

Charakterystyka testu cobas[®] MPX wraz z analizatorem cobas[®] 6800 oraz aparatem cobas p 680 (Roche) przeznaczonych do automatycznego badania dawców krwi w kierunku RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), RNA ludzkiego wirusa nabytego niedoboru odporności (HIV) i DNA wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV)

Performance evaluation of cobas[®] MPX test on cobas[®] 6800 and cobas p 680 (Roche) for automatic testing of blood donors for RNA of hepatitis C virus (HCV), RNA human immunodeficiency virus (HIV) and DNA of hepatitis B virus (HBV)

Aneta Kopacz, Dorota Kubicka-Russel, Grzegorz Liszewski, Paulina Zwolińska, Ewa Sulkowska, Magdalena Łętowska, Piotr Grabarczyk

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Streszczenie

Wstęp. Test cobas[®] MPX przeznaczony jest do badań przeglądowych krwiodawców na obecność kwasów nukleinowych wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), B (HBV) oraz ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV) w analizatorze cobas[®] 6800. Jest to jakościowy test multiplex, wykorzystujący metodę łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR). Opcjonalnym elementem systemu jest cobas p 680 — zautomatyzowane urządzenie pipetujące do pulowania próbek.

Cel. Ocena przydatności testu cobas[®] MPX do badań przeglądowych krwiodawców.

Materiały i metody. Czulość analityczną określano, badając w powtórzeniach rozcieńczenia międzynarodowych standardów (IS) WHO: HCV, HIV-1, HIV-2 i HBV oraz Performance Panel HIV-1 (O) (Sera Care). Poprawność identyfikacji wirusów oceniano, badając: pojedynczo (IDT) 14 seronegatywnych próbek zawierających materiał genetyczny (NAT yield) oraz w mini-pulach 480 próbek: 473 ujemnych i 7 NAT yield.

Wyniki. Czulość analityczna testu cobas[®] MPX na poziomie 95% wykrywalności [LOD] (95% przedział ufności) wynosiła odpowiednio dla HCV — 7,12 IU/ml (4,40–15,62); HIV — 31,33 IU/ml (17,84–76,80), natomiast dla HBV zależała od doboru rozcieńczeń do analizy Probit — 3,97 IU/ml (2,25–9,75); 2,05 IU/ml (1,45–3,40); 1,3 IU/ml (0,89–4,25). Wyniki reaktywne uzyskano we wszystkich próbkach rozcieńczeń o stężeniach 100–10 kopii/ml oraz 31,6 i 10 IU/ml, odpowiednio, HIV-1 grupy O i HIV-2. Wyniki badań imitujących badania

Adres do korespondencji: mgr Aneta Kopacz, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Wirusologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: akopacz@ihit.waw.pl

przeładowe z zastosowaniem testów cobas[®] MPX były zgodne z wynikami spodziewanymi, a częstość wyników fałszywie reaktywnych wynosiła 0,1%.

Wnioski. Test cobas[®] MPX wykazuje czułość i swoistość wymaganą dla testów przeładowych NAT stosowanych w polskim krwiodawstwie. Użycie testu na aparacie cobas[®] 6800 wraz z cobas p680 umożliwia prawidłową identyfikację zakażonej donacji bez istotnego ryzyka występowania wyników fałszywych.

Słowa kluczowe: RNA HCV, DNA HBV, RNA HIV, badania przeładowe krwiodawców

J. Transf. Med. 2018; 11: 39–51

Summary

Background. The cobas[®] MPX test for use with the cobas[®] 6800 System is a qualitative, real-time PCR test for the detection of HIV-1 Groups M and O RNA, HIV-2 RNA, HCV RNA and HBV DNA in human plasma and serum. The test simultaneously identifies HIV, HCV and HBV (multiplex). Optional component to the cobas[®] 6800 System is the cobas p 680 instrument that creates pools from individual samples.

Aim. To evaluate the cobas[®] MPX test in individual donations and in plasma pools using the cobas p 680 instrument.

Material and methods. Analytical sensitivity was assessed with serial dilutions of the WHO International Standards (IS): HCV, HIV-1, HIV-2, HBV and Performance Panel HIV-1 (O) (Sera Care). Correct identification of reactive donations was evaluated by testing 473 negative and 7 reactive donations in minipools (\leq MP6).

Results. Limits of detection (with 95% confidence limits) of cobas[®] MPX were 7.12 IU/mL (4.40–15.62), and 31.33 IU/mL (17.84–76.80) for HCV and HIV-1, respectively. For HBV it was related to dilutions used for Probit analysis and equaled 3.97 IU/mL (2.25–9.75): 1,33 IU/mL (0,89–4,25); 2,05 IU/mL (1,45–3,40). All dilutions of the HIV-1 group O (100–10 copies/mL) and HIV-2 (31.6–10 IU/mL) samples were detected. Results of tests imitating screening tests with cobas[®] MPX were as expected. Overall, false reactive rates for pooled samples were 0.1%.

Conclusions. The cobas[®] MPX test on the cobas[®] 6800 System, including the cobas p 680 instrument demonstrated high sensitivity and satisfactory specificity required in Polish blood donation system. The cobas[®] MPX test correctly identified infected donations without a significant risk of false results.

Key words: RNA HCV, DNA HBV, RNA HIV, blood donation screening

J. Transf. Med. 2018; 11: 39–51

Wstęp

W krwiodawstwie w Polsce, podobnie jak w wielu innych krajach europejskich, istnieje obowiązek badania na obecność kwasów nukleinowych wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV, *hepatitis B virus*), typu C (HCV, *hepatitis C virus*) i ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*) w każdej donacji wszystkich dawców krwi. Zgodnie z Obwieszczeniem Ministra Zdrowia z dnia 9 czerwca 2017 roku [1] o publicznej służbie krwi badania te muszą być

przeładowe z zastosowaniem testów o wysokiej czułości oraz swoistości. Ze względu na wielką skalę badań (trzy markery molekularne zakażenia w ponad 1 mln 200 tys. donacji rocznie) konieczna jest ich pełna automatyzacja.

Test cobas[®] MPX jest od niedawna dostępnym na rynku europejskim jakościowym testem *in vitro*, opatrzonym znakiem CE IVD, służącym do bezpośredniego wykrywania w ludzkim osoczu i surowicy RNA HIV-1 grupy M, RNA HIV-1 grupy O, RNA HIV-2, RNA HCV i DNA HBV. Konstrukcja testu umożliwia jednoczesne wykrycie (typ mul-

tipleks) i rozróżnienie RNA HIV, RNA HCV oraz DNA HBV (w przypadku zakażenia HIV nie ma możliwości rozróżnienia pomiędzy wirusem grupy M, grupy O oraz HIV-2).

Test posiada rozbudowany system kontroli przebiegu badania, podczas którego przeprowadzana jest ekstrakcja kwasów nukleinowych z próbki i dodanej kontroli wewnętrznej (*armored RNA*), co pozwala kontrolować proces izolacji, amplifikacji i detekcji. Oprócz tego w teście wykorzystuje się zestaw kontroli cobas MPX: trzy dodatnie (multi-kontrola HIV-1 grupa M, HCV, HBV oraz oddzielne kontrole HIV-1 grupa O i kontrola HIV-2) i jedna ujemna (NHP).

W celu zwiększenia czułości klinicznej wykrywania genotypów i wariantów wirusów w teście MPX stosuje się technikę amplifikacji dwóch regionów HIV-1 grupy M (LTR i gag) oraz wykorzystuje się dwie sondy skierowane do różnych obszarów genomu HCV [2].

Cel

Celem badań była ocena przydatności testów cobas® MPX do prowadzenia badań przeglądowych w polskim krwiodawstwie na aparacie cobas® 6800 z zastosowaniem urządzenia pulującego osocze cobas p 680.

Materiał i metody

Charakterystyka systemu

Aparaty serii cobas® 6800/8800 Systems służą do całkowicie automatycznej izolacji kwasów nukleinowych, ich amplifikacji oraz detekcji z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT PCR, *real time polymerase chain reaction*). Proces ten może być przeprowadzany z próbek pierwotnych (z pominięciem aparatu cobas p 680) i próbek wtórnych (przygotowanych przez cobas p 680). Cobas® 6800 składa się z czterech modułów: modułu, do którego użytkownik wstawia próbki; modułu transferowego, w którym ma miejsce skanowanie kodów, przenoszenie próbek i kontroli cobas MPX na płytkę do przetwarzania; modułu roboczego, gdzie następuje izolacja kwasów nukleinowych i przygotowanie płytki amplifikacyjnej, oraz modułu analitycznego (z jednym termocyklerem) przeznaczonego do amplifikacji i detekcji w czasie rzeczywistym. Częścią integralną aparatu jest lodówka do przechowywania odczynników. Opcjonalnym elementem systemu cobas® 6800 jest urządzenie cobas p 680 zlewające osocze z ustalonej liczby (1, 6, 24, 96 i 480) pojedynczych donacji w pulę osocza,

w której wykonywane jest badanie testem cobas® MPX. Otrzymanie wyniku reaktywnego dla puli, zgodnie z algorytmem postępowania zawartym w instrukcji użytkowania cobas® 6800, obliuguje do przeprowadzenia badań pojedynczych próbek osocza wchodzących w jej skład w celu identyfikacji donacji reaktywnej/reaktywnych [2].

Schemat badania

W trakcie badań analizowano między innymi czułość wykrywania poszczególnych markerów wirusów, możliwość identyfikacji donacji zakażonych oraz ryzyko wystąpienia wyników fałszywych. Badania wykonano w okresie od 4 maja do 24 września 2015 roku, używając odczynników cobas® MPX. Ewaluacja przeprowadzona była przez dwóch operatorów naprzemiennie i obejmowała ocenę:

- czułości i powtarzalności wyników oznaczeń/metody — poprzez 24-krotne badania kolejnych 6 rozcieńczeń standardów międzynarodowych zawierających określoną według międzynarodowych standardów (IS, *international standards*) Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) koncentrację materiału genetycznego wirusów: WHO HCV RNA 06/102 (31,6–0,1 IU/ml), WHO HIV-1 RNA 10/152 (100–0,316 IU/ml) oraz WHO HBV DNA 10/264 (10–0,0316 IU/ml). Do każdej serii badań dołączano próbki ujemne. Badania poszczególnych rozcieńczeń były wykonywane przez 4 kolejne dni (po 6 powtórzeń każdego dnia). Wszystkie badania zostały przeprowadzone bez użycia aparatu cobas p 680. Czułość analityczną testu określono na podstawie analizy Probit. Dla zestawów HBV wyliczono czułość analityczną dla różnych rozcieńczeń IS: używanych wcześniej do oceny testów starszej generacji firmy Roche oraz dodatkowo wykonano 20-krotne badanie panelu 6 rozcieńczeń (3,16–0,316 IU/ml) przygotowanych z IS WHO HBV DNA 10/264 według rekomendacji *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) EP17-1* [3], przy czym uwzględniono dodatkowo 1 rozcieńczenie powyżej 0,95 Hit Rate;
- wykrywalności genotypów HBV i HCV najczęściej identyfikowanych u zakażonych dawców krwi w Polsce — przebadano w 6 powtórzeniach osocze nierozcieńczone oraz rozcieńczone 6-krotnie pochodzące od dawców zakażonych HBV (z DNA HBV i HBsAg, tj. antygenem powierzchniowym HBV) i HCV (HCV NAT yields), u których wcześniej określono genotyp oraz poziom wirerii [w IU/ml]

(zakażenie u tych dawców zostało zidentyfikowane metodami biologii molekularnej w trakcie wcześniej prowadzonych badań przeglądowych);

- wykrywalności wirusa HIV w osoczu pochodzącym z okienka serologicznego zakażenia 8 dawców zidentyfikowanych w trakcie badań przeglądowych prowadzonych w Polsce w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi (JOPSK), które przeprowadzono w 6 powtórzeniach w próbkach nierozcieńczonych oraz rozcieńczonych 6-krotnie. Stężenie wirusa było znane w osoczu pochodzącym od 4 dawców, w 2 była znana także grupa wirusa;
- wykrywalności RNA HIV-1(O) i RNA HIV-2 poprzez 12-krotne oznaczenia próbek zawierających:
 - RNA HIV-1(O) o stężeniu 100–3,16 kopii/ml (Performance Panel HIV-1 genotype O seria 0800-0262, SeraCare),
 - RNA HIV-2 o stężeniu 31,6–0,316 IU/ml (WHO RNA HIV-2 seria 08/150);
- poprawności identyfikacji zakażonej donacji (próbki) w pulach osocza składających się z 6 próbek lub mniejszej ich liczby (z 2, 3, 4 i 5 próbek) oraz właściwego określenia typu wirusa w zakażonej próbce.

W tym celu zbadano:

- 462 próbki w pulach po 6 próbek (łącznie 77 pul); wśród badanych próbek znajdowało się 6 seronegatywnych próbek zakażonych: 2 zawierały RNA HIV, 2 DNA HBV, 1 RNA HCV oraz 1 zawierała RNA HIV i DNA HBV;
- 5 pul niepełnych, w tym: po 1 puli złożonej z 2, 3 i 5 próbek, oraz 2 złożone z 4 próbek, 1 z użytych próbek zawierała RNA HCV;
- na etapie tworzenia wyżej wymienionych pul sprawdzono również poprawność pulowania z użyciem płytki Library plate (do dodatkowych badań).

Dodatkowo zbadano 15 próbek pojedynczo [pula podstawowa (PP1, *primary pool*)] przygotowanych z użyciem urządzenia cobas p 680 i z wykorzystaniem dwóch rodzajów płytek: *Library plate* i *Aliquot plate* (płytki archiwizacyjna), dokonano oceny instrukcji obsługi i działania cobas® 6800 i p 680 oraz obsługującego ich oprogramowania.

Sprawdzono także możliwość wykonania badań w trybie pilnym (*cito*) dla pojedynczych próbek.

Zestawiono wyniki z obecnej oceny czułości analitycznej testów cobas MPX z wynikami badania testami wcześniejszych generacji przeznaczonych do prowadzenia badań przeglądowych u dawców krwi.

Wyniki

Analiza czułości analitycznej

W tabeli 1 przedstawiono wyniki badania rozcieńczeń standardów WHO oraz czułość analityczną uzyskaną w analizie Probit. Reaktywne wyniki badań uzyskano we wszystkich próbkach rozcieńczeń IS WHO RNA HCV o stężeniach 31,6 IU/ml i 10 IU/ml. Przy niższych stężeniach RNA HCV reaktywne wyniki otrzymano nie częściej niż w 83,33% próbek. Czułość analityczna na poziomie wykrywalności 95% (LOD, *limit of detection*) dla RNA HCV wyniosła 7,12 IU/ml.

Reaktywny wynik testu cobas® MPX uzyskano we wszystkich rozcieńczeniach standardu WHO RNA HIV-1 o stężeniu nie mniejszym niż 31,6 IU/ml. W próbkach z 10 IU/ml odsetek wyników reaktywnych wynosił 70,83%, w kolejnych rozcieńczeniach systematycznie spadał, aż do 8,33% dla najmniejszego badanego stężenia wynoszącego 0,316 IU/ml. Czułość analityczna na poziomie wykrywalności 95% wyniosła dla RNA HIV-1 31,33 IU/ml.

Dla standardu IS WHO DNA HBV wyniki reaktywne uzyskano we wszystkich ważnych (*valid*) oznaczeniach próbek o stężeniu nie mniejszym niż 3,16 IU/ml. W próbach kolejnych rozcieńczeń częstość wyników reaktywnych systematycznie malała, zaczynając od wartości 66,66% dla stężenia 1 IU DNA HBV/ml.

W badaniach rozcieńczeń standardu WHO DNA HBV uzyskano 5 wyników nieważnych (*invalid*). Probki te zbadano powtórnie i otrzymano dla nich wyniki ważne (*valid*). Dwa wyniki nieważne (*invalid*) (rozcieńczenia wg IS o stężeniach 0,1 IU/ml i 0,316 IU/ml) spowodowane były ujemnym wynikiem kontroli wewnętrznej, w 3 próbkach z DNA HBV (rozcieńczenia wg standardu 10 IU/ml, 1 IU/ml i 0,316 IU/ml) pierwotnie uzyskano wyniki nieważne (*invalid*) w kierunku RNA HIV i RNA HCV.

Czułość analityczna na poziomie 95% wykrywalności dla DNA HBV (rozcieńczenia 10–0,0316 IU/ml) wyniosła 3,97 IU/ml. Dla dodatkowo badanych rozcieńczeń standardu IS WHO DNA HBV (rozcieńczenia: 3,16 IU/ml, 1,78 IU/ml, 1 IU/ml, 0,72 IU/ml, 0,516 IU/ml i 0,316 IU/ml) wyniki reaktywne uzyskiwano we wszystkich ważnych oznaczeniach próbek zawierających stężenie nie mniejsze niż 1,78 IU/ml. W tej serii badań uzyskano 2 wyniki nieważne (próbki o stężeniach 1,78 IU/ml i 0,72 IU/ml) spowodowane ujemnym wynikiem kontroli wewnętrznej — badania po-

Tabela 1. Czułość analityczna testu cobas® MPX (Roche) na podstawie badania rozcieńczeń: **A.** IS WHO RNA HCV 06/102; **B.** IS WHO RNA HIV-1 10/152; **C, D.** IS WHO DNA HBV 10/264**Table 1.** Analytical sensitivity of cobas® MPX Test (Roche) based on tested dilutions: **A.** RNA HCV WHO International Standard (06/102), **B.** RNA HIV-1 WHO International Standard (10/152), **C, D.** DNA HBV WHO International Standard (10/264)**A**

Stężenie RNA HCV [IU/ml] (24 próbki dla każdego rozcieńczenia)	% wyników reaktywnych
31,6	100
10	100
3,16	83,33
1	29,17
0,316	8,33
0,1	4,17
Prawdopodobieństwo wykrycia	LOD [IU/ml]
95% LOD (95% przedział ufności)	7,12 (4,40–15,62)
50% LOD (95% przedział ufności)	1,27 (0,91–1,79)

B

Stężenie RNA HIV-1 [IU/ml] (24 próbki dla każdego rozcieńczenia)	% wyników reaktywnych
100	100
31,6	100
10	70,83
3,16	45,83
1	12,50
0,316	8,33
Prawdopodobieństwo wykrycia	LOD [IU/ml]
95% LOD (95% przedział ufności)	31,33 (17,84–76,80)
50% LOD (95% przedział ufności)	3,51 (2,37–5,14)

C

Stężenie DNA HBV [IU/ml] (24 próbki dla każdego rozcieńczenia)	% wyników reaktywnych
10	100
3,16	100
1	66,66
0,316	29,17
0,1	12,50
0,0316	8,33
Prawdopodobieństwo wykrycia	LOD [IU/ml]
95% LOD (95% przedział ufności)	3,97 (2,25–9,75)
50% LOD (95% przedział ufności)	0,44 (0,30–0,64)

D

Stężenie DNA HBV [IU/ml] (20 próbek dla każdego rozcieńczenia)	% wyników reaktywnych
3,16	100
1,78	100
1	85
0,72	78,95
0,516	40
0,316	0
Prawdopodobieństwo wykrycia	LOD [IU/ml]
95% LOD (95% przedział ufności)	1,33 (0,89–4,25)

IS (international standards) — standardy międzynarodowe; WHO (World Health Organization) — Światowa Organizacja Zdrowia; LOD (limit of detection) — poziom wykrywalności; HCV (hepatitis C virus) — wirus zapalenia wątroby typu C; HIV (human immunodeficiency virus) — ludzki wirus niedoboru odporności; HBV (hepatitis B virus) — wirus zapalenia wątroby typu B

wtórzone i uzyskano wyniki ważne. Czulość analityczna na poziomie wykrywalności 95% dla DNA HBV (analiza Probit tylko z dodatkowo wykonanych rozcieńczeń IS WHO w zakresie 3,16–0,316 IU/ml, n = 120) wyniosła 1,33 IU/ml, zaś wyliczona ze wszystkich wykonanych rozcieńczeń IS WHO DNA HBV (zakres: 10–0,0316 IU/ml; n = 264) 2,05 IU/ml.

Na rycinie 1 przedstawiono jednostkowe wartości cyklu progowego (Ct, *threshold cycle*) dla rozcieńczeń IS WHO RNA HCV, DNA HBV i RNA HIV, dla których uzyskano wyniki reaktywne.

Wyniki oznaczeń próbek ujemnych

Dla wszystkich 170 próbek ujemnych [próbki od dawców z ujemnymi wynikami przeglądowych badań serologicznych i kwasów nukleinowych (NAT, *nucleid acid testing*) w kierunku zakażenia wirusami HBV, HCV, HIV], które sukcesywnie były dołączane do poszczególnych serii badań, uzyskano wyniki niereaktywne w kierunku materiału genetycznego HIV, HCV i HBV. W żadnym przypadku nie otrzymano wyników fałszywie reaktywnych.

Ocena poprawności identyfikacji zakażonej donacji (próbki) w badaniu puli, określania typu wirusa, analiza ryzyka kontaminacji w trakcie badań przeglądowych oraz określenie możliwości wykonania badań w niepełnych pulach

W tabeli 2 przedstawiono wyniki identyfikacji dodatnich próbek w pulach osocza.

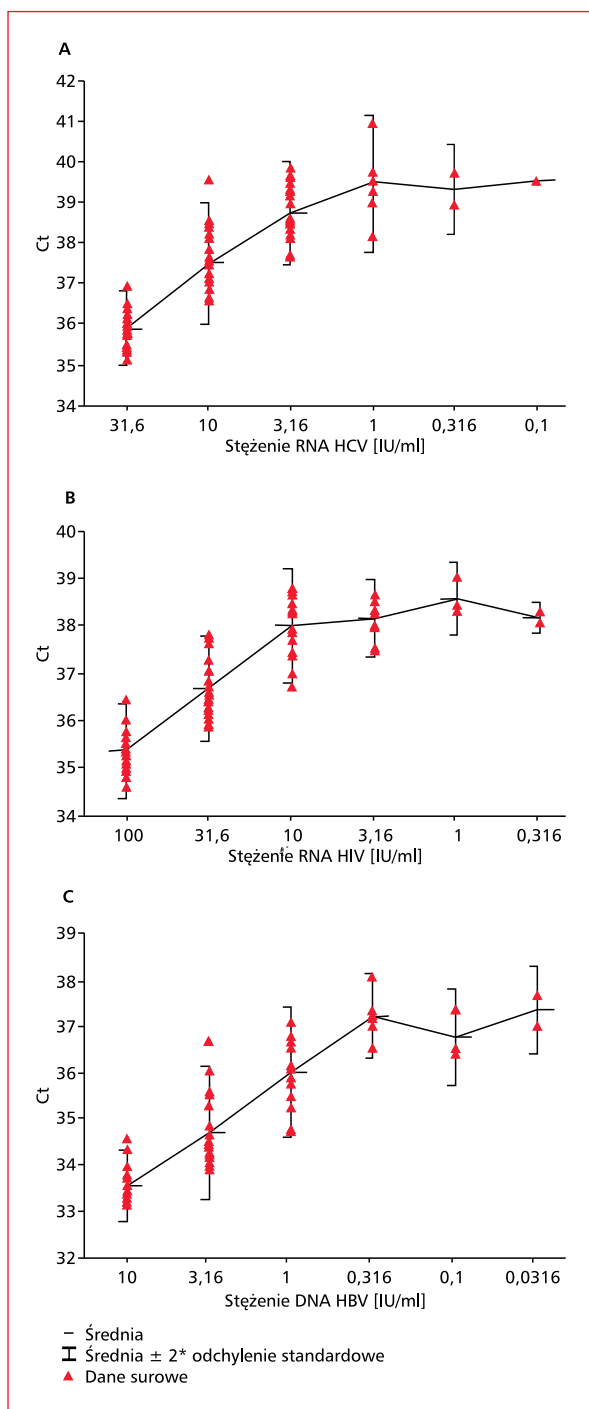
W trakcie badania 462 próbek osocza w pulach po 6 prawidłowo zidentyfikowano wszystkie dodatnie próbki (6 próbek) i trafnie określono typ wirusa/-ów, jakim były zakażone. Badania pozostałych 18 donacji w niepełnych pulach dały także wyniki prawidłowe. Nie stwierdzono wyników fałszywie ujemnych lub fałszywie reaktywnych.

Ocena wykrywalności zakażeń genotypami HBV i HCV

W tabeli 3 przedstawiono wyniki wykrywania testem cobas[®] MPX DNA genotypów HBV najczęściej identyfikowanych u zakażonych dawców krwi w Polsce. Badano osocze z indywidualnych donacji oraz ich 6-krotne rozcieńczenia.

W osoczu wszystkich donacji zakażonych genotypami A, D, H, oraz w ich rozcieńczeniach wykryto DNA HBV. Zakres stężenia DNA HBV w nierozcieńczonych próbkach wynosił od $6,9 \times 10^0$ IU/ml do $3,15 \times 10^3$ IU/ml.

W tabeli 4 przedstawiono wyniki wykrywania testem cobas[®] MPX RNA genotypów HCV najczęściej identyfikowanych u zakażonych tym



Rycina 1. Wartość cyklu progowego (Ct, *threshold cycle*) w badaniu próbek rozcieńczonych międzynarodowych standardów (IS, *international standards*) Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*): **A.** IS WHO RNA HCV 06/102; **B.** IS WHO RNA HIV-1 10/152; **C.** IS WHO DNA HBV 10/264

Figure 1. Ct Value in tested diluted samples of WHO International Standard. **A.** RNA HCV WHO International Standard (06/102), **B.** RNA HIV-1 WHO International Standard (10/152), **C.** DNA HBV WHO International Standard (10/264)

Tabela 2. Identyfikacja dodatnich próbek w pulach osocza**Table 2.** Identification of positive samples in plasma pools

Liczba badanych pul	Liczba próbek dodatnich	Wyniki oznaczeń
Liczba pul z 6 donacji: 77	6, w tym: 1 z RNA HCV 2 z DNA HBV 2 z RNA HIV 1 z RNA HIV i DNA HBV	71 pul niereaktywnych, 6 pul reaktywnych w tym 6 próbek reaktywnych: 1 z RNA HCV 2 z DNA HBV 2 z RNA HIV 1 z RNA HIV i DNA HBV
Liczba pul niepełnych: 5, w tym: 1 z 2 donacji 1 z 3 donacji 2 z 4 donacji 1 z 5 donacji	1 z RNA HCV (w puli z 4 donacji)	4 pule niereaktywne, 1 pula reaktywna w tym 1 próbka reaktywna RNA HCV

Tabela 3. Wyniki badania testem cobas® MPX DNA genotypów wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV, *hepatitis B virus*) najczęściej identyfikowanych u zakażonych dawców krwi w Polsce**Table 3.** Cobas® MPX Test results of DNA HBV genotypes most often identified among HBV infected donors in Poland

Nr próbki	Rozcieńczenie	Genotyp	DNA HBV [IU/ml]	Liczba powtórzeń	Wyniki reaktywne	
					Liczba	%
#1	–	A	$3,15 \times 10^3$	6	6	100
	6×				6	100
#2	–	D	$4,82 \times 10^2$	6	6	100
	6×				6	100
#3	–	H	$4,15 \times 10^1$	6	6	100
	6×				6	100

Tabela 4. Wyniki badania testem cobas® MPX RNA genotypów wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, *hepatitis C virus*) najczęściej identyfikowanych u zakażonych dawców krwi w Polsce**Table 4.** RNA HCV genotypes most frequently identified with Cobas® MPX test in donors in Poland

Nr próbki	Rozcieńczenie	Genotyp	RNA HCV [IU/ml]	Liczba powtórzeń	Wyniki reaktywne	
					Liczba	%
#1	–	1b	$1,97 \times 10^6$	6	6	100
	6×				6	100
#2	–	3a	$1,91 \times 10^6$	6	6	100
	6×				6	100
#3	–	4c/4d	$1,99 \times 10^5$	6	6	100
	6×				6	100

wirusem dawców krwi w Polsce. W tej części badania analizowano osocze od zakażonych dawców oraz 6-krotne rozcieńczenia donacji.

W osoczu wszystkich donacji zakażonych genotypami 1b, 3a, 4, oraz w ich rozcieńczeniach

uzyskano wynik reaktywny. Stężenie RNA HCV w badanych próbkach mieściło się w granicach od $3,3 \times 10^4$ do $1,97 \times 10^6$ IU/ml.

W tej serii badań uzyskano 1 wynik nieważny (*invalid*). W powtórny badaniu próbki otrzyma-

no wynik ważny. Dodatkowo dla 3 z 6 powtórzeń, w próbce (#1) nierozcieńczonej z RNA HCV o genotypie 1b, oprócz prawidłowych wyników RNA HCV uzyskano reaktywne wyniki DNA HBV. W próbce #1 w dodatkowo wykonanym oznaczeniu wykryto anti-HBc, co wskazuje, że najprawdopodobniej w donacji zidentyfikowano ukryte zakażenie HBV (OBI, *occult HBV infection*), z bardzo niskim stężeniem DNA HBV, które nie zostało wykryte w badaniu przeglądowym wykonanym testem cobas Taqscreen MPX w MP6, którego czułość (95% LOD) wynosiła 3,8 IU/ml (czułość badania w MP6 była na poziomie 22,8 IU/ml). Natomiast w wielokrotnym badaniu przeprowadzonym testem cobas[®] MPX 3/6 powtórzeń było reaktywnych. Uzyskane wyniki wskazywały na zakażenie HBV o stężeniu poniżej 95% LOD dla testu cobas[®] MPX, wynoszącego według deklaracji producenta 1,4 IU/ml.

Ocena wykrywalności wirusa HIV z okresu okienka serologicznego w osoczu zakażonych dawców

W tabeli 5 przedstawiono wyniki badania testem cobas[®] MPX osocza donacji z fazy okienka serologicznego polskich dawców zakażonych HIV zidentyfikowanych w trakcie badań przeglądowych.

RNA HIV wykryto we wszystkich badanych donacjach, które pochodziły z fazy okienka serologicznego HIV. W zbadanych rozcieńczeniach imitujących badanie w pulach po 6 donacji wykrywalność wirusa wynosiła 100%. Nierozcieńczone próbki zawierały: od $1,17 \times 10^2$ do $5,61 \times 10^4$ kopii/ml RNA HIV, co najmniej 2 zakażone były podtypem B [4].

Dla 3 próbek nierozcieńczonych, reaktywnych w kierunku RNA HIV (próbka nr #2, #3 i #15), uzyskano wyniki nieważne dla RNA HCV i DNA HBV. Badania te powtórzono i uzyskano wyniki ważne. Dla jednego powtórzenia próbki nierozcieńczonej HIV nr #4 oprócz prawidłowego wyniku RNA HIV otrzymano reaktywny wynik w kierunku DNA HBV. Ujemny wynik dodatkowo wykonanego oznaczenia anti-HBc dla próbki HIV nr #4 wskazuje, że prawdopodobnie był to fałszywie reaktywny wynik badania DNA HBV.

Ocena wykrywalności RNA HIV-1 (O) i RNA HIV-2

W tabeli 6 przedstawiono wyniki badania testem cobas[®] MPX rozcieńczeń materiału referencyjnego zawierającego RNA HIV-1 typ O oraz RNA HIV-2 (odpowiednio, część A i B tabeli). Reaktywny wynik testu cobas[®] MPX uzyskano we wszystkich próbkach Performance Panel RNA

Tabela 5. Wyniki badania testem cobas[®] MPX donacji z okresu okienka serologicznego dawców zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*)

Table 5. Results of cobas[®] MPX test on donations from subjects infected with HIV during the period of serological window

Nr próbki	Rozcieńczenie	Genotyp	RNA HIV [kopie/ml]	Liczba powtórzeń	Wyniki reaktywne	
					Liczba	%
#1	–	B	705	6	6	100
	×6		117	6	6	100
#2	–	B	16 300	6	6	100
	×6		2717	6	6	100
#3	–	nb*	17 000	6	6	100
	×6		2833	6	6	100
#4	–	nb	56 100	6	6	100
	×6		9350	6	6	100
#7	–	nb	nb	6	6	100
	×6		nb	6	6	100
#8	–	nb	nb	6	6	100
	×6		nb	6	6	100
#14	–	nb	nb	6	6	100
	×6		nb	6	6	100
#15	–	nb	nb	6	6	100
	×6		nb	6	6	100

*nb — nie badano

Tabela 6. Częstość wyników reaktywnych w badaniach próbek rozcieńzonego: **A.** Panelu Performance Panel HIV-1 (O) RNA 0800-0262; **B.** Standardu IS WHO HIV-2 RNA 08/150**Table 6.** Frequency of reactive results in tested diluted samples: **A.** Performance Panel HIV-1 (O) RNA 0800-0262 and **B.** IS WHO HIV-2 RNA 08/150**A**

Stężenie RNA HIV-1 (O) [kopii/ml]	Badanie w systemie cobas®6800, test cobas® MPX	
	Liczba próbek reaktywnych/badanych	% wyników reaktywnych
100	12/12	100
31,6	12/12	100
10	12/12	100
3,16	9/12	75

B

Stężenie RNA HIV-2 [IU/ml]	Badanie w systemie cobas®6800, test cobas® MPX	
	Liczba próbek reaktywnych/badanych	% wyników reaktywnych
31,6	12/12	100
10	12/12	100
3,16	9/12	75
1	5/12	42
0,316	5/12	42

HIV-1 (O) zawierających przynajmniej 10 kopii/ml. W próbce zawierającej 3,16 kopii/ml odsetek wyników reaktywnych wynosił 75%.

Dla próbek IS WHO RNA HIV-2 o stężeniach 31,6 IU/ml i 10 IU/ml uzyskano reaktywne wyniki w teście cobas® MPX w 100% badanych próbek. W próbce zawierającej 3,16 IU/ml odsetek wyników reaktywnych wynosił 75%, a w próbkach zawierających 1 IU/ml i 0,316 IU/ml — 42%.

Czułość analityczna testu cobas® MPX w porównaniu z testami cobas wcześniejszej generacji

Na rycinie 2 przedstawiono wykrywalność takich samych stężeń DNA HBV, RNA HCV i RNA HIV-1 (otrzymanych po rozcieńczeniu IS) w badaniach kolejnymi wersjami testu MPX. Na podstawie wyników prezentowanych na rycinach przeprowadzono analizy Probit (tab. 7). Dane do analiz pochodzą z opisywanej oceny testu MPX w systemie cobas 6800 oraz z ocen wykonywanych wcześniej w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHiT) dla systemu cobas s201 [5].

W badaniach próbek rozcieńczeń IS WHO RNA HIV-1 o stężeniu od 0,316 IU/ml do 100 IU/ml, IS WHO RNA HCV o stężeniu od 0,1 IU/ml do 31,6 IU/ml i IS WHO DNA HBV o stężeniu od 0,0316 IU/ml do 10 IU/ml najwyższy odsetek wyników reaktyw-

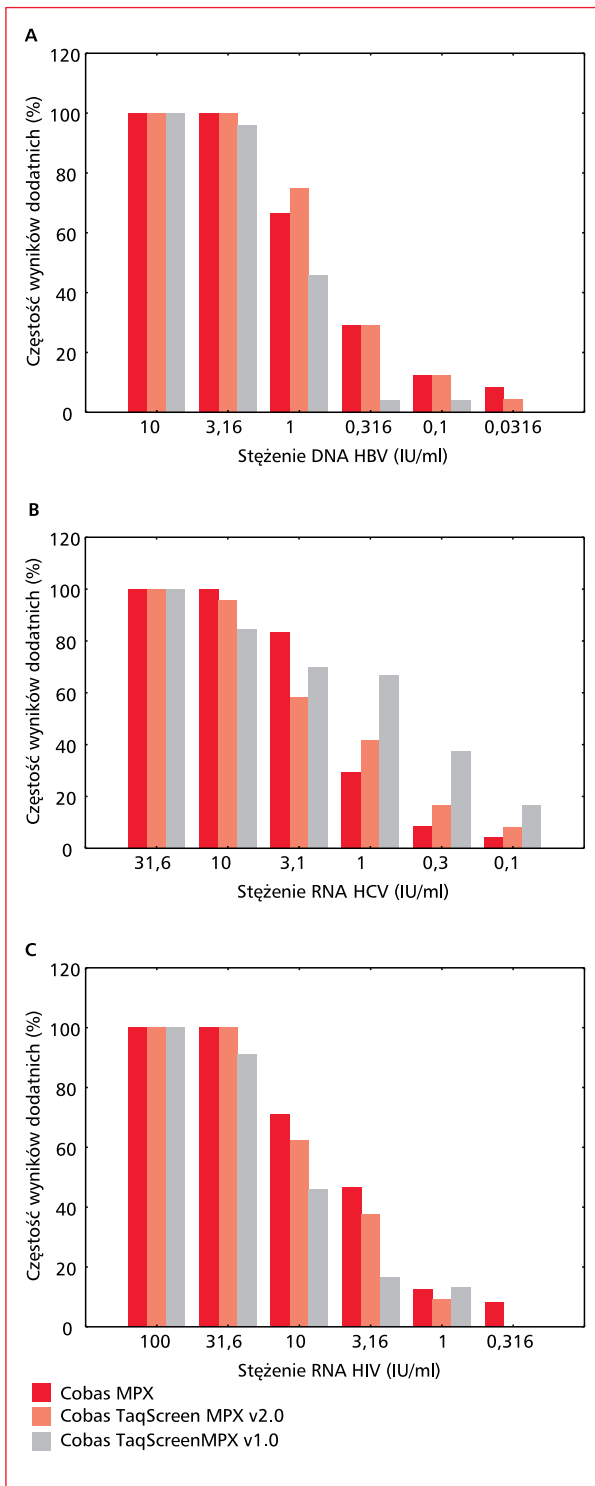
nych, odpowiednio dla HIV-1, HCV i HBV, uzyskano w teście cobas® MPX (54,9%, 53,5% i 56,3%), a najniższy w teście cobas Taqscreen MPX v. 1.0 (44,4%, 34% i 41,7%).

W trakcie walidacji przeprowadzanych w IHiT czułość analityczna na poziomie 95% wykrywalności dla HCV RNA wyniosła, odpowiednio, 23,8 IU/ml w teście cobas Taqscreen MPX; 13,7 IU/ml w teście cobas Taqscreen MPX v. 2.0, 7,1 IU/ml w teście cobas® MPX; dla RNA HIV-1, odpowiednio, 60,6 IU/ml, 28,8 IU/ml, 31,3 IU/ml; oraz dla HBV DNA: 4,0 IU/ml, 2,8 IU/ml, 3,9 IU/ml dla zakresu rozcieńczeń: 10–0,0316 IU/ml, 1,33 IU/ml dla rozcieńczeń 3,16–0,316 IU/ml i 2,05 IU/ml dla wszystkich badanych rozcieńczeń 10–0,0316 IU/ml.

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

Odczynniki służące do wykonania testu, umieszczone w kasetach odczynnikowych, są gotowe do użycia:

- cobas® MPX 96 test (odczynniki specyficzne) pozwalający na przeprowadzenie do 96 oznaczeń, tj. 1 przebiegu badania;
- cobas® MPX Control Kit zawierający 12 kontroli pozytywnych: 4 MPX M (HIV-1 grupa M,



Rycina 2. Porównanie czułości wykrywania: **A.** DNA HBV; **B.** RNA HCV; **C.** RNA HIV testami: cobas® MPX, cobas Taqscreen MPX v. 1.0 i cobas Taqscreen MPX v. 2.0

Figure 2. Comparison of detection sensitivity of: **A.** DNA HBV; **B.** RNA HCV and (C) RNA HIV with cobas® MPX, cobas Taqscreen MPX v1.0 and cobas Taqscreen MPX v2.0

HCV, HBV), 4 MPX O (HIV-1 O) i 4 MPX 2 (HIV-2);

— cobas® NHP Negative Control Kit obejmujący 16 kontroli negatywnych.

Przeprowadzenie pojedynczego przebiegu (maksymalnie 96 badań wykonywanych na dwóch 48-dołkowych płytkach do przetwarzania i jednej 96-dołkowej płytce amplifikacyjnej) wymaga wstawienia do aparatu po jednej kasecie odczynnikowej każdego rodzaju i wykorzystania minimum 1 kontroli negatywnej, 3 kontroli pozytywnych (1 MPX M, 1 MPX HIV-1 O, 1 MPX HIV-2) oraz odczynników specyficznych z kasety MPX 96 test. Zużycie odczynników specyficznych jest równe sumie liczby prowadzonych badań oraz wszystkich użytych kontroli cobas MPX.

Wyniki dla 96 badań uzyskiwano po około 3,5 godziny od rozpoczęcia pipetowania próbek na płytki do przetwarzania (początek przebiegu). Tworzenie następczej partii przebiegu (wykorzystując kolejną płytkę amplifikacyjną) rozpoczyna się z 1,5-godzinnym opóźnieniem w stosunku do pierwszej partii. Zatem wyniki prowadzonych badań z drugiej partii otrzymywano po około 5 godzinach od wstawienia pierwszych próbek na pokład aparatu. Dzięki takiej organizacji pracy w ciągu 8 godzin można zbadać 384 próbki.

Aparat cobas p 680 jest opcjonalnym elementem systemu cobas® 6800/8800 do użytku w laboratoriach wykonujących przesiewowe badania krwiodawców w pulach osocza. Cobas p 680 tworzy pule podstawowe z 1, 6, 24, 96 lub 480 próbek (zgodnie z ustawieniami użytkownika), w przypadku trudności pobrania materiału z próbki i/lub zbyt małej liczby próbek urządzenie umożliwia również tworzenie pul z dostępnej liczby próbek. Aparat jest w pełni zintegrowany z oprogramowaniem cobas® 6800. Sprawdzono, że aparat p 680 posiada opcję pulowania (*Multi Assay Pooling*), dzięki której tworzone są jednakowe pule o objętości wystarczającej do wykonywania większej liczby różnych testów (maksymalnie 3, np. MPX, DPX i HEV). Wykonano symulację takiego postępowania i potwierdzono możliwość wykonania wyżej wymienionych pul.

Zaobserwowano, że system cobas® 6800 przed i w trakcie prowadzenia badań testem cobas® MPX podaje informacje o konieczności wykonania konserwacji i uzupełnienia materiałów zużywalnych. Monitorował daty ważności i numery serii odczynników oraz kontroli cobas MPX. Wyświetlał także komunikaty, z jakiego powodu i który z pły-

Tabela 7. Czułość analityczna cobas® MPX w porównaniu z testami cobas Taqscreen MPX v. 1 i v. 2**Table 7.** Comparison of analytical sensitivity of cobas® MPX Test (Roche) with cobas Taqscreen MPX v 1 i v 2

IS WHO	Test					
	cobas MPX		cobas Taqscreen MPX v. 2.0		cobas Taqscreen MPX	
	Seria IS WHO	Czułość analityczna 95% LOD [IU/ml]	Seria IS WHO	Czułość analityczna 95% LOD [IU/ml]	Seria IS WHO	Czułość analityczna 95% LOD [IU/ml]
HCV	06/102	7,1	06/100	13,7	96/798	23,8
HBV	10/264	3,9*	97/750	2,8	97/746	4,0
	10/264	1,33**				
HIV-1	10/152	31,3	10/152	28,8	97/650	60,6

*czułość z wykorzystaniem panelu rozcieńczeń jak w przypadku testów cobas Taqscreen; ** czułość analityczna na podstawie wyników badania paneli zaprojektowanych wg CLSI EP17-1, przy czym uwzględniono dodatkowo jedno rozcieńczenie powyżej 0,95 Hit Rate; czułość analityczna 95% LOD na podstawie wyników badania paneli * i ** wyniosła 2,05 IU/ml; IS (*international standards*) — standardy międzynarodowe; WHO (*World Health Organization*) — Światowa Organizacja Zdrowia; LOD (*limit of detection*) — poziom wykrywalności

nów/pojemników/statywów należy opróżnić lub uzupełnić. Urządzenie automatycznie sprawdzało obecność i odpowiednie położenie: kontroli cobas MPX, statywów z próbkami, materiałami zużywalnymi i odczynnikami. System podawał informacje o nieczytelności kodów kreskowych, obecności dodatkowych próbek i wyświetlał informacje o przewidywanym czasie zakończenia badania. Po zakończeniu badania w jasny i uporządkowany sposób przedstawiał wyniki, pozwalał je dowolnie przeglądać oraz nimi zarządzać. System umożliwia archiwizację wyników oraz komunikatów na dysku zewnętrznym oraz na dyskach serwera. W przypadku wystąpienia awarii aparatów cobas® 6800 lub cobas p680 program sterujący systemem generował komunikaty o zaistniałym problemie, podawał numer błędu.

Potwierdzono możliwość jednoczesnego badania w aparacie cobas® 6800 pul utworzonych w aparacie cobas p680 i pojedynczych próbek.

Instrukcje obsługi oraz działania systemu cobas® 6800 i p680 zawierają opis wszystkich etapów tworzenia puli i prowadzenia badania testem cobas® MPX.

Potwierdzono deklarowaną przez producenta możliwość wykonania badań w trybie pilnym (*cito*) dla pojedynczych próbek (wstawiono do aparatu cobas® 6800 próbki z pominięciem stacji pulującej cobas p680). Potwierdzono, że rozpoczęcie badania w trybie *cito* zależy od zaawansowania prowadzonego procesu, po którym nastąpi badanie próbki *cito*, maksymalne opóźnienie wynosi 1,5 godziny.

Istnieje możliwość przypisania rodzaju badania do numerów statywów, w których umieszcza się, odpowiednio, próbki – indywidualne donacje, oraz próbki wtórne (przygotowane w procesie pulowa-

nia). Aparat posiada funkcję obracania próbek umożliwiającą czytanie kodów w przypadku próbek nieprawidłowo wstawionych do statywu.

Omówienie wyników walidacji oraz podsumowanie

Uzyskane wyniki analizy czułości analitycznej wskazują, że w systemie cobas 6800 badania mogą być prowadzone zarówno w pojedynczych donacjach, jak i w tak zwanych pulach uzyskanych przez zlanie osocza z większej liczby donacji. System może być użyty w JOPSK w Polsce pod warunkiem spełnienia aktualnych rekomendacji międzynarodowych oraz krajowych co do czułości detekcji poszczególnych wirusów w odniesieniu do pojedynczej donacji (musi je uwzględniać wielkość badanej puli). Zgodnie z rekomendacjami międzynarodowymi zaleca się, aby badanie RNA HCV odbywało się metodą o czułości nie mniejszej niż 5000 IU/ml w odniesieniu do pojedynczej donacji, a dla RNA HIV próg ten wynosi 10 000 IU/ml [6]. Dla DNA HBV polskie ustawodawstwo podaje, że czułość badania przeglądowego pojedynczej donacji nie może być mniejsza niż 24 IU/ml [1]. W osoczu, zgodnie z ulotką producenta, czułość analityczna testu cobas® MPX na poziomie 95% wykrywalności wynosi: dla HBV — 1,4 IU/ml, HCV — 7,0 IU/ml, HIV-1 — 37,7 IU/ml. Maksymalna wielkość puli, która spełnia obowiązujące w Polsce wymagania i jest dostępna w systemie cobas® 6800 wraz z urządzeniem pulującym cobas p 680 zlewającym osocze z ustalonej liczby próbek (1, 6, 24, 96 i 480), to pula złożona z 6 donacji. Producent deklaruje czułość testu cobas MPX na poziomie wyższym niż w systemie cobas s201 MPX v. 2.0, dotychczas używanym do prowadzenia badań przeglądowych

w Polsce. Deklaracja ta jest zgodna z otrzymanymi wynikami badania rozcieńczeń IS WHO HCV i HIV. W przypadku HBV uzyskane wyniki czułości analitycznej (95% LOD) zależały od stężenia próbek w analizowanym panelu rozcieńczeń IS WHO HBV: od 3,9 (10–0,036 IU/ml) do 1,33 IU/ml (3,16–0,316 IU/ml). O zwiększeniu czułości testu MPX dla wykrywania DNA HBV może świadczyć wykrycie tego markera w donacji anty-HBc(+), w której w badaniu przeglądowym testem Cobas TaqScreen MPX v. 2 wykryto wyłącznie RNA HCV. We wcześniejszych badaniach i analizach wykazano, że zwiększenie czułości badania przeglądowego poprawia efektywność identyfikacji seronegatywnych zakażeń HBV u dawców. W polskim krwiodawstwie po zmianie testu Cobas AmpliScreen na test Cobas TaqScreen MPX (Roche Diagnostics GmbH) i zmniejszeniu wielkości minipul ze złożonych z 24 donacji na minipule z 6 donacji zaobserwowano 6-krotny wzrost wykrywalności OBI [7]. Z kolei w pracy porównującej testy Ultrio (95% LOD = 10,5 IU/ml) i Ultrio Plus (95% LOD = 4,6 IU/ml) stwierdzono, że 2,5-krotny wzrost czułości analitycznej testu może zwiększyć częstość wykrywania OBI 9-krotnie [8, 9]. Wysoką efektywność detekcji DNA HBV testem cobas[®] MPX potwierdzają koreańskie badania pracowników szpitala (którzy w swoim życiu nie mieli objawów zakażenia): materiał genetyczny HBV (potwierdzony testem *nested* PCR) wykryto u 15/510 badanych osób [9].

Na 1015 wykonanych oznaczeń testem cobas[®] MPX dla 4 próbek (0,4%) uzyskano wynik nieważny (*invalid*), dla 1 (0,1%) wynik fałszywie reaktywny. W przypadku 6 (0,6% wszystkich oznaczeń) reaktywnych próbek uzyskano nieważny (*invalid*) wynik pozostałych 2 z 3 oznaczanych markerów. We wszystkich próbkach z wynikami nieważnymi (10 próbek) w ponownym oznaczeniu uzyskano wyniki prawidłowe. Wszystkie serie badań oraz wyniki dla próbek kontrolnych były ważne.

W trakcie badań zaobserwowano jeden prawdopodobny przypadek wyniku fałszywie reaktywnego (0,1% wykonanych oznaczeń). Biorąc pod uwagę, że 71% próbek/pul w obecnym badaniu było zakażonych, wyżej wymieniony przypadek świadczy o tym, że metody zapobiegania kontaminacji w ocenianych aparatach i teście są skuteczne. Należy pamiętać, że częstość zakażeń u dawców krwi, którzy będą badani testem MPX, jest niska (< 1/10 000) [10–12]. W ocenianym systemie istnieje kilka rozwiązań chroniących przed wynikami fałszywie reaktywnymi: cobas[®] 6800 jest systemem zamkniętym, posiada śluzę oddzielającą obszary przedamplifikacyjne od obszarów postam-

plifikacyjnych, zastosowano enzym AmpEraza. Ryzyko kontaminacji zmniejsza także zaklejenie płytki amplifikacyjnej przed przeniesieniem do termocyklera wykonywane bez udziału operatora.

Na szczególne podkreślenie zasługuje zastosowanie w teście amplifikacji dwóch regionów genomu HCV oraz HIV. Należy się spodziewać, że tego typu rozwiązanie pozwoli na wykrycie polimorficznych form wirusa, określanych mianem „mutantów ucieczki”, które w rutynowym badaniu przeglądowym testem skierowanym do jednego regionu nie były wykrywane [13–16].

Podsumowując, Test cobas[®] MPX firmy Roche może być używany do badań przeglądowych i weryfikacyjnych u dawców krwi, mających na celu wykrywanie materiału genetycznego HCV, HBV i HIV. Określenie rodzaju zakażenia nie wymaga przeprowadzenia dodatkowych testów różnicujących. Badania przeglądowe w systemie cobas[®] 6800 mogą być prowadzone zarówno w tak zwanych pulach osocza, jak i w pojedynczych donacjach. Wielkość puli musi uwzględniać aktualne rekomendacje międzynarodowe i krajowe dotyczące poziomu wykrywalności poszczególnych wirusów.

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[®] MPX. Należy bezwzględnie przestrzegać instrukcji i zasad użytkowania systemu cobas[®] 6800 i p680.

Podziękowania

Autorzy dziękują Panu Mariuszowi Dadakowi i Panu Jarosławowi Olchowemu z firmy Roche Diagnostics Polska za pomoc przy realizacji badań oraz Pani mgr Zuzannie Dziąg za pomoc w przygotowaniu publikacji.

Badania zostały sfinansowane przez Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o.

Piśmiennictwo

1. 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. Min. Zdr. 2017.63).
2. Roche, cobas[®] MPX, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg New Jersey.; 2015.
3. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline-Second Edition EP17-1 2012, v32, No. ; 8: 24.

4. Manak M, Sina S, Anekella B, et al. Pilot studies for development of an HIV subtype panel for surveillance of global diversity. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012; 28(6): 594–606, doi: [10.1089/AID.2011.0271](https://doi.org/10.1089/AID.2011.0271), indexed in Pubmed: [22149143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22149143/).
5. Grabarczyk P, Kopacz A, Liszewski G, et al. Evaluation and performance characterization of TaqScreen MPX version 2.0 intended for HCV RNA, HIV RNA and HBV DNA screening in blood donors. *American Association of Blood Banks Annual Meeting, Boston 06-09.* ; 10: 2012.
6. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. Recommendation No. R (95) 15, 18th Edition, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Strasbourg. : France.
7. Grabarczyk P, Kopacz A, Liszewski G, et al. Polish Blood Service Viral Study Group. Effectiveness of various mini pool NAT systems for HBV detection in blood donors. *Transfusion*. 2009; 49(7): 1494–1495.
8. Grabarczyk P, van Drimmelen H, Kopacz A, et al. Head-to-head comparison of two transcription-mediated amplification assay versions for detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus Type 1 in blood donors. *Transfusion*. 2013; 53(10 Pt 2): 2512–2524, doi: [10.1111/trf.12190](https://doi.org/10.1111/trf.12190), indexed in Pubmed: [23590145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23590145/).
9. Ha J, Park Y, Kim HS. Evaluation of clinical sensitivity and specificity of hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus, and human immunodeficiency Virus-1 by cobas MPX: Detection of occult HBV infection in an HBV-endemic area. *J Clin Virol*. 2017; 96: 60–63, doi: [10.1016/j.jcv.2017.09.010](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.09.010), indexed in Pubmed: [28982042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28982042/).
10. Brojer E, Gronowska A, Medyńska J, et al. The hepatitis C virus genotype and subtype frequency in hepatitis C virus RNA-positive, hepatitis C virus antibody-negative blood donors identified in the nucleic acid test screening program in Poland. *Transfusion*. 2004; 44(12): 1706–1710, doi: [10.1111/j.0041-1132.2004.04156.x](https://doi.org/10.1111/j.0041-1132.2004.04156.x), indexed in Pubmed: [15584984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15584984/).
11. Brojer E, Grabarczyk P, Liszewski G, et al. Polish Blood Transfusion Service Viral Study Group. Characterization of HBV DNA+/-HBsAg- blood donors in Poland identified by triplex NAT. *Hepatology*. 2006; 44(6): 1666–1674, doi: [10.1002/hep.21413](https://doi.org/10.1002/hep.21413), indexed in Pubmed: [17133474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17133474/).
12. Grabarczyk P, Kopacz A, Sulkowska E, et al. Blood donors screening for blood born viruses in Poland. *Przegl Epidemiol*. 2015; 69(3): 473–7, 591, indexed in Pubmed: [26519842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26519842/).
13. Nübling CM, Heiden M, Chudy M, et al. Experience of mandatory nucleic acid test (NAT) screening across all blood organizations in Germany: NAT yield versus breakthrough transmissions. *Transfusion*. 2009; 49(9): 1850–1858, doi: [10.1111/j.1537-2995.2009.02212.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02212.x), indexed in Pubmed: [19453976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19453976/).
14. Schmidt M, Korn K, Nübling CM, et al. First transmission of human immunodeficiency virus Type 1 by a cellular blood product after mandatory nucleic acid screening in Germany. *Transfusion*. 2009; 49(9): 1836–1844, doi: [10.1111/j.1537-2995.2009.02203.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02203.x), indexed in Pubmed: [19453990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19453990/).
15. Müller B, Nübling CM, Kress J, et al. How safe is safe: new human immunodeficiency virus Type 1 variants missed by nucleic acid testing. *Transfusion*. 2013; 53(10 Pt 2): 2422–2430, doi: [10.1111/trf.12298](https://doi.org/10.1111/trf.12298), indexed in Pubmed: [23782012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23782012/).
16. Chudy M, Weber-Schehl M, Pichl L, et al. Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus Type 1 may require two different amplification targets. *Transfusion*. 2012; 52(2): 431–439, doi: [10.1111/j.1537-2995.2011.03281.x](https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03281.x), indexed in Pubmed: [21810100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21810100/).