

cobas[®] HBV

Test quantitativo degli acidi nucleici per l'uso sui cobas[®] 6800/8800 Systems

Per uso diagnostico in vitro

cobas [®] HBV	P/N: 07000979190
cobas [®] HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	P/N: 06997767190
cobas [®] NHP Negative Control Kit	P/N: 07002220190

Indice generale

Uso previsto	4
Riassunto e spiegazione del test.....	4
Reagenti e materiali	7
Reagenti e controlli cobas ® HBV	7
Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni.....	10
Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti.....	11
Materiali aggiuntivi necessari	12
Strumentazione e software necessari	12
Precauzioni e requisiti per l'uso.....	13
Avvertimenti e precauzioni.....	13
Manipolazione dei reagenti.....	14
Buone pratiche di laboratorio.....	14
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni	14
Campioni.....	15
Istruzioni per l'uso.....	16
Note sulla procedura.....	16
Esecuzione del test cobas ® HBV.....	16
Risultati	17
Controllo di qualità e validità dei risultati	17
Interpretazione dei risultati	18
Limiti della procedura	18
Valutazione delle prestazioni non cliniche.....	19
Caratteristiche delle prestazioni	19
Limite di sensibilità (LoD).....	19
Intervallo lineare.....	21
Precisione intra-laboratorio	24

Determinazione e verifica del genotipo	25
Specificità.....	29
Specificità analitica	29
Specificità analitica e sostanze interferenti.....	29
Correlazione tra i metodi.....	31
Equivalenza tra matrici – Plasma EDTA e siero.....	32
Tasso globale d'errore del sistema	32
Contaminazione crociata.....	33
Informazioni supplementari.....	33
Caratteristiche del test	33
Produttore e distributori	35
Marchi e brevetti.....	35
Copyright.....	35
Bibliografia	36
Revisione del documento	38

Uso previsto

Il test cobas® HBV consente l'amplificazione *in vitro* degli acidi nucleici per la quantificazione del DNA del virus dell'epatite B (HBV) in siero o in plasma EDTA umano di soggetti con infezione da HBV.

Si tratta di un test utilizzato a sostegno del trattamento dei pazienti con infezione HBV cronica che sono sottoposti a terapia antivirale. Questo test può essere utilizzato per misurare i livelli di DNA di HBV in condizioni normali e durante la terapia, come ausilio nella valutazione della risposta alla terapia. I risultati generati dal test cobas® HBV devono essere interpretati contestualmente a tutti i dati clinici rilevanti e ai riscontri di laboratorio.

Riassunto e spiegazione del test

Premessa

L'HBV è uno dei virus che causano l'epatite virale. Oltre 2 miliardi di persone in tutto il mondo sono state infettate dal virus HBV e oltre 350 milioni sono portatori cronici.¹ Negli USA l'HBV è una delle principali cause di patologie epatiche, nonostante vi sia stato un calo dell'incidenza delle infezioni acute grazie alle vaccinazioni e all'adozione di precauzioni universali per l'uso degli aghi.² Negli USA si stima una prevalenza complessiva dell'infezione da HBV tra lo 0,3% e lo 0,5%, con un 47-70% di casi attribuiti a persone non originarie degli USA.² Alcuni programmi di screening mirato hanno evidenziato tassi di prevalenza superiori addirittura al 15% in alcune popolazioni di immigranti ad alto rischio.³ I pazienti con infezione cronica da HBV corrono rischi elevati di sviluppare complicazioni a lungo termine, tra cui epatite cronica, cirrosi e carcinoma epatocellulare.⁴⁻⁷ Marcatori sierologici vengono usati comunemente come indicatori diagnostici e/o prognostici di infezioni da HBV acute o croniche.⁸ Per quanto riguarda lo screening di routine dei soggetti ad alto rischio, negli USA i centri CDC (Centers for Disease Control and Prevention) raccomandano di estendere lo screening alle popolazioni tra le quali la prevalenza dell'antigene di superficie dell'HBV (HBsAg) è superiore al 2%, ad esempio popolazioni provenienti da regioni endemiche del mondo (come Asia e Africa), omosessuali di sesso maschile e tossicodipendenti che si iniettano.²

Il marcatore più comune dell'infezione da HBV è la presenza dell'HBsAg.⁸ Sebbene nei portatori possa verificarsi una clearance dell'HBsAg e possa svilupparsi l'anticorpo anti-HBsAg, questi soggetti rischiano comunque di sviluppare complicanze epatiche gravi in un momento successivo della loro vita.^{9,10} L'antigene HBe (HBeAg) è generalmente considerato un marcatore secondario di replicazione attiva dell'HBV, associato ad epatopatia progressiva. La mancata clearance dell'HBeAg sembra aumentare il rischio di epatopatia allo stadio terminale.^{9,10} I ceppi varianti dei mutanti pre-core dell'HBV possono perdere la capacità di produrre l'antigene HBeAg, anche in presenza di un'infezione attiva, ponendo limiti all'uso di questo marcatore per il monitoraggio della progressione della malattia.⁷

Perché utilizzare i test dell'HBV

È possibile quantificare il DNA dell'HBV in plasma EDTA e in siero applicando alcune tecnologie di amplificazione dell'acido nucleico, ad esempio la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR).¹¹⁻¹⁴ Molte linee guida suggeriscono l'uso della PCR real-time per la quantificazione del DNA dell'HBV perché questa metodologia è caratterizzata da una maggiore sensibilità e da un intervallo lineare più ampio.^{15,16}

Spiegazione del test

Il test quantitativo **cobas**® HBV può essere eseguito sul **cobas**® 6800 System e sul **cobas**® 8800 System. Il test **cobas**® HBV supporta la rilevazione e la quantificazione del DNA dell'HBV in plasma EDTA o in siero appartenenti a pazienti infetti e viene utilizzato nei laboratori di supporto alle sperimentazioni cliniche e nella routine clinica per la gestione dei pazienti con HBV. Viene utilizzata un'unica sonda per rilevare e quantificare, ma non per discriminare il genotipo A-H. La carica virale viene quantificata rispetto ad uno standard di quantificazione costituito da DNA non HBV (DNA-QS), che viene introdotto in ogni campione nella fase di preparazione. Il DNA-QS svolge inoltre un ruolo di controllo dell'intero processo di preparazione dei campioni e amplificazione PCR. Il test utilizza inoltre tre controlli esterni: un controllo positivo a titolo alto, un controllo positivo a titolo basso e un controllo negativo.

Principi della procedura

Il test **cobas**® HBV si basa su una procedura completamente automatizzata per la preparazione dei campioni (estrazione e purificazione degli acidi nucleici) e sulla successiva amplificazione e rilevazione mediante PCR. I **cobas**® 6800/8800 Systems sono costituiti dal modulo di inserimento dei campioni, dal modulo di trasferimento, dal modulo di preparazione e dal modulo analitico. La gestione automatica dei dati è svolta dal software **cobas**® 6800/8800, che assegna i seguenti risultati dei test: "target not detected" (target non rilevato), "< LLoQ" (minore del limite inferiore di quantificazione), "> ULoQ" (maggiore del limite superiore di quantificazione) o "HBV DNA detected" (DNA di HBV rilevato), un valore compreso nell'intervallo lineare "LLoQ < x < ULoQ. I risultati possono essere visualizzati direttamente sullo schermo del sistema, esportati o stampati in un report.

Gli acidi nucleici dei campioni dei pazienti, dei controlli esterni e delle molecole aggiunte di lambda DNA (DNA-QS) vengono estratti simultaneamente.

L'acido nucleico virale viene liberato aggiungendo nel campione la proteinasi e il reagente di lisi. L'acido nucleico liberato si lega quindi alla superficie di silice delle biglie di vetro magnetiche aggiunte. Le sostanze che non formano legami e le impurità (ad esempio le proteine denaturate, i detriti cellulari e i potenziali inibitori della PCR) vengono rimosse con il reagente di lavaggio nei passaggi successivi e l'acido nucleico purificato viene eluito dalle biglie di vetro magnetiche con il tampone di eluizione a temperature elevate.

È possibile ottenere l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target estratto dal campione utilizzando dei primer forward e reverse virus-specifici, che vengono selezionati da regioni altamente conservate dell'HBV. È possibile ottenere l'amplificazione selettiva dello standard di quantificazione DNA-QS utilizzando dei primer forward e reverse sequenza-specifici, che vengono selezionati in modo tale da non presentare nessuna omologia con il genoma dell'HBV. Un enzima DNA polimerasi termostabile viene utilizzato per l'amplificazione. La soluzione Master Mix contiene trifosfato di deossiuridina (dUTP) anziché trifosfato di deossitimidina (dTTP), che è incorporato nel DNA appena sintetizzato (amplicone).^{14,17,18} Tutti gli ampliconi contaminanti che sono stati prodotti da sessioni di PCR precedenti vengono eliminati dall'enzima AmpErase, che è contenuto nella miscela per PCR, durante il primo passaggio del ciclo termico. Gli ampliconi che si sono appena formati non vengono invece eliminati perché l'enzima AmpErase si inattiva dopo l'esposizione a temperature superiori a 55°C.

La soluzione Master Mix **cobas**® HBV contiene sonde di rilevazione che sono specifiche rispettivamente per la sequenza target dell'HBV e per l'acido nucleico QS. Ognuna delle sonde di rilevazione specifiche per HBV e DNA-QS è marcata con uno dei due fluorocromi univoci, che agiscono da rivelatori (reporter). Ogni sonda include anche un secondo fluorocromo, che agisce da soppressore (quencher). Poiché le misurazioni dei due fluorocromi reporter avvengono a lunghezze d'onda fisse, possono avere luogo la rilevazione e la discriminazione simultanee del target amplificato di HBV e di DNA-QS.^{12,13} Quando non è legato alla sequenza target, il segnale fluorescente della sonda intatta viene soppresso dal fluorocromo quencher. Nella fase di amplificazione mediante PCR, l'ibridizzazione delle sonde con lo stampo specifico di DNA a filamento unico determina la scissione della sonda ad opera dell'attività esonucleasica 5'→3' della DNA polimerasi, con la conseguente separazione dei fluorocromi reporter e quencher e la produzione di un segnale fluorescente. Ad ogni ciclo di PCR vengono generate quantità crescenti di sonde scisse e, in concomitanza, il segnale cumulativo del fluorocromo reporter aumenta. Poiché le misurazioni dei due fluorocromi reporter avvengono a lunghezze d'onda fisse, possono avere luogo la rilevazione e la discriminazione simultanee del target amplificato di HBV e di DNA-QS.

Reagenti e materiali

Reagenti e controlli cobas® HBV

Tutti i reagenti e i controlli non ancora aperti devono essere conservati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 1 alla Tabella 4.

Tabella 1 cobas® HBV

cobas® HBV		
Conservare a 2-8°C Cassetta per 96 test (P/N 07000979190)		
Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit 96 test
Soluzione proteinasi (PASE)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, cloruro di calcio, acetato di calcio, 8% proteinasi EUH210: Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta. EUH208: Può provocare una reazione allergica. Contiene: Subtilisina, 9014-01-1	13 ml
Standard di quantificazione DNA (DNA-QS)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% Costrutto di DNA non HBV contenente una regione di legame per il primer non HBV e una regione di legame univoca per la sonda (DNA non infettivo), 0,002% Poly rA RNA (sintetico), < 0,1% sodio azide	13 ml
Tampone di eluizione (EB)	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	13 ml
Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	5,5 ml
HBV Master Mix Reagente 2 (HBV MMX-R2)	Tampone tricina, acetato di potassio, 18% dimetil sulfoxide, glicerolo, < 0,1% Tween 20, EDTA, < 0,12% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01% primer upstream e downstream HBV, < 0,01% primer forward e reverse QS, < 0,01% sonde oligonucleotidiche fluorescenti specifiche per HBV e per QS di HBV, < 0,01% aptamero oligonucleotidico, < 0,01% DNA polimerasi Z05D, < 0,10% enzima AmpErase (uracil-N-glicosilasi) (batterico), < 0,1% sodio azide	6 ml

Tabella 2 cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit

cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit

Conservare a 2–8°C
(P/N: 06997767190)

Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento
Controllo positivo basso HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 L(+))C)	<p>< 0,001% RNA di HIV-1 gruppo M incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago MS2, < 0,001% DNA sintetico (plasmide) di HBV incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago Lambda, < 0,001% RNA sintetico (armored) di HCV incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago MS2, plasma umano normale, non reattivo in base ai test brevettati per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, HBsAg, anti-HBc; RNA di HIV-1, RNA di HIV-2, RNA di HCV, DNA di HBV, RNA di HEV, RNA di WNV e DNA di CMV non rilevabili con i metodi PCR.</p> <p>0,1% Conservante ProClin® 300</p>	5,2 ml (8 x 0,65 ml)	  <p>Avvertimento</p> <p>H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.</p> <p>P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/ i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.</p> <p>P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.</p> <p>P280: Indossare guanti protettivi.</p> <p>P302 + P352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE, lavare abbondantemente con acqua e sapone.</p> <p>P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.</p> <p>P363: Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.</p>
Controllo positivo alto HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 H(+))C)	<p>< 0,001% RNA sintetico (armored), ad alto titolo, di HIV-1 gruppo M incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago MS2, < 0,001% DNA sintetico (plasmide) di HBV incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago Lambda, < 0,001% RNA sintetico (armored) di HCV incapsulato in proteina di rivestimento del batteriofago MS2, plasma umano normale, non reattivo in base ai test brevettati per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, HBsAg, anti-HBc; RNA di HIV-1, RNA di HIV-2, RNA di HCV, DNA di HBV, RNA di HEV, RNA di WNV e DNA di CMV non rilevabili con i metodi PCR.</p> <p>0,1% Conservante ProClin® 300</p>	5,2 ml (8 x 0,65 ml)	  <p>Avvertimento</p> <p>H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.</p> <p>P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/ i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.</p> <p>P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.</p> <p>P280: Indossare guanti protettivi.</p> <p>P302 + P352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE, lavare abbondantemente con acqua e sapone.</p> <p>P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.</p> <p>P363: Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.</p>

Tabella 3 cobas® NHP Negative Control Kit**cobas® NHP Negative Control Kit**

Conservare a 2-8°C
(P/N 07002220190)

Componenti del kit	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento
Controllo negativo di plasma umano normale (NHP-NC)	<p>Plasma umano normale, non reattivo ai test validati per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, HBsAg, anti-HBc; RNA di HIV-1, RNA di HIV-2, RNA di HCV, DNA di HBV, RNA di HEV, RNA di WNV e DNA di CMV non rilevabili con i metodi PCR.</p> <p>< 0,1% Conservante ProClin® 300</p>	<p>16 ml (16 x 1 ml)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p>Avvertimento</p> <p>H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.</p> <p>P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.</p> <p>P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.</p> <p>P280: Indossare guanti protettivi.</p> <p>P302 + P352: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE, lavare abbondantemente con acqua e sapone.</p> <p>P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.</p> <p>P363: Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.</p>

Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni

Tabella 4 Reagenti **cobas omni** per la preparazione dei campioni*

Reagenti	Ingredienti del reagente	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento
cobas omni MGP Reagent (MGP) Conservare a 2–8°C (P/N: 06997546190)	Biglie di vetro magnetiche, tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	480 test	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservare a 2–8°C (P/N: 06997511190)	Tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	4 x 875 ml	Non applicabile
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservare a 2–8°C (P/N: 06997538190)	42,56% (p/p) guanidina tiocianato, 5% (p/v) polidocanolo, 2% (p/v) ditiotreitolo, citrato di sodio diidrato	4 x 875 ml	 <p>Pericolo</p> <p>H302: Nocivo per ingestione.</p> <p>H318: Provoca gravi lesioni oculari.</p> <p>H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.</p> <p>EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici.</p> <p>P301 + P312: IN CASO DI INGESTIONE: in caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.</p> <p>P264: Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.</p> <p>P270: Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.</p> <p>P273: Non disperdere nell'ambiente.</p> <p>P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/il viso.</p> <p>P305 + P351 + P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.</p> <p>P310: In caso di malessere, contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.</p> <p>P330: Sciacquare la bocca.</p>
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservare a 15–30°C (P/N: 06997503190)	Citrato di sodio diidrato, 0,1% metil-4 idrossibenzoato	4,2 litri	Non applicabile

* Questi reagenti non sono inclusi nel kit del test **cobas**® HBV. Consultare l'elenco dei materiali aggiuntivi necessari (Tabella 7).

Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti

I reagenti devono essere conservati e manipolati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 5 alla Tabella 6.

I reagenti che non sono ancora stati caricati sui cobas® 6800/8800 Systems devono essere conservati alla temperatura indicata nella Tabella 5.

Tabella 5 Conservazione dei reagenti (non ancora caricati sul sistema)

Reagente	Temperatura di conservazione
cobas® HBV	2-8°C
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	2-8°C
cobas® NHP Negative Control Kit	2-8°C
cobas omni Lysis Reagent	2-8°C
cobas omni MGP Reagent	2-8°C
cobas omni Specimen Diluent	2-8°C
cobas omni Wash Reagent	15-30°C

Dopo il caricamento sui cobas® 6800/8800 Systems, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la data di scadenza viene monitorata dal sistema. I cobas® 6800/8800 Systems consentono l'uso dei reagenti solo se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 6. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. La Tabella 6 fornisce all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per i cobas® 6800/8800 Systems.

Tabella 6 Scadenza dei reagenti sui cobas® 6800/8800 Systems

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo (tempo cumulativo a bordo fuori dal frigorifero)
cobas® HBV	Data non superata	30 giorni dal primo utilizzo	Max 10 sedute	Max 8 ore
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	Data non superata	Non applicabile	Non applicabile	Max 8 ore
cobas® NHP Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile	Non applicabile	Max 10 ore
cobas omni Lysis Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni MGP Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Specimen Diluent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile
cobas omni Wash Reagent	Data non superata	30 giorni dal caricamento*	Non applicabile	Non applicabile

* Il calcolo inizia dalla prima volta che il reagente viene caricato sui cobas® 6800/8800 Systems.

Materiali aggiuntivi necessari

Tabella 7 Materiali e consumabili da utilizzare sui **cobas®** 6800/8800 Systems

Materiale	P/N
cobas omni Processing Plate	05534917001
cobas omni Amplification Plate	05534941001
cobas omni Pipette Tips	05534925001
cobas omni Liquid Waste Container	07094388001
cobas omni Lysis Reagent	06997538190
cobas omni MGP Reagent	06997546190
cobas omni Specimen Diluent	06997511190
cobas omni Wash Reagent	06997503190
Sacchetto per rifiuti solidi	07435967001
Contenitore per rifiuti solidi	07094361001

Strumentazione e software necessari

Il software **cobas®** 6800/8800 e il pacchetto di analisi **cobas®** HBV verranno installati sullo strumento (o sugli strumenti).
Il server IG (Instrument Gateway) verrà fornito con il sistema.

Tabella 8 Strumentazione

Apparecchiatura	P/N
cobas® 6800 System (opzione mobile)	05524245001 e 06379672001
cobas® 6800 System (fisso)	05524245001 e 06379664001
cobas® 8800 System	05412722001
Modulo di inserimento dei campioni	06301037001

Per ulteriori informazioni sui tubi primari e secondari compatibili con gli strumenti, consultare il Manuale Operatore dei **cobas®** 6800/8800 Systems.

Nota: contattare il rappresentante Roche locale per richiedere un listino dettagliato dei rack per campioni, dei rack per puntali otturati e dei vassoi portarack accettati dagli strumenti.

Precauzioni e requisiti per l'uso

Avvertimenti e precauzioni

Come richiesto per qualsiasi procedura di analisi, per lo svolgimento di questo test è necessario attenersi alle buone pratiche di laboratorio. Data l'elevata sensibilità di questo test, fare attenzione ad evitare la contaminazione dei reagenti e delle miscele di amplificazione.

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Il test **cobas**® HBV non è stato valutato per l'uso come test di screening per la presenza dell'HBV nel sangue o negli emoderivati o come test diagnostico di conferma della presenza di un'infezione da HBV.
- Tutti i campioni dei pazienti devono essere manipolati come materiale a rischio biologico, seguendo le buone procedure di laboratorio descritte in Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e nel documento M29-A4 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).^{19,20} Questa procedura deve essere eseguita esclusivamente da personale esperto nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test **cobas**® HBV e dei **cobas**® 6800/8800 Systems.
- Tutti i materiali di origine umana devono essere considerati a rischio biologico e quindi manipolati adottando precauzioni universalmente valide. In caso di fuoriuscita accidentale, disinfettare immediatamente l'area con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio allo 0,5% in acqua distillata o deionizzata (diluire la candeggina domestica 1:10) oppure seguire le procedure previste dal proprio laboratorio.
- I prodotti **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit e **cobas**® NHP Negative Control Kit contengono plasma derivato da sangue umano. Il materiale di provenienza è stato analizzato con test degli anticorpi validati ed è risultato non reattivo agli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, HBsAg e anti-HBc. I test basati sui metodi PCR eseguiti sul plasma umano normale hanno inoltre confermato l'assenza di RNA di HIV-1 (gruppi M e O), RNA di HIV-2, RNA di HCV, DNA di HBV, RNA di HEV, RNA di WNV e DNA di CMV. Allo stato attuale, tuttavia, nessun metodo di analisi garantisce con assoluta certezza che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano agenti infettivi.
- **Non congelare il sangue intero o i campioni conservati in tubi primari.**
- Per garantire prestazioni ottimali del test, utilizzare soltanto i consumabili forniti o consigliati.
- Le schede di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) possono essere richieste al rappresentante Roche locale.
- Per un corretto svolgimento del test, attenersi scrupolosamente alle procedure e alle linee guida approvate. Qualunque deviazione dalle procedure e dalle linee guida approvate potrebbe compromettere le prestazioni del test.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione dell'effetto carryover durante la manipolazione e la preparazione dei campioni.

Manipolazione dei reagenti

- Manipolare tutti i reagenti, i controlli e i campioni seguendo le buone pratiche di laboratorio, al fine di prevenire il carryover dei campioni e dei controlli.
- Prima dell'uso ispezionare visivamente ogni cassetta dei reagenti, del diluente, del reagente di lisi e del reagente di lavaggio per confermare l'assenza di perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.
- Il reagente di lisi **cobas omni** contiene guanidina tiocianato, una sostanza chimica potenzialmente pericolosa. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni.
- Il kit di test **cobas**® HBV, **cobas omni** MGP Reagent e **cobas omni** Specimen Diluent contengono sodio azide come conservante. Evitare che i reagenti entrino in contatto con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita dei reagenti, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- Evitare che il reagente di lisi **cobas omni**, contenente guanidina tiocianato, entri in contatto con la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina). L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.
- Smaltire tutti i materiali entrati in contatto con i campioni e i reagenti nel rispetto dei regolamenti previsti a livello locale, nazionale e internazionale.

Buone pratiche di laboratorio

- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro designate.
- Indossare guanti, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit. Per prevenire eventuali contaminazioni, è necessario sostituire i guanti durante la manipolazione dei campioni, dei kit **cobas**® HBV e dei reagenti **cobas omni**. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli.
- Lavare accuratamente le mani dopo avere manipolato i reagenti dei kit e dopo aver rimosso i guanti.
- Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro del laboratorio con una soluzione fresca a base di ipoclorito di sodio allo 0,5% e acqua deionizzata o distillata (candeggina per uso domestico diluita 1:10). Successivamente pulire la superficie con etanolo al 70%.
- In caso di fuoriuscita di liquidi sui **cobas**® 6800/8800 Systems, seguire le istruzioni contenute nel Manuale Operatore dei **cobas**® 6800/8800 Systems per pulire accuratamente e decontaminare la superficie degli strumenti.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

Nota: manipolare tutti i campioni e i controlli come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi.

Conservare tutti i campioni alle temperature indicate.

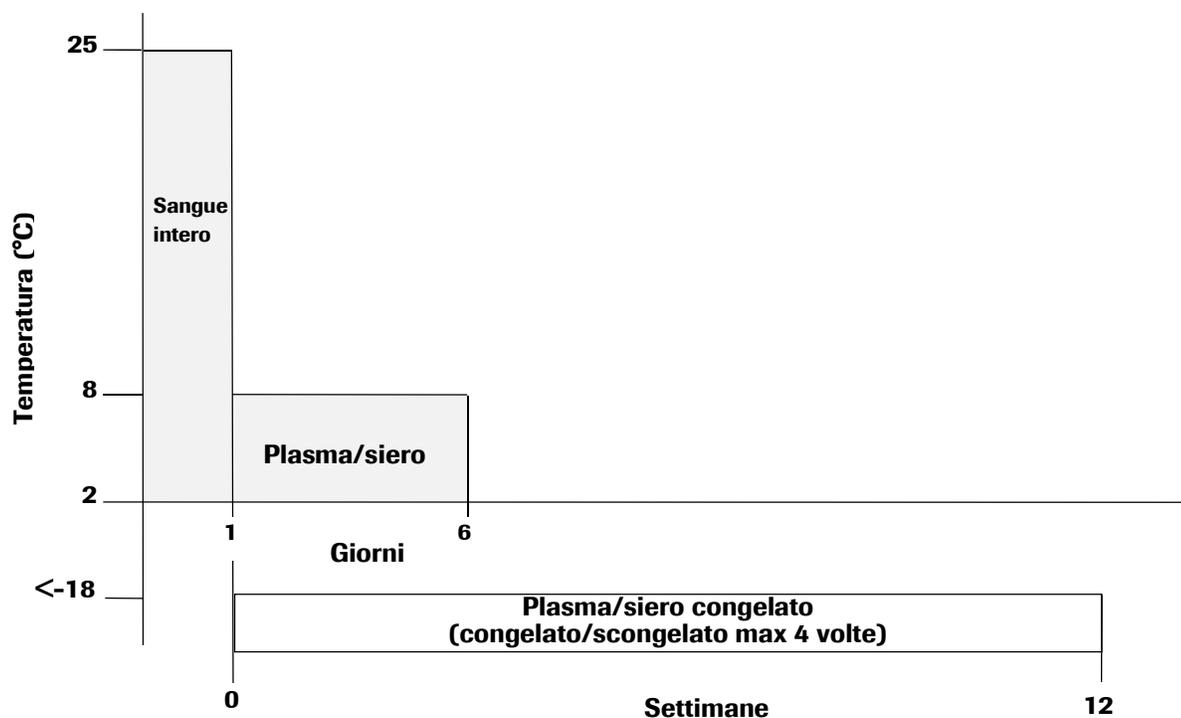
La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.

Se si utilizzano campioni congelati in tubi secondari, mantenere i campioni a temperatura ambiente (15-30°C) finché non si saranno scongelati completamente, quindi centrifugare in modo che tutto il volume del campione si depositi sul fondo della provetta.

Campioni

- Raccogliere il sangue nelle provette SST™ destinate alla separazione di siero, nelle provette BD Vacutainer® PPT™ destinate alla preparazione di plasma per i metodi di analisi di diagnostica molecolare, oppure in provette sterili con l'anticoagulante EDTA. Attenersi alle istruzioni fornite dal produttore delle provette. Vedere la Figura 1.
- Il sangue intero raccolto nelle provette SST™ destinate alla separazione di siero, nelle provette BD Vacutainer® PPT™ destinate alla preparazione di plasma per i metodi di analisi di diagnostica molecolare oppure nelle provette sterili con l'anticoagulante EDTA può essere conservato e/o trasportato fino a 24 ore tra 2°C e 25°C prima della preparazione del plasma. Per la centrifugazione, seguire le istruzioni fornite dal produttore.
- Dopo la separazione, i campioni di plasma/siero possono essere conservati fino a 6 giorni a 2-8°C o fino a 12 settimane a ≤ -18°C.
- Per la conservazione fino a 6 mesi, si consigliano temperature ≤ -60°C.
- I campioni di plasma/siero sono stabili per un massimo di quattro cicli di congelamento/scongelo quando sono congelati a ≤ -18°C.

Figura 1 Condizioni di conservazione dei campioni



- Per un'eventuale spedizione, imballare ed etichettare i campioni come previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni e agenti eziologici.

Istruzioni per l'uso

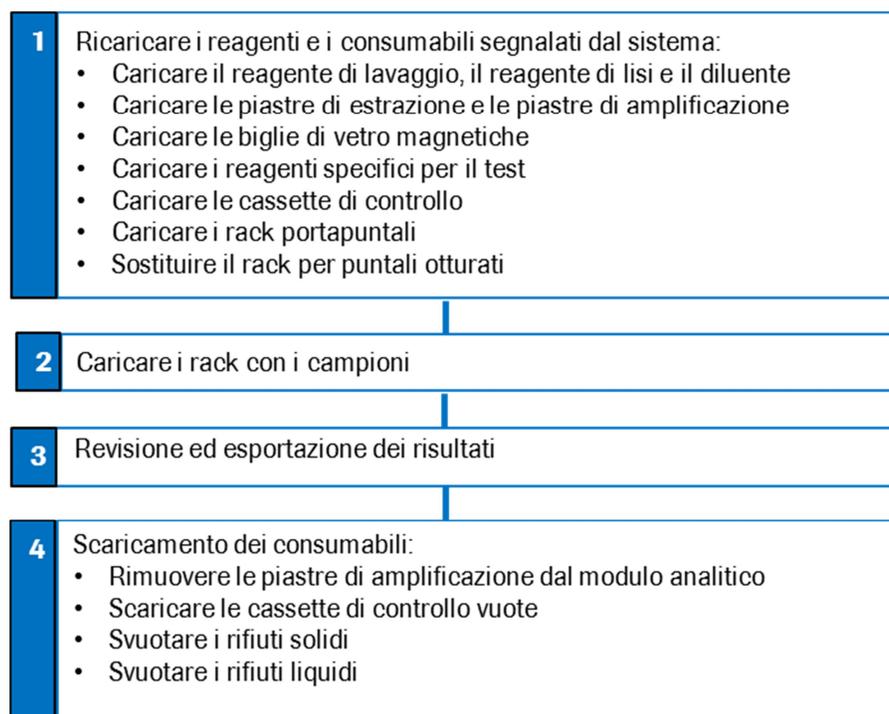
Note sulla procedura

- Non utilizzare i reagenti del test **cobas**® HBV, **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, **cobas**® NHP Negative Control Kit e i reagenti **cobas** **omni** oltre la data di scadenza.
- Non riutilizzare i consumabili. Sono esclusivamente monouso.
- Per informazioni sulla corretta manutenzione degli strumenti, consultare il Manuale Operatore dei **cobas**® 6800/8800 Systems.

Esecuzione del test **cobas**® HBV

È possibile eseguire il test **cobas**® HBV con due diversi volumi minimi di campione: 350 µl (per il flusso di lavoro con 200 µl di campione) o 650 µl (per il flusso di lavoro con 500 µl di campione). La procedura del test è descritta dettagliatamente nel Manuale Operatore dei **cobas**® 6800/8800 Systems. Nella Figura 2 è illustrata una sintesi della procedura.

Figura 2 Procedura del test **cobas**® HBV



Risultati

I cobas® 6800/8800 Systems rilevano automaticamente la concentrazione del DNA di HBV per campioni e controlli. La concentrazione del DNA di HBV si esprime in unità internazionali per millilitro (UI/ml).

Controllo di qualità e validità dei risultati

- In ogni batch vengono inclusi un controllo negativo [(-) C] e due controlli positivi: un controllo positivo basso [HBV L(+)C] e un controllo positivo alto [HBV H(+)C].
- Nel software **cobas**® 6800/8800 e/o nel report verificare se sono presenti flag e risultati ad essi associati per confermare la validità del batch.
- Il batch è valido se non viene generato nessun flag per i tre controlli, che includono un controllo negativo e due controlli positivi: HBV L(+)C, HBV H(+)C. Il risultato del controllo negativo è visualizzato come (-) C e i controlli positivi alto e basso sono visualizzati come HxV L(+)C e HxV H(+)C.

I risultati vengono automaticamente considerati non validi dal software **cobas**® 6800/8800 in caso di fallimento del controllo negativo e dei controlli positivi.

Flag dei controlli

Tabella 9 Flag per i controlli positivi e negativi

Controllo negativo	Flag	Risultato	Interpretazione
(-) C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Invalid	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo negativo non è negativo.
Controllo positivo	Flag	Risultato	Interpretazione
HxV L(+)C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Invalid	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo basso non rientra nell'intervallo assegnato.
HxV H(+)C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Invalid	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo alto non rientra nell'intervallo assegnato.

Se il batch non è valido, è necessario ripetere il test sull'intero batch, compresi campioni e controlli.

Nel software **cobas**® 6800/8800, la sigla HxV L(+)C significa controllo positivo basso **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 e la sigla HxV H(+)C significa controllo positivo alto **cobas**® HBV/HCV/HIV-1.

Interpretazione dei risultati

Se un batch è valido, verificare nel software **cobas**® 6800/8800 e/o nel report se sono presenti flag per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- Un batch valido può includere risultati dei campioni validi e non validi.

Tabella 10 Risultati per i singoli target e relativa interpretazione

Risultati	Interpretazione
Target Not Detected	DNA di HBV non rilevato. Segnalare i risultati nel report come "HBV non rilevato".
< Titer Min	Il titolo calcolato è al di sotto del limite inferiore di quantificazione (LLoQ) del saggio. Segnalare i risultati nel report come "HBV rilevato, minore di (Titer Min)" Titer min = 10 UI/ml (se il volume di analisi è di 500 µl) Titer min = 25 UI/ml (se il volume di analisi è di 200 µl)
Titolo	Il titolo calcolato rientra nell'intervallo lineare del saggio: maggiore o uguale al valore "Titer Min" e minore o uguale al valore "Titer Max". Segnalare i risultati nel report come "(Titolo) di HBV rilevato".
> Titer Max ^a	Il titolo calcolato è al di sopra del limite superiore di quantificazione (ULoQ) del saggio. Segnalare i risultati nel report come "HBV rilevato, maggiore di (Titer Max)". Titer max = 1,00E+09 UI/ml (500 µl e 200 µl)

^a Se il risultato del campione è "> Titer Max", si riferisce ai campioni HBV-positivi con titoli al di sopra del limite di quantificazione superiore (ULoQ). Se si desidera ottenere un risultato quantitativo, diluire il campione originale in plasma EDTA o in siero HBV-negativo (a seconda del tipo di campione di partenza) quindi ripetere il test. Moltiplicare il risultato ottenuto per il fattore di diluizione.

Limiti della procedura

- Il test **cobas**® HBV è stato valutato soltanto in associazione con i prodotti **cobas**® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, **cobas**® NHP Negative Control Kit, **cobas omni** MGP Reagent, **cobas omni** Lysis Reagent, **cobas omni** Specimen Diluent e **cobas omni** Wash Reagent per l'uso sui **cobas**® 6800/8800 Systems.
- L'affidabilità dei risultati è influenzata dal metodo di raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.
- Questo test è stato approvato esclusivamente per l'uso con campioni di siero e plasma EDTA. L'uso del test con altri tipi di campioni può generare risultati non accurati.
- La quantificazione del DNA di HBV dipende dal numero di particelle virali presenti nei campioni e può essere influenzata dal metodo di prelievo del campione, da fattori legati al paziente (ad esempio, età e presenza di sintomi) e/o dallo stadio dell'infezione.
- Anche se rare, le mutazioni nelle regioni altamente conservate di un genoma virale coperte dal test **cobas**® HBV possono alterare i legami dei primer e/o delle sonde e causare una quantificazione per difetto del virus o impedire l'identificazione del virus.
- A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, è consigliabile che gli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, svolgano studi sulla correlazione tra i metodi nei propri laboratori allo scopo di qualificare tali differenze. Si consiglia agli utenti di elaborare norme/procedure specifiche.
- Il test **cobas**® HBV non è destinato all'uso per lo screening della presenza dell'HBV nel sangue o negli emoderivati o come test diagnostico per confermare la presenza di un'infezione da HBV.

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Caratteristiche delle prestazioni

Limite di sensibilità (LoD)

Standard Internazionale OMS

Per determinare il limite di sensibilità del test **cobas**® HBV è stato utilizzato lo Standard Internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità per il DNA del virus dell'epatite B destinato ai test basati sulla tecnologia di amplificazione dell'acido nucleico (2°Standard Internazionale OMS), genotipo A, ottenuto dal NIBSC. Lo standard è stato diluito in serie in campioni di siero e plasma EDTA umano HBV-negativo, per volumi di analisi di 500 µl e 200 µl. I pannelli, costituiti da un campione negativo più otto livelli di concentrazione per il volume di analisi di 500 µl o più nove livelli di concentrazione per il volume di analisi di 200 µl, sono stati analizzati con tre lotti di reagenti del test **cobas**® HBV, utilizzando più sedute, più giorni, più operatori e più strumenti.

I risultati relativi ai campioni di siero e plasma EDTA nei due volumi preparati sono riportati rispettivamente nella Tabella 11 e nella Tabella 14. Per quanto riguarda il plasma EDTA, lo studio dimostra che il test **cobas**® HBV rileva il DNA di HBV a una concentrazione di 3 UI/ml, con un tasso di successo $\geq 95\%$, per 500 µl di volume e a una concentrazione di 17,5 UI/ml, con un tasso di successo $\geq 95\%$, per 200 µl di volume. Per quanto riguarda il siero, lo studio dimostra che il test **cobas**® HBV rileva il DNA di HBV a una concentrazione di 3 UI/ml, con un tasso di successo $\geq 95\%$, per 500 µl di volume e a una concentrazione di 15 UI/ml, con un tasso di successo $\geq 95\%$, per 200 µl di volume.

Tabella 11 Limite di sensibilità per il plasma EDTA (500 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di HBV)	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo %
20,0	189	189	100,00
10,0	189	189	100,00
8,0	189	189	100,00
6,0	189	189	100,00
5,0	189	188	99,47
4,0	189	185	97,88
3,0	189	183	96,83
2,0	189	166	87,83
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	2,7 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 2,4-3,1 UI/ml		

Tabella 12 Limite di sensibilità per il siero (500 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di HBV)	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo %
20,0	189	189	100,00
10,0	189	189	100,00
8,0	189	189	100,00
6,0	189	189	100,00
5,0	189	188	99,47
4,0	189	186	98,41
3,0	189	187	98,94
2,0	189	172	91,01
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	2,4 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 2,0-2,7 UI/ml		

Tabella 13 Limite di sensibilità per il plasma EDTA (200 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di HBV)	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo %
50,0	189	189	100,00
30,0	189	189	100,00
25,0	189	188	99,47
20,0	189	189	100,00
17,5	189	182	96,30
15,0	189	179	94,71
12,5	189	170	89,95
10,0	189	142	75,13
5,0	189	87	46,03
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	15,5 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 14,4-16,9 UI/ml		

Tabella 14 Limite di sensibilità per il siero (200 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di HBV)	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo %
50,0	189	189	100,00
30,0	189	189	100,00
25,0	189	189	100,00
20,0	189	187	98,94
17,5	189	189	100,00
15,0	189	184	97,35
12,5	189	174	92,06
10,0	189	170	89,95
5,0	189	107	56,61
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	12,5 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 11,6-13,8 UI/ml		

Intervallo lineare

Lo studio di linearità del test **cobas**® HBV è stato eseguito utilizzando una serie di diluizioni costituita da un pannello di 15 campioni, rappresentativi dell'intero intervallo lineare previsto per il genotipo predominante (GT A). Nel pannello, i campioni con titolo alto sono stati preparati a partire da uno stock di DNA plasmide di HBV positivo con titolo alto e i campioni con titolo basso sono stati preparati a partire da un campione clinico. Il pannello dello studio di linearità è stato concepito prevedendo una sovrapposizione del titolo di 2 log₁₀ circa tra i due materiali di origine. L'intervallo lineare atteso per il test **cobas**® HBV era compreso tra un limite minimo LLoQ (10 UI/ml per 500 µl di volume e 25 UI/ml per 200 µl di volume) e un limite massimo ULoQ (1,00E+09 UI/ml). Il pannello dello studio di linearità è stato concepito tenendo conto di una concentrazione inferiore al limite minimo LLoQ (ad esempio, 7,5 UI/ml) e di una concentrazione superiore al limite massimo ULoQ (ad esempio, 2,0E+09 UI/ml) e includendo alcune concentrazioni significative per decisioni mediche. Inoltre il pannello dello studio di linearità supporta parzialmente incrementi di 1,0 log₁₀ lungo tutto l'intervallo lineare. Per ogni campione del pannello sono state indicate la concentrazione nominale in UI/ml e l'origine del DNA di HBV.

Con 500 µl di volume, il test **cobas**® HBV è lineare per il plasma EDTA e per il siero tra 10 UI/ml e 1,00E+09 UI/ml, con una deviazione assoluta dalla regressione nonlineare di migliore adattamento inferiore a ± 0,2 log₁₀. Lungo l'intervallo lineare, l'accuratezza del test è compresa entro ± 0,24 log₁₀.

Con 200 µl di volume, il test **cobas**® HBV è lineare per il plasma EDTA e per il siero tra 25 UI/ml e 1,00E+09 UI/ml, con una deviazione assoluta dalla regressione nonlineare di migliore adattamento inferiore a ± 0,2 log₁₀. Lungo l'intervallo lineare, l'accuratezza del test è compresa entro ± 0,24 log₁₀.

Per una rappresentazione dei risultati, vedere dalla Figura 3 alla Figura 6.

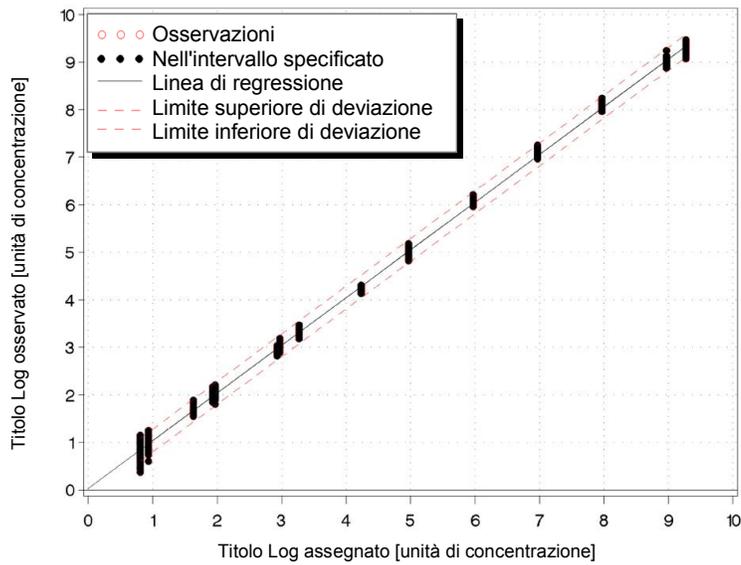
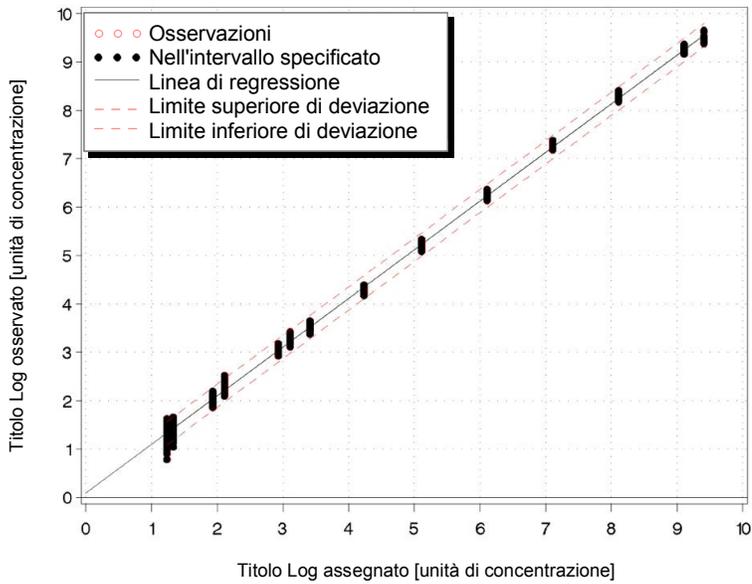
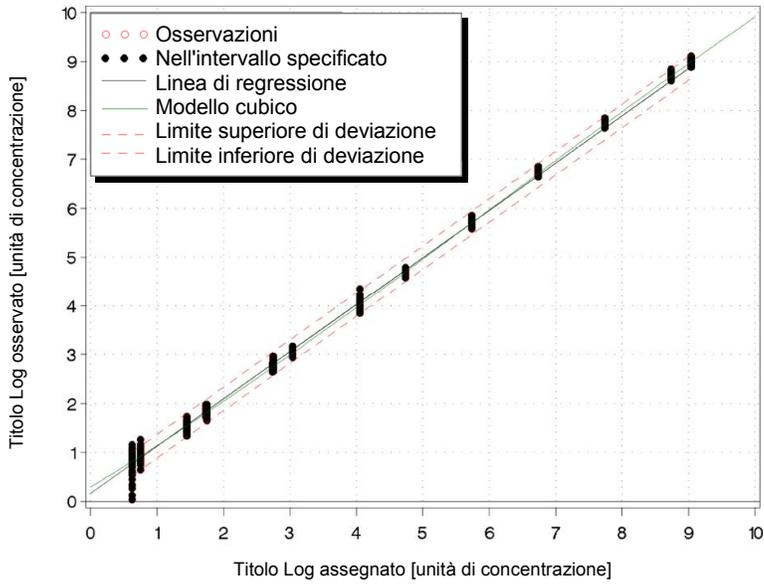
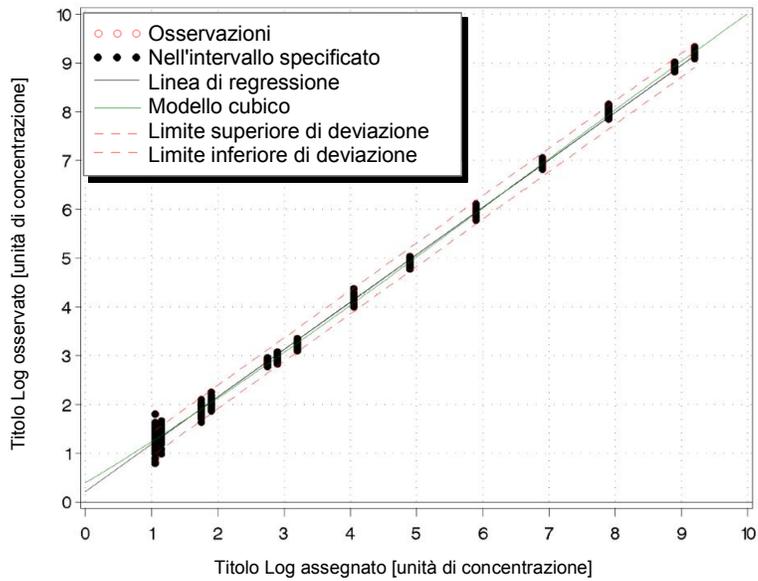
Figura 3 Definizione dell'intervallo lineare per il plasma EDTA (500 µl)**Figura 4** Definizione dell'intervallo lineare per il plasma EDTA (200 µl)

Figura 5 Definizione dell'intervallo lineare per il siero (500 µl)**Figura 6** Definizione dell'intervallo lineare per il siero (200 µl)

Precisione intra-laboratorio

La precisione del test **cobas**® HBV è stata determinata analizzando diluizioni seriali di campioni clinici (CS) di HBV (Genotipo A) o di DNA plasmide di HBV in plasma EDTA o in siero HBV-negativo. Sono stati analizzati 10-12 livelli di diluizione con 48 ripetizioni per livello, tre lotti di reagenti del test **cobas**® HBV, tre strumenti e tre operatori per 12 giorni. Ogni campione è stato sottoposto all'intera procedura prevista per il test **cobas**® HBV, che è completamente automatizzata sui **cobas**® 6800/8800 Systems. La precisione riferita in questa sede è dunque rappresentativa di tutti gli aspetti della procedura del test. I risultati sono illustrati dalla Tabella 15 alla Tabella 18.

Il test **cobas**® HBV ha assicurato un'elevata precisione con i tre lotti di reagenti utilizzati, su un intervallo di concentrazioni compreso tra 5,00E+01 UI/ml e 1,0E+09 UI/ml per 500 µl di volume e tra 1,00E+02 UI/ml e 1,0E+08 UI/ml (plasma EDTA) e 1,0E+09 UI/ml (siero) per 200 µl di volume.

Tabella 15 Precisione intra-laboratorio del test **cobas**® HBV (campioni di plasma EDTA - volume di analisi 500 µl)*

Concentrazione nominale (UI/ml)	Concentrazione assegnata (UI/ml)	Materiale di origine	Plasma EDTA			
			Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
			DS	DS	DS	DS in pool
1,00E+09	9,32E+08	DNA plasmide	0,04	0,07	0,09	0,07
1,00E+08	9,32E+07	DNA plasmide	0,04	0,08	0,05	0,06
1,00E+07	9,32E+06	DNA plasmide	0,06	0,05	0,04	0,05
1,00E+06	9,32E+05	DNA plasmide	0,06	0,07	0,04	0,06
1,00E+05	9,32E+04	DNA plasmide	0,06	0,06	0,07	0,06
2,00E+04	1,71E+04	Campione clinico	0,05	0,03	0,03	0,04
2,00E+03	1,86E+03	DNA plasmide	0,05	0,04	0,07	0,05
1,00E+03	8,54E+02	Campione clinico	0,04	0,05	0,04	0,04
1,00E+03	9,32E+02	DNA plasmide	0,06	0,06	0,05	0,06
1,00E+02	8,54E+01	Campione clinico	0,07	0,08	0,07	0,07
1,00E+02	9,32E+01	DNA plasmide	0,10	0,08	0,09	0,09
5,00E+01	4,27E+01	Campione clinico	0,09	0,04	0,08	0,08

* I dati dei titoli sono considerati come distribuiti secondo una curva log-normale e sono analizzati secondo la trasformazione \log_{10} .

Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione Log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

Tabella 16 Precisione intra-laboratorio del test **cobas**® HBV (siero - volume di analisi 500 µl)*

Concentrazione nominale (UI/ml)	Concentrazione assegnata (UI/ml)	Materiale di origine	Siero			
			Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
			DS	DS	DS	DS in pool
1,00E+09	5,47E+08	DNA plasmide	0,05	0,06	0,03	0,05
1,00E+08	5,47E+07	DNA plasmide	0,03	0,04	0,03	0,04
1,00E+07	5,47E+06	DNA plasmide	0,05	0,05	0,03	0,05
1,00E+06	5,47E+05	DNA plasmide	0,04	0,06	0,06	0,05
1,00E+05	5,47E+04	DNA plasmide	0,04	0,03	0,03	0,04
2,00E+04	1,12E+04	Campione clinico	0,10	0,07	0,08	0,08
2,00E+03	1,09E+03	DNA plasmide	0,05	0,05	0,03	0,05
1,00E+03	5,62E+02	Campione clinico	0,03	0,14	0,03	0,09
1,00E+03	5,47E+02	DNA plasmide	0,04	0,05	0,04	0,04
1,00E+02	5,62E+01	Campione clinico	0,09	0,06	0,07	0,07
1,00E+02	5,47E+01	DNA plasmide	0,05	0,07	0,04	0,06
5,00E+01	2,81E+01	Campione clinico	0,07	0,06	0,10	0,08

* I dati dei titoli sono considerati come distribuiti secondo una curva log-normale e sono analizzati secondo la trasformazione \log_{10} .

Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione Log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

Tabella 17 Precisione intra-laboratorio del test cobas® HBV (campioni di plasma EDTA – volume di analisi 200 µl)*

Concentrazione nominale (UI/ml)	Concentrazione assegnata (UI/ml)	Materiale di origine	Plasma EDTA			
			Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
			DS	DS	DS	DS in pool
1,00E+08	1,28E+08	DNA plasmide	0,04	0,05	0,03	0,04
1,00E+07	1,28E+07	DNA plasmide	0,06	0,04	0,02	0,04
1,00E+06	1,28E+06	DNA plasmide	0,03	0,04	0,04	0,03
1,00E+05	1,28E+05	DNA plasmide	0,02	0,06	0,05	0,05
2,00E+04	1,71E+04	Campione clinico	0,03	0,05	0,03	0,04
2,00E+03	2,57E+03	DNA plasmide	0,05	0,06	0,05	0,05
1,00E+03	8,54E+02	Campione clinico	0,07	0,05	0,03	0,05
1,00E+03	1,28E+03	DNA plasmide	0,06	0,07	0,03	0,05
1,00E+02	8,54E+01	Campione clinico	0,09	0,09	0,07	0,09
1,00E+02	1,28E+02	DNA plasmide	0,06	0,09	0,11	0,09

* I dati dei titoli sono considerati come distribuiti secondo una curva log-normale e sono analizzati secondo la trasformazione log₁₀.
Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione Log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

Tabella 18 Precisione intra-laboratorio del test cobas® HBV (siero – volume di analisi 200 µl)*

Concentrazione nominale (UI/ml)	Concentrazione assegnata (UI/ml)	Materiale di origine	Siero			
			Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	Tutti i lotti
			DS	DS	DS	DS in pool
1,00E+09	7,92E+08	DNA plasmide	0,04	0,03	0,03	0,04
1,00E+08	7,92E+07	DNA plasmide	0,07	0,05	0,06	0,06
1,00E+07	7,92E+06	DNA plasmide	0,04	0,03	0,04	0,04
1,00E+06	7,92E+05	DNA plasmide	0,03	0,05	0,04	0,04
1,00E+05	7,92E+04	DNA plasmide	0,06	0,07	0,03	0,06
2,00E+04	1,12E+04	Campione clinico	0,16	0,08	0,03	0,11
2,00E+03	1,58E+03	DNA plasmide	0,05	0,04	0,05	0,05
1,00E+03	5,62E+02	Campione clinico	0,07	0,04	0,04	0,05
1,00E+03	7,92E+02	DNA plasmide	0,07	0,05	0,06	0,06
1,00E+02	5,62E+01	Campione clinico	0,09	0,10	0,07	0,09
1,00E+02	7,92E+01	DNA plasmide	0,08	0,09	0,09	0,08

* I dati dei titoli sono considerati come distribuiti secondo una curva log-normale e sono analizzati secondo la trasformazione log₁₀.
Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione Log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

Determinazione e verifica del genotipo

Le prestazioni del test cobas® HBV rispetto ai genotipi HBV sono state valutate con i seguenti metodi:

- Determinazione del limite di sensibilità per i genotipi B-H e il mutante pre-core predominante con plasma EDTA e siero per un volume di analisi di 500 µl
- Determinazione del limite di sensibilità per i genotipi B-H e il mutante pre-core predominante con plasma EDTA e siero per un volume di analisi di 200 µl
- Verifica della linearità per i genotipi B-H e il mutante pre-core predominante

Limite di sensibilità per i genotipi B-H e il mutante pre-core predominante

Il limite di sensibilità del test **cobas**® HBV è stato determinato analizzando le diluizioni seriali per sette diversi genotipi (B, C, D, E, F, G, H) e il mutante pre-core predominante (G1896A; C1858T) in plasma EDTA umano e in siero HBV-negativo, utilizzando volumi di analisi di 500 µl. I pannelli, costituiti da otto livelli di concentrazione più un campione negativo, sono stati analizzati con tre lotti di reagenti del test **cobas**® HBV utilizzando sedute, giorni, operatori e strumenti diversi.

I risultati relativi a siero e plasma EDTA per il volume di analisi di 500 µl sono riportati rispettivamente nella Tabella 19 e nella Tabella 20. Lo studio dimostra che il test **cobas**® HBV rileva tutti i genotipi di HBV con un limite di sensibilità (Limit of Detection, LoD) simile a quello del genotipo A dell'HBV.

Tabella 19 Limite di sensibilità per i genotipi di DNA di HBV in plasma EDTA (500 µl)

Genotipo	LoD 95% mediante analisi PROBIT	Intervallo di confidenza al 95%
GT B	3,45 UI/ml	2,95 UI/ml-4,32 UI/ml
GT C	4,13 UI/ml	3,32 UI/ml-5,82 UI/ml
GT D	4,52 UI/ml	3,59 UI/ml-6,49 UI/ml
GT E	3,21 UI/ml	2,76 UI/ml-3,98 UI/ml
GT F	1,87 UI/ml	1,66 UI/ml-2,24 UI/ml
GT G	2,49 UI/ml	2,17 UI/ml-3,02 UI/ml
GT H	6,55 UI/ml	5,33 UI/ml-8,77 UI/ml
Mutante pre-core	2,38 UI/ml	2,08 UI/ml-2,90 UI/ml

Tabella 20 Limite di sensibilità per i genotipi di DNA di HBV in siero (500 µl)

Genotipo	LoD 95% mediante analisi PROBIT	Intervallo di confidenza al 95%
GT B	3,30 UI/ml	2,76 UI/ml-4,30 UI/ml
GT C	3,34 UI/ml	2,83 UI/ml-4,23 UI/ml
GT D	2,59 UI/ml	2,17 UI/ml-3,42 UI/ml
GT E	2,67 UI/ml	2,25 UI/ml-3,49 UI/ml
GT F	1,98 UI/ml	1,72 UI/ml-2,45 UI/ml
GT G	2,07 UI/ml	1,75 UI/ml-2,66 UI/ml
GT H	3,48 UI/ml	2,89 UI/ml-4,60 UI/ml
Mutante pre-core	1,65 UI/ml	1,43 UI/ml-2,03 UI/ml

Verifica del limite di sensibilità per i genotipi B-H e il mutante pre-core predominante

I campioni clinici di DNA di HBV rappresentativi di tutti i genotipi (B, C, D, E, F, G, H) e il mutante pre-core predominante (G1896A; C1858T) sono stati diluiti fino a tre livelli di concentrazione diversi in plasma EDTA e in siero. Il calcolo del tasso di successo è stato eseguito con 63 ripetizioni per ogni livello. I test sono stati eseguiti con tre lotti di reagenti cobas® HBV. I risultati per il plasma EDTA e per il siero con un volume di analisi di 200 µl sono riportati rispettivamente nella Tabella 21 e nella Tabella 22. I risultati confermano che il test cobas® HBV rileva il DNA di HBV per i sette diversi genotipi e per il mutante pre-core predominante a concentrazioni di 12,50 UI/ml, con un tasso di successo del ≥ 93,65%, con un limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale pari al 97,80%.

Tabella 21 Verifica del limite di sensibilità per i genotipi di DNA di HBV in plasma EDTA (200 µl)

Genotipo	6,25 UI/ml			12,50 UI/ml			18,75 UI/ml		
	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)
B	63	51	80,95 (88,63)	63	63	100,00 (100,00)	63	63	100,00 (100,00)
C	63	45	71,43 (80,65)	63	62	98,41 (99,92)	62	62	100,00 (100,00)
D	61	49	80,33 (88,63)	63	63	100,00 (100,00)	62	61	98,39 (99,92)
E	63	51	80,95 (88,63)	63	63	100,00 (100,00)	63	63	100,00 (100,00)
F	63	54	85,71 (92,34)	63	63	100,00 (100,00)	63	63	100,00 (100,00)
G	63	46	73,02 (82,02)	63	63	100,00 (100,00)	63	63	100,00 (100,00)
H	63	33	52,38 (63,26)	63	59	93,65 (97,80)	63	59	93,65 (97,80)
Mutante pre-core	63	54	85,71 (92,34)	63	62	98,41 (99,92)	63	63	100,00 (100,00)

* Limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale

Tabella 22 Verifica del limite di sensibilità per i genotipi di DNA di HBV in siero (200 µl)

Genotipo	6,25 UI/ml			12,50 UI/ml			18,75 UI/ml		
	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)	N. ripetizioni valide	Numero positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)
B	63	51	80,95 (88,63)	63	62	98,41 (99,92)	63	63	100,00 (100,00)
C	63	54	85,71 (92,34)	63	62	98,41 (99,92)	63	63	100,00 (100,00)
D	63	53	84,13 (91,13)	63	62	98,41 (99,92)	63	63	100,00 (100,00)
E	63	54	85,71 (92,34)	62	62	100,00 (100,00)	63	63	100,00 (100,00)
F	63	59	93,65 (97,80)	63	63	100,00 (100,00)	62	62	100,00 (100,00)
G	63	59	93,65 (97,80)	62	62	100,00 (100,00)	63	63	100,00 (100,00)
H	63	47	74,60 (83,37)	63	61	96,83 (99,43)	63	62	98,41 (99,92)
Mutante pre-core	63	60	95,24 (98,66)	63	62	98,41 (99,92)	63	63	100,00 (100,00)

* Limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale

Linearità per i genotipi B-H e il mutante pre-core predominante

La serie di diluizioni utilizzata per la verifica dello studio di linearità del test **cobas**® HBV rispetto ai genotipi era costituita da un pannello di 10 campioni rappresentativi dell'intervallo lineare previsto. Nel pannello, i campioni con titolo alto sono stati preparati da uno stock di DNA plasmide positivo con titolo alto e i campioni con titolo basso sono stati preparati da un campione clinico positivo con titolo alto. Il pannello dello studio di linearità è stato concepito prevedendo una sovrapposizione del titolo di 2 log₁₀ circa tra i due materiali di origine. L'intervallo lineare del test **cobas**® HBV era compreso tra i valori al di sotto del limite minimo LLoQ (10 UI/ml per 500 µl di volume, 25 UI/ml per 200 µl di volume) e il limite massimo ULoQ (1,00E+09 UI/ml) e includeva almeno un punto di decisione medica. Sono state analizzate 21 ripetizioni con tre lotti di reagenti **cobas**® HBV per ogni livello, in plasma EDTA e in siero.

La linearità compresa nell'intervallo lineare del test **cobas**® HBV è stata verificata per tutti i sette genotipi (B, C, D, E, F, G, H) e il mutante pre-core predominante (G1896A; C1858T). La deviazione massima tra le regressioni lineare e la regressione nonlineare di migliore adattamento è risultata minore o uguale a ± 0,2 log₁₀.

Specificità

La specificità del test **cobas**® HBV è stata determinata analizzando campioni di plasma EDTA e siero HBV-negativi ottenuti da singoli donatori. Sono stati analizzati 300 campioni individuali di plasma EDTA e 300 campioni individuali di siero (600 risultati in totale) con due lotti di reagenti **cobas**® HBV. Tutti i campioni sono risultati negativi per il DNA di HBV. Nel pannello di analisi, la specificità del test **cobas**® HBV è stata del 100% (con un intervallo di confidenza al 95% unilaterale del 99,5%).

Specificità analitica

La specificità analitica del test **cobas**® HBV è stata valutata diluendo un pannello di microrganismi in plasma EDTA sia negativo che positivo per il DNA di HBV. I microrganismi sono stati aggiunti al plasma EDTA umano negativo e sono stati analizzati sia con, sia senza DNA di HBV. Nessuno dei patogeni non HBV ha interferito con le prestazioni del test. Il test **cobas**® HBV ha prodotto risultati negativi per tutti i campioni contenenti i microrganismi ma non il target HBV, mentre ha prodotto risultati positivi per tutti i campioni contenenti sia i microrganismi che il target HBV. Inoltre, per ognuno dei campioni HBV-positivi contenenti organismi che possono causare potenziali reazioni crociate, la media del titolo \log_{10} si è attestata entro $\pm 0,3 \log_{10}$ rispetto alla media del titolo \log_{10} del rispettivo controllo spike positivo.

Tabella 23 Microrganismi analizzati per verificare la reattività crociata

	Virus	Batteri	Lieviti
Adenovirus tipo 5	Virus del Nilo Occidentale	Propionibacterium acnes	Candida albicans
Citomegalovirus	Virus dell'encefalite di St. Louis	Staphylococcus aureus	
Virus dell'epatite A	Virus della Dengue tipi 1, 2, 3 e 4		
Virus dell'epatite C	Virus FSME (ceppo HYPR)		
Virus dell'epatite D	Virus della febbre gialla		
Virus dell'immunodeficienza umana tipo 1	Papillomavirus umano		
Virus linfotropico delle cellule T umane tipo 1 e 2	Virus Varicella-Zoster		
Herpesvirus umano tipo 6	Influenza A		
Virus dell'herpes simplex tipo 1 e 2	Virus Zika		

Specificità analitica e sostanze interferenti

Sono stati analizzati campioni con livelli elevati di trigliceridi (fino a 34,5 g/l), bilirubina coniugata (0,25 g/l), bilirubina non coniugata (0,25 g/l), albumina (58,7 g/l), emoglobina (2,9 g/l) e DNA umano (2 mg/l), in presenza e in assenza di DNA di HBV. Le sostanze interferenti endogene che sono state analizzate non hanno interferito con le prestazioni del test **cobas**® HBV.

È stata inoltre analizzata la presenza di patologie autoimmuni, quali il lupus eritematoso sistemico (LES), l'artrite reumatoide (AR) e gli anticorpi antinucleo (ANA).

Inoltre sono stati analizzati i composti farmacologici elencati nella Tabella 24, ad una concentrazione pari a 3 volte il valore C_{max} in presenza e in assenza di DNA di HBV.

Nessuna delle potenziali sostanze interferenti ha alterato in alcun modo le prestazioni del test. Il test cobas® HBV ha prodotto risultati negativi per tutti i campioni in cui era assente il target HBV, mentre ha prodotto risultati positivi per tutti i campioni cui era presente il target HBV. Inoltre, per ognuno dei campioni HBV-positivi contenenti potenziali sostanze interferenti, la media del titolo \log_{10} si è attestata entro $\pm 0,5 \log_{10}$ rispetto alla media del titolo \log_{10} del rispettivo controllo spike positivo.

Tabella 24 Composti farmacologici analizzati per verificare l'interferenza con la quantificazione del DNA di HBV con il test cobas® HBV

Categoria farmacologica	Nome generico del farmaco	
Immunomodulatori	Peginterferone α -2a Ribavirina	Peginterferone α -2b
Inibitori d'ingresso dell'HIV	Maraviroc	
Inibitori dell'integrasi dell'HIV	Elvitegravir/Cobicistat	Raltegravir
Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa dell'HIV	Efavirenz	Nevirapina
	Etravirina	Rilpivirina
Inibitori della proteasi dell'HIV	Atazanavir	Lopinavir
	Tipranavir	Nelfinavir
	Darunavir	Ritonavir
	Fosamprenavir	Saquinavir
Inibitori della proteasi dell'HCV	Boceprevir	Telaprevir
	Simeprevir	
Inibitori della trascrittasi inversa o della DNA polimerasi	Abacavir	Tenofovir
	Emtricitabina	Adefovir dipivoxil
	Entecavir	Telbivudina
	Foscarnet	Zidovudina
	Cidofovir	Aciclovir
	Lamivudina	Valganciclovir
	Ganciclovir	Sofosbuvir
Composti per il trattamento delle infezioni opportunistiche	Azitromicina	Pirazinamide
	Claritromicina	Rifabutina
	Etambutolo	Rifampicina
	Fluconazolo	Sulfametossazolo
	Isoniazide	Trimetoprima

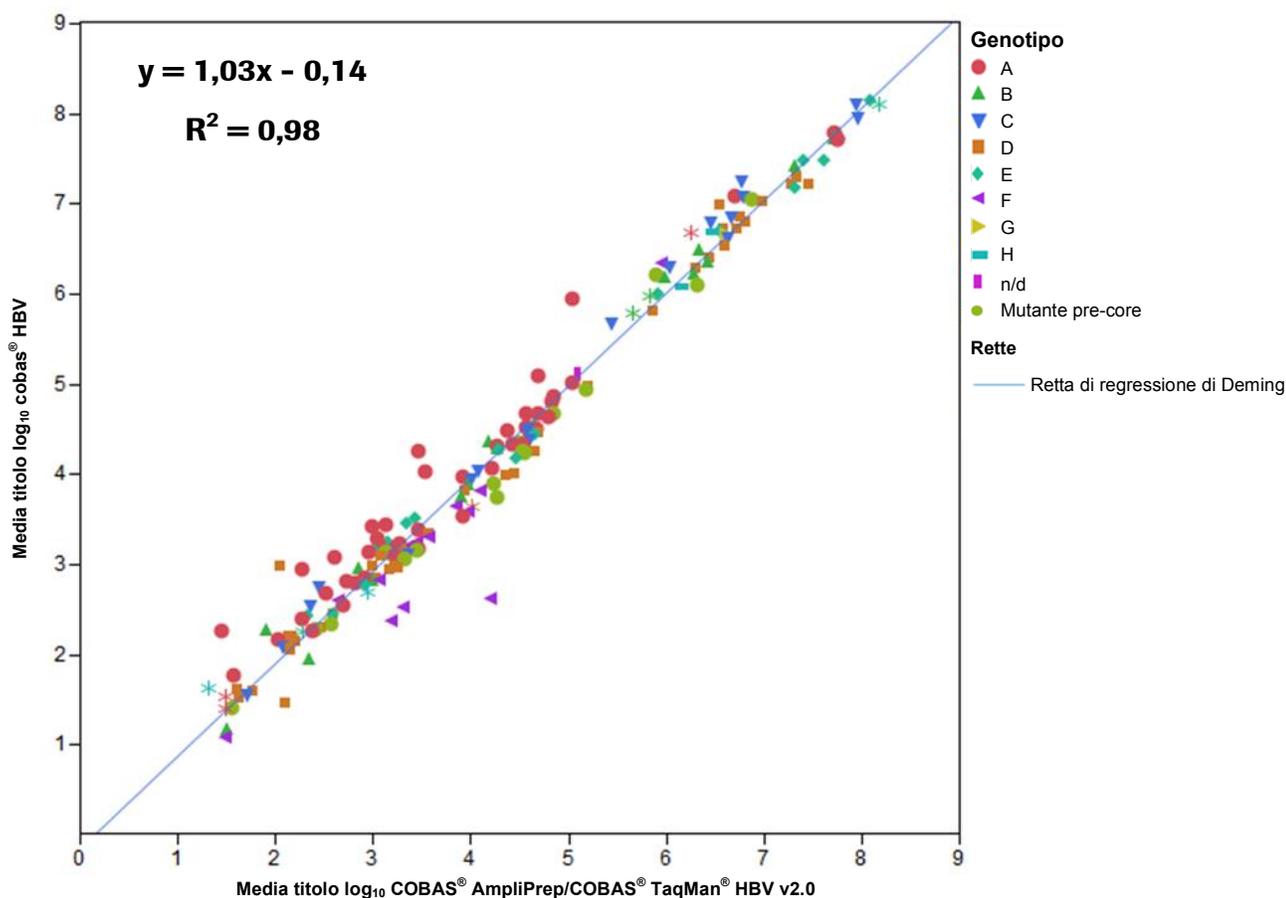
Correlazione tra i metodi

Confronto tra le prestazioni del test cobas® HBV e le prestazioni del test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV v2.0

Le prestazioni del test cobas® HBV sono state confrontate con quelle del test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV v2.0 (test TaqMan® HBV v2.0) analizzando i campioni di siero e di plasma EDTA ottenuti da pazienti con infezione da HBV. In totale sono stati analizzati in doppio 103 campioni di plasma EDTA e 85 campioni di siero rappresentativi di tutti i genotipi di HBV, ottenendo risultati validi e compresi entro l'intervallo di quantificazione dei due test. È stata applicata l'analisi di regressione di Deming. La deviazione del titolo medio dei campioni analizzati con i due test è stata di $-0,03 \log_{10}$.

I risultati della regressione di Deming sono riportati nella Figura 7.

Figura 7 Analisi di regressione dei campioni di plasma EDTA e di siero sottoposti al test cobas® HBV e al test TaqMan® HBV v2.0

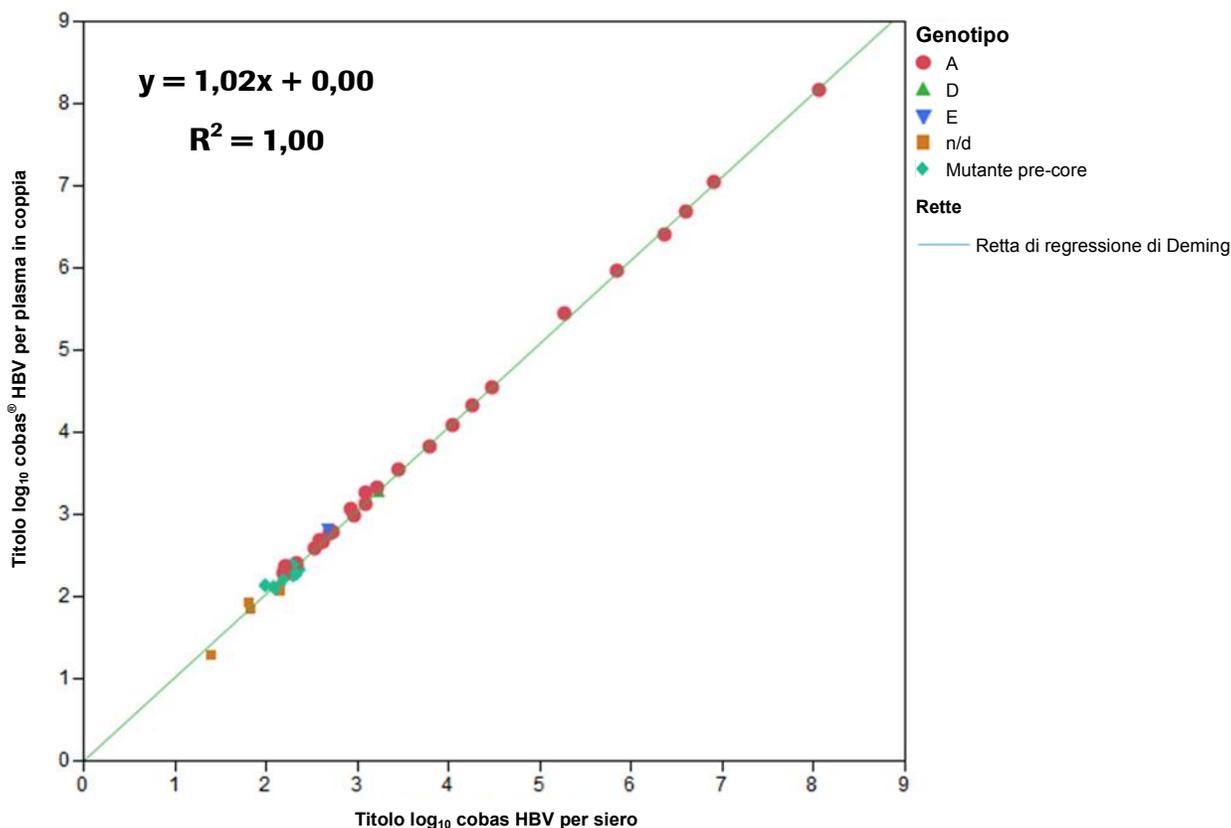


Equivalenza tra matrici – Plasma EDTA e siero

L'equivalenza tra matrici è stata analizzata utilizzando 50 coppie di campioni di plasma EDTA e di siero. I campioni HBV-positivi erano rappresentativi della maggior parte dei genotipi e avevano titoli compresi nell'intero intervallo lineare.

L'equivalenza tra matrici è stata rilevata nei campioni analizzati con una deviazione media del titolo pari a 0,05 log₁₀ (Figura 8).

Figura 8 Prestazioni dell'equivalenza tra matrici - Plasma EDTA e siero



Tasso globale d'errore del sistema

Per quanto riguarda il calcolo del tasso globale d'errore del sistema per il test **cobas**® HBV, sono stati eseguite 100 ripetizioni del test sui campioni di plasma EDTA e 100 sui campioni di siero arricchiti con il target HBV, per un totale di 200 ripetizioni. I campioni sono stati analizzati a una concentrazione del target pari a circa 3 x LoD. Lo studio è stato eseguito con il **cobas**® 6800 System.

Lo studio dimostra che tutte le ripetizioni dei test hanno prodotto risultati reattivi a ciascun target, pertanto il tasso globale d'errore del sistema è pari allo 0%. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è pari allo 0% per il limite inferiore e al 3,62% per il limite superiore per ogni matrice [0%: 3,62%].

Contaminazione crociata

Per quanto riguarda il calcolo del tasso di contaminazione crociata per il test cobas® HBV, sono state eseguite 240 ripetizioni del test su un campione di plasma EDTA umano normale, negativo ai virus HIV, HCV e HBV e 225 ripetizioni del test su un campione HBV-positivo con titolo alto, a 1,0E+09 UI/ml. Complessivamente sono state eseguite cinque sedute con campioni positivi e negativi in una configurazione a scacchiera.

Tutte le 240 ripetizioni eseguite sul campione negativo hanno prodotto risultati non reattivi, pertanto il tasso di contaminazione crociata è dello 0%. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è pari allo 0% per il limite inferiore e al 1,53% per il limite superiore [0%: 1,53%].

Informazioni supplementari

Caratteristiche del test

Tipo di campione	Plasma EDTA, siero		
Quantità minima di campione richiesta	650 µl o 350 µl		
Volume di analisi del campione	500 µl o 200 µl		
Sensibilità analitica		<u>500 µl</u>	<u>200 µl</u>
	Plasma EDTA	2,7 UI/ml	15,5 UI/ml
	Siero	2,4 UI/ml	12,5 UI/ml
Intervallo lineare	500 µl: 10 UI/ml–1,0E+09 UI/ml		
	200 µl: 25 UI/ml–1,0E+09 UI/ml		
Specificità	100% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale: 99,5%)		
Genotipi identificati	Genotipi A-H di HBV e mutante pre-core predominante		

I seguenti simboli appaiono su tutte le confezioni di prodotti diagnostici PCR di Roche.

Tabella 25 Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

	Software ausiliario		Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>
	Mandatario nella Comunità Europea		Limite inferiore dell'intervallo assegnato
	Foglio di dati del codice a barre		Fabbricante
	Codice del lotto		Conservare al buio
	Rischio biologico		Contenuto sufficiente per <n> test
	Numero di catalogo		Limiti di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso		File di definizione del test
	Contenuto del kit		Limite superiore dell'intervallo assegnato
	Distribuito da		Utilizzare entro
	Solo per valutazione delle prestazioni IVD		Global Trade Item Number
	Questo prodotto è conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici <i>in vitro</i> .		

Assistenza Tecnica ai clienti USA 1-800-526-1247

Produttore e distributori

Tabella 26 Produttore e distributori



Fabbricato negli USA

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany



Roche Diagnostics (Schweiz) AG
Industriestrasse 7
6343 Rotkreuz, Switzerland

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics, SL
Avda. Generalitat, 171-173
E-08174 Sant Cugat del Vallès
Barcelona, Spain

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
Av. Engenheiro Billings, 1729
Jaguará, Building 10
05321-010 São Paulo, SP Brazil

Roche Diagnostics
201, boulevard Armand-Frappier
H7V 4A2 Laval, Québec, Canada
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877-273-3433)

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics S.p.A.
Viale G. B. Stucchi 110
20052 Monza, Milano, Italy

Distribuidor em Portugal:
Roche Sistemas de Diagnósticos Lda.
Estrada Nacional, 249-1
2720-413 Amadora, Portugal

Marchi e brevetti

Vedere <http://www.roche-diagnostics.us/patents>

Copyright

©2015 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografia

1. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol.* 2004;38:S158-S168.
2. Weinbaum CM, Williams I, Mast EE, et al. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection. *MMWR Recomm Rep.* 2008;57:1-20.
3. Hu KQ. Hepatitis B virus (HBV) infection in Asian and Pacific Islander Americans (APIAs): how can we do better for this special population? *Am J Gastroenterol.* 2008;103:1824-1833.
4. Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med.* 2008;359:1486-1500.
5. Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B infection and long-term outcomes under treatment. *Liver Int.* 2009;29Suppl 1:100-107.
6. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol.* 2008;48:335-352.
7. But DY, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008;14:1652-1656.
8. Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serologic and virologic markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2008;2:553-562.
9. Yuen MF, Wong DK, Fung J, et al. HBsAg Seroclearance in chronic hepatitis B in Asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2008;135:1192-1199.
10. Tong MJ, Hsien C, Song JJ, et al. Factors associated with progression to hepatocellular carcinoma and to death from liver complications in patients with HBsAg-positive cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2009;54:1337-1346.
11. Sorrell MF, Belongia EA, Costa J, et al. National Institutes of Health consensus development conference statement: management of hepatitis B. *Ann Intern Med.* 2009;49:S4-S10.
12. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY).* 1992;10:413-417.
13. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-994.
14. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene.* 1990;93:125-128.
15. Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology.* 2008;134:405-415.

16. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, et al.; WHO Collaborative Study Group. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang*. 2001;80:63-71.
17. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-493.
18. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-878.
19. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Revisione del documento

Revisione del documento	
Doc Rev. 1.0 01/2015	Prima pubblicazione.
Doc Rev. 2.0 08/2015	<p>Aggiornata la concentrazione della dimetil sulfoxide nella Tabella 1.</p> <p>Aggiornato il numero di ripetizioni nella sezione Limite di sensibilità per i genotipi B-H e il mutante pre-core predominante</p> <p>Aggiornata la formula nella Figura 7 e nella Figura 8 per includere "x".</p> <p>Rimosse le informazioni sul distributore negli USA.</p> <p>Aggiornate le descrizioni della pagina dei simboli armonizzati al termine del foglio illustrativo.</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</p>
09/2016	<p>Correzione di un errore di traduzione nella sezione Standard Internazionale OMS.</p> <p>Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.</p>