charakteryzuje szerszy przedział ufności niż dla genotypu 1, co oznacza, że są one obciążone większym błędem [23]. Należy również wziąć pod uwagę, że otrzymane średnie wartości mogą odbiegać od rzeczywistego poziomu DNA B19V w materiale referencyjnym ze względu na niedokładność rozcieńczeń.

Ponieważ również w trakcie walidacji testu Procleix Parvo/HAV Assay, przeznaczonego do jednoczesnego wykrywania materiału genetycznego B19V i HAV, obserwowano różnice między podaną przez producenta czułością testu a wartościami otrzymanymi podczas ewaluacji, nie można również wykluczyć, że materiał referencyjny nie zachowuje stabilności. Taki proces został udokumentowany w przypadku IS HCV [24].

Aby spełnić aktualne zalecenia Farmakopei Europejskiej, zakładające, że należy identyfikować donacje, które w puli produkcyjnej mogą spowodować przekroczenie stężenia 10 tys. IU DNA B19V/ml, badania w CKiK mogą być prowadzone w pojedynczych donacjach oraz w tak zwanych pulach osocza składających się z 6, 24, 96 donacji [13].

W IHiT poprawność identyfikacji dodatniej próbki w pulach osocza oceniano, prowadząc badania w pulach po 96 próbek. Wykonanie badań testem cobas DPX w systemie cobas 6800 z aparatem cobas p 680 pozwoliło na prawidłową identyfikację donacji o wysokiej wirerii. Obserwacje poczynione w czasie przeprowadzonej symulacji wskazują, że należy zwracać szczególną uwagę na wyniki nieważne (oznaczone jako *invalid*), które mogą być wywołane skrajnie wysoką DNA-emią B19V (powyżej zakresu liniowości testu, tj. 1×10^9 IU/ml). W takiej sytuacji należy próbkę wyjściową rozcieńczyć zgodnie z zaleceniami producenta testu (pamiętając, że rozcieńczając próbkę zmieniamy w niej stężenie wszystkich jej składowych, w tym u dawcy z wiracją HAV — poziomu RNA HAV).

W przypadku wyniku reaktywnego lub nieważnego (*invalid*), w trakcie badania DNA B19V w pulach należy postępować zgodnie z zaleceniami producenta. W badaniach MP96 identyfikacja donacji wywołującej reaktywność MP96 polega na wykonaniu badania ośmiu pul wtórnych po 12 donacji. Wszystkie donacje wchodzące w skład reaktywnej puli wtórnej są następnie badane pojedynczo. Przyjęte postępowanie oznacza, że do identyfikacji zakażonej donacji należy wykonać przynajmniej 20 oznaczeń (≥ 21 , jeżeli wiramia próbki przekracza 10^9 i konieczne jest jej badanie w odpowiednim rozcieńczeniu), nie licząc próbek kontrolnych. Analogiczne postępowanie obowiązuje po wykryciu w MP96 RNA HAV.

W trakcie badań w IDT i pulach liczących 96 donacji lub mniej nie obserwowano wyników fałszywie reaktywnych spowodowanych kontaminacjami oraz wyników nieważnych (łączna liczba oznaczeń 644).

Podsumowanie

Test cobas® DPX firmy Roche może być używany do badania DNA B19V i RNA HAV w osoczu dawców krwi. Badania dawców w pełni zautomatyzowanym systemie cobas 6800 z aparatem cobas p 680 należy prowadzić w tak zwanych pulach osocza, przy czym możliwe jest również wykonanie badania w pojedynczych donacjach z pominięciem cobas p 680. Wielkość puli musi uwzględniać aktualne rekomendacje międzynarodowe i krajowe określające poziom wykrywalności DNA B19V.

Badania w systemie cobas® 6800 i p680 mogą być wykonywane wyłącznie przez wysoko wykwalifikowany personel, przeszkolony w zakresie stosowania metod biologii molekularnej oraz obsługi systemu cobas® 6800 oraz p 680 firmy Roche do wykonywania badań testem cobas® DPX. Należy bezwzględnie przestrzegać instrukcji i zasad użytkowania systemu cobas® 6800 i p680.

Podziękowania

Autorzy dziękują panu Jarosławowi Olchowemu z firmy *Roche Diagnostics* Polska za pomoc przy realizacji badań oraz mgr Zuzannie Dziąg za pomoc w przygotowaniu publikacji.

Badania zostały wykonane w ramach ewaluacji przed wprowadzeniem testu i urządzeń do jednostek organizacyjnych polskiej służby krwi i sfinansowane przez Roche Diagnostics Polska sp. z o.o.

Piśmiennictwo

1. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30(1): 43–113, doi: 10.1128/CMR.00040-16, indexed in Pubmed: 27806994.
2. Siennicka J, Stefanoff P, Trzcinska A, et al. ąd serologiczny w kierunku zakażenia parwowirusem B19 w Polsce. *Przegl Epidemiol.* 2006; 60: 571–580.
3. Grabarczyk P, Kalińska A, Kara M, et al. Identification and characterization of acute infection with parvovirus B19 genotype 2 in immunocompromised patients in Poland. *J Med Virol.* 2011; 83(1): 142–149, doi: 10.1002/jmv.21947, indexed in Pubmed: 21108352.
4. Koppelman MH, Rood IGH, Fryer JF, et al. Parvovirus B19 genotypes 1 and 2 detection with real-time polymerase chain reaction assays. *Vox Sang.* 2007; 93(3): 208–215, doi: 10.1111/j.1423-0410.2007.00957.x, indexed in Pubmed: 17845257.
5. Baylis SA, Fryer JF, Grabarczyk P. Effects of probe binding mutations in an assay designed to detect parvovirus B19: implications

- for the quantitation of different virus genotypes. *J Virol Methods*. 2007; 139(1): 97–99, doi: 10.1016/j.jviromet.2006.09.002, indexed in Pubmed: 17045660.
6. Baylis SA, Shah N, Minor PD. Evaluation of different assays for the detection of parvovirus B19 DNA in human plasma. *J Virol Methods*. 2004; 121(1): 7–16, doi: 10.1016/j.jviromet.2004.05.011, indexed in Pubmed: 15350727.
 7. Baylis SA, Buchheit KH. A proficiency testing study to evaluate laboratory performance for the detection of different genotypes of parvovirus B19. *Vox Sang*. 2009; 97(1): 13–20, doi: 10.1111/j.1423-0410.2009.01170.x, indexed in Pubmed: 19416495.
 8. Grabarczyk P, Kalińska A, Sulkowska E, et al. False negative results in high viremia parvovirus B19-samples tested with real-time PCR. *Pol J Microbiol*. 2010; 59(2): 129–132, indexed in Pubmed: 20734759.
 9. Yee TT, Cohen BJ, Pasi KJ, et al. Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by clotting factor concentrate. *Br J Haematol*. 1996; 93(2): 457–459, indexed in Pubmed: 8639448.
 10. Blümel J, Schmidt I, Effenberger W, et al. Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates. *Transfusion*. 2002; 42(11): 1473–1481, indexed in Pubmed: 12421221.
 11. Wu Cg, Mason B, Jong J, et al. Parvovirus B19 transmission by a high-purity factor VIII concentrate. *Transfusion*. 2005; 45(6): 1003–1010, doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.04387.x, indexed in Pubmed: 15935000.
 12. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 9 czerwca 2017 r. w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi (Dz. Urz. Ministra Zdrowia z 2017 r. , poz. ; 63).
 13. The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.), EDQM. ; 2017.
 14. Kalińska A, Kubicka-Russel D, Sulkowska E, et al. Polska Grupa ds. Badań Czynniki Zakaźnych u Dawców Krwi w Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa. *Epidemiologia i przebieg zakażenia parwowirusem B19 u dawców krwi w Polsce w latach 2010–2017. XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Hematologów i Transfuzjologów, 21–23 września 2017 r., Warszawa. Acta Haematologica Polonica. ; 2017(supl. 1): s189.*
 15. Janaszek-Seydlitz W, Bucholc B, Wiatrzyk A. Poziom przeciwciał przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu A u osób z tere-nu Warszawy. *Przegl Epidemiol*. 2007; 61: 675–682.
 16. Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Poznaniu. Liczba zachorowań i zapadalność na wirusowe zapalenie wątroby typu A w Wielkopolsce i Polsce w latach 2009–2016 (tabela), <http://www.wsse-poznan.pl>.
 17. Zakład Epidemiologii NIZP-PZH. Zachorowania na wybrane choroby zakaźne w Polsce od 1 stycznia do 31 grudnia 2017 r. oraz w porównywalnym okresie 2016 r., http://www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2017/INF_17_12B.pdf.
 18. Brojer E., Grabarczyk P. Czynniki zakaźne istotne w transfuzjologii. W: Brojer E., Kopacz A., Grabarczyk P. *Wirus zapalenia wątroby typu A (HAV)*. Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa 2015: 61.
 19. da Silva SG, Leon LA, Alves G, et al. A Rare Case of Transfusion Transmission of Hepatitis A Virus to Two Patients with Haematological Disease. *Transfus Med Hemother*. 2016; 43(2): 137–141, doi: 10.1159/000441910, indexed in Pubmed: 27226795.
 20. Gowland P, Fontana S, Niederhauser C, et al. Molecular and serologic tracing of a transfusion-transmitted hepatitis A virus. *Transfusion*. 2004; 44(11): 1555–1561, doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.04071.x, indexed in Pubmed: 15504159.
 21. Korzeniowska J, Radwan-Wieczorek H, Kopacz A, et al. Charakterystyka testu ROCHE COBAS® TAQSCREEN DPX przeznaczonego do wykrywania parwowirusa B19V (B19V) u dawców krwi. *Acta Haematologica Polonica*. 2013; 44: 119–120, doi: 10.1016/j.achaem.2013.07.107.
 22. Grabarczyk P, Kopacz A, Liszewski G, et al. Evaluation of the Roche Cobas Taqscreen DPX test for parvovirus B19 DNA genotypes detection in blood donors. *Vox Sang*. 2013; 105: 172.
 23. WHO Reference Reagent, 1st WHO International Reference Panel for Parvovirus B19, Genotypes for NAT based assays, NIBSC code:09/110, Instructions for use (version 1.0, Dated 10/03/2010).
 24. Lelie N, van Dr. Stability of native, lyophilised and inactivated HBV, HCV and HIV-1 plasma standards *Vox Sang*. 2018; 113(Suppl. 1): 406.