

cobas[®] HBV

Test quantitativo degli acidi nucleici per l'uso sui cobas[®] 5800/6800/8800 Systems

Per uso diagnostico *in vitro*

cobas[®] HBV

P/N: 09040820190

Per l'utilizzo sul sistema cobas[®] 5800

cobas[®] HBV/HCV/HIV-1 Control Kit

P/N 09040773190

cobas[®] NHP Negative Control Kit

P/N 09051554190

Per l'utilizzo sui sistemi cobas[®] 6800/8800

cobas[®] HBV/HCV/HIV-1 Control Kit

P/N: 06997767190 oppure

P/N: 09040773190

cobas[®] NHP Negative Control Kit

P/N: 07002220190 oppure

P/N: 09051554190

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 dei reagenti	11
Altri materiali necessari per il cobas® 5800 System	13
Altri materiali necessari per i cobas® 6800/8800 Systems	13
Strumentazione e software necessari	14
Precauzioni e requisiti per l'uso.....	15
Avvertimenti e precauzioni	15
Manipolazione dei reagenti	15
Buone pratiche di laboratorio	16
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni.....	17
Campioni	17
Istruzioni per l'uso	18
Note sulla procedura	18
Esecuzione del test cobas® HBV sul cobas® 5800 System	19
Esecuzione del test cobas® HBV sui cobas® 6800/8800 Systems.....	20
Risultati.....	21
Controllo di qualità e validità dei risultati sul cobas® 5800 System	21
Risultati dei controlli sul cobas® 5800 System	21
Controllo di qualità e validità dei risultati sui cobas® 6800/8800 Systems	21
Avvisi dei controlli sui cobas® 6800/8800 Systems	22
Interpretazione dei risultati	22
Interpretazione dei risultati sul cobas® 5800 System	23
Interpretazione dei risultati sul cobas® 6800/8800 Systems.....	23
Limiti della procedura.....	24

Valutazione delle prestazioni non cliniche 25

Caratteristiche delle prestazioni chiave sui cobas® 6800/8800 Systems	25
Limite di sensibilità (LoD)	25
Intervallo lineare	27
Precisione intra-laboratorio	29
Determinazione e verifica del genotipo	32
Specificità	35
Specificità analitica	35
Specificità analitica e sostanze interferenti	36
Correlazione tra i metodi	37
Equivalenza tra matrici - plasma EDTA e siero	38
Tasso globale d'errore del sistema	39
Contaminazione crociata	39

Valutazione delle prestazioni cliniche 40

Studio sulla riproducibilità	40
Variabilità tra lotti	40
Riproducibilità	42
Utilità clinica	44
Previsione della risposta alla terapia antivirale	46
Conclusioni	50
Equivalenza dei sistemi / confronto tra sistemi	50

Informazioni supplementari..... 51

Caratteristiche del test	51
Simboli	52
Assistenza tecnica	53
Produttore e importatore	53
Marchi e brevetti	53
Copyright	53
Bibliografia	54
Revisione del documento	56

Uso previsto

Il test **cobas® HBV** consente l'amplificazione *in vitro* degli acidi nucleici ai fini della quantificazione del DNA del virus dell'epatite B (HBV) nel plasma EDTA o siero umano di individui 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 degli individui 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) supera il 2%, incluse le popolazioni di regioni endemiche del mondo (ad esempio Asia e Africa), omosessuali e consumatori di droghe mediante iniezione.²

Il marcatore più comune dell'infezione da HBV è la presenza dell'HBsAg.⁸ Sebbene i portatori possano beneficiare di una clearance dell'HBsAg e sviluppare l'anticorpo anti-HBsAg, resta comunque il rischio di comparsa di complicanze epatiche gravi in un momento successivo della 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} Il fatto che i ceppi varianti dei mutanti pre-core dell'HBV possano perdere la capacità di produrre l'HBeAg, anche in presenza di un'infezione attiva, pone dei limiti all'uso di questo marcatore ai fini del 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**® 5800 System, sul **cobas**® 6800 System o sul **cobas**® 8800. 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 titolo positivo alto, un titolo positivo basso e un controllo negativo. I controlli esterni positivo alto e positivo basso vengono prodotti mediante diluizione da materiale stock con un titolo tracciabile rispetto allo Standard Internazionale dell'OMS per l'HBV. Ogni lotto del kit di amplificazione/rilevazione è calibrato in modo tracciabile rispetto allo Standard Internazionale dell'OMS per l'HBV.

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. Il **cobas**® 5800 System è progettato come strumento unico integrato. 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 del **cobas**® 5800 System o dei **cobas**® 6800/8800 Systems, 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.

Il reagente Master Mix **cobas**® HBV contiene delle sonde di rilevazione che sono specifiche rispettivamente per le sequenze 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 192 test (P/N 09040820190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit 192 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	22,3 ml
Standard di quantificazione DNA (DNA-QS)	Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% costruito 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	21,2 ml
Tampone di eluizione (EB)	Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	21,2 ml
Master Mix Reagente 1 (MMX-R1)	Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	7,5 ml
HBV Master Mix Reagente 2 (HBV MMX-R2)	Tampone tricina, acetato di potassio, 18% dimetilsolfossido, 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	9,7 ml

* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

** Sostanza pericolosa.

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

Conservare a 2-8°C

Per l'utilizzo sul sistema cobas® 5800 (P/N 09040773190)

Per l'utilizzo sui sistemi cobas® 6800/8800 (P/N 06997767190 e P/N 09040773190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo positivo basso HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 L(+))C)	< 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 e DNA di HBV non rilevabili con i metodi PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	5,2 ml (8 × 0,65 ml)	  ATTENZIONE H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/ la nebbia/i vapori/gli aerosol. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 Massa di reazione di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one [N. CE 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-one [N. CE 220-239-6] (3:1).
Controllo positivo alto HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 H(+))C)	< 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 e DNA di HBV non rilevabili con i metodi PCR 0,1% conservante ProClin® 300**	5,2 ml (8 × 0,65 ml)	  ATTENZIONE H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/ la nebbia/i vapori/gli aerosol. P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 Massa di reazione di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one [N. CE 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-one [N. CE 220-239-6] (3:1).

* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

** Sostanza pericolosa.

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

Conservare a 2-8°C

Per l'utilizzo sul sistema **cobas®** 5800 (P/N 09051554190)Per l'utilizzo sui sistemi **cobas®** 6800/8800 (P/N 07002220190 e P/N 09051554190)

Componenti del kit	Ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento*
Controllo negativo di plasma umano normale (NHP-NC)	Plasma umano normale, non reattivo ai test brevettati per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, anti-HBc e antigene HBsAg; RNA di HIV-1, RNA di HIV-2, RNA di HCV e DNA di HBV non rilevabili con i metodi PCR < 0,1% conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	  ATTENZIONE H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P272: Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro. P280: Indossare guanti protettivi. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P362 + P364: Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto d'eliminazione dei rifiuti autorizzato. 55965-84-9 Massa di reazione di: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one [N. CE 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-one [N. CE 220-239-6] (3:1).

* L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

** Sostanza pericolosa.

Reagenti cobas omni per la preparazione dei campioni

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

Reagenti	Ingredienti dei reagenti	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 × 875 ml	Non applicabile
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservare a 2-8°C (P/N 06997538190)	43% (p/p) guanidina tiocianato***, 5% (p/v) polidocanolo***, 2% (p/v) ditiotreitolo, citrato di sodio diidrato	4 × 875 ml	 PERICOLO H302 + H332: Nocivo se ingerito o inalato. H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H412: Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/ la nebbia/i vapori/gli aerosol. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso. P303 + P361 + P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle. P304 + P340 + P310: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. P305 + P351 + P338 + P310: 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. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. 593-84-0 Guanidina tiocianato 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservare a 15-30°C (P/N 06997503190)	Citrato di sodio diidrato, 0,1% metil-4 idrossibenzoato	4,2 l	Non applicabile

* Questi reagenti non sono inclusi nel kit del test **cobas**® HBV. Consultare l'elenco dei materiali aggiuntivi necessari (Tabella 9).

** L'etichettatura per la sicurezza dei prodotti è conforme principalmente alle indicazioni GHS dell'Unione Europea.

*** Sostanza pericolosa.

Requisiti per la conservazione dei reagenti

I reagenti devono essere conservati e manipolati rispettando le condizioni indicate dalla Tabella 5, Tabella 6 alla Tabella 7.

I reagenti che non sono ancora stati caricati sui cobas® 5800/6800/8800 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

Requisiti per la manipolazione dei reagenti per il cobas® 5800 System

Dopo il caricamento sul cobas® 5800 System, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro data di scadenza viene monitorata dal sistema. Il sistema consente l'utilizzo dei reagenti soltanto se sono rispettate tutte le condizioni descritte nella Tabella 7. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. Nella Tabella 6 vengono fornite all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per il cobas® 5800 System.

Tabella 6 Scadenza dei reagenti sul cobas® 5800 System

Reagente	Data di scadenza del kit	Stabilità del kit aperto	Numero di sedute per cui il kit può essere usato	Stabilità a bordo
cobas® HBV	Data non superata	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 36 giorni*
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	Data non superata	Non applicabile ¹	Non applicabile	Max 36 giorni*
cobas® NHP Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile ¹	Non applicabile	Max 36 giorni*
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

¹ Reagenti monouso.

* Il calcolo inizia dalla prima volta che il reagente viene caricato sul cobas® 5800 System.

Requisiti per la manipolazione dei reagenti per i cobas® 6800/8800 Systems

Dopo il caricamento sui cobas® 6800/8800 Systems, i reagenti sono conservati alla temperatura appropriata e la loro 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 7. Il sistema impedisce automaticamente l'uso dei reagenti scaduti. La Tabella 7 fornisce all'utente informazioni utili sulle condizioni di manipolazione dei reagenti previste per i cobas® 6800/8800 Systems.

Tabella 7 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	90 giorni dal primo uso	Max 40 sedute	Max 40 ore
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	Data non superata	Non applicabile ^a	Non applicabile	Max 8 ore
cobas® NHP Negative Control Kit	Data non superata	Non applicabile ^a	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

^a Reagenti monouso.

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

Altri materiali necessari per il cobas® 5800 System

Tabella 8 Materiali e consumabili per l'utilizzo sul **cobas® 5800 System**

Materiale	P/N
cobas omni Processing Plate 24	08413975001
cobas omni Amplification Plate 24	08499853001
cobas omni Liquid Waste Plate 24	08413983001
Puntale CORE TIPS con filtro, 1 ml	04639642001
Puntale CORE TIPS con filtro, 300 µl	07345607001
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 oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto	07435967001 oppure 08030073001

Altri materiali necessari per i cobas® 6800/8800 Systems

Tabella 9 Materiali e consumabili per l'uso 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 e Contenitore per rifiuti solidi oppure Sacchetto per rifiuti solidi con inserto e Kit cassetto	07435967001 e 07094361001 oppure 08030073001 e 08387281001

Strumentazione e software necessari

Il software del **cobas**® 5800 System e il pacchetto di analisi **cobas**® HBV per il **cobas**® 5800 System verranno installati sullo strumento **cobas**® 5800. Il software x800 Data Manager e il PC per il **cobas**® 5800 System verranno forniti con il sistema.

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

Tabella 10 Strumentazione

Apparecchiatura	P/N
cobas ® 5800 System	08707464001
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, consultare l'Assistenza Utente o la Guida Utente del **cobas**® 5800 System o 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, nonché del **cobas®** 5800 System o 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 brevettati 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 dei virus HIV-1 (gruppi M e O), HIV-2 e HCV e DNA del virus HBV. 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.
- In caso di un grave incidente verificatosi durante l'uso di questo test, segnalarlo alla propria autorità competente locale.

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 **cobas omni** Lysis Reagent 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 **cobas omni** Lysis Reagent, contenente guanidina tiocianato, entri in contatto con la soluzione tiocianato di guanidinio 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 fuoriuscite di liquidi sullo strumento **cobas®** 5800, attenersi alle istruzioni contenute nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente del **cobas®** 5800 System per pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento.
- In caso di versamenti di liquidi sullo strumento **cobas®** 6800/8800, attenersi alle istruzioni contenute nella Guida Utente e/o nell'Assistenza Utente dei **cobas®** 6800/8800 Systems per pulire accuratamente e decontaminare la superficie dello strumento o 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.

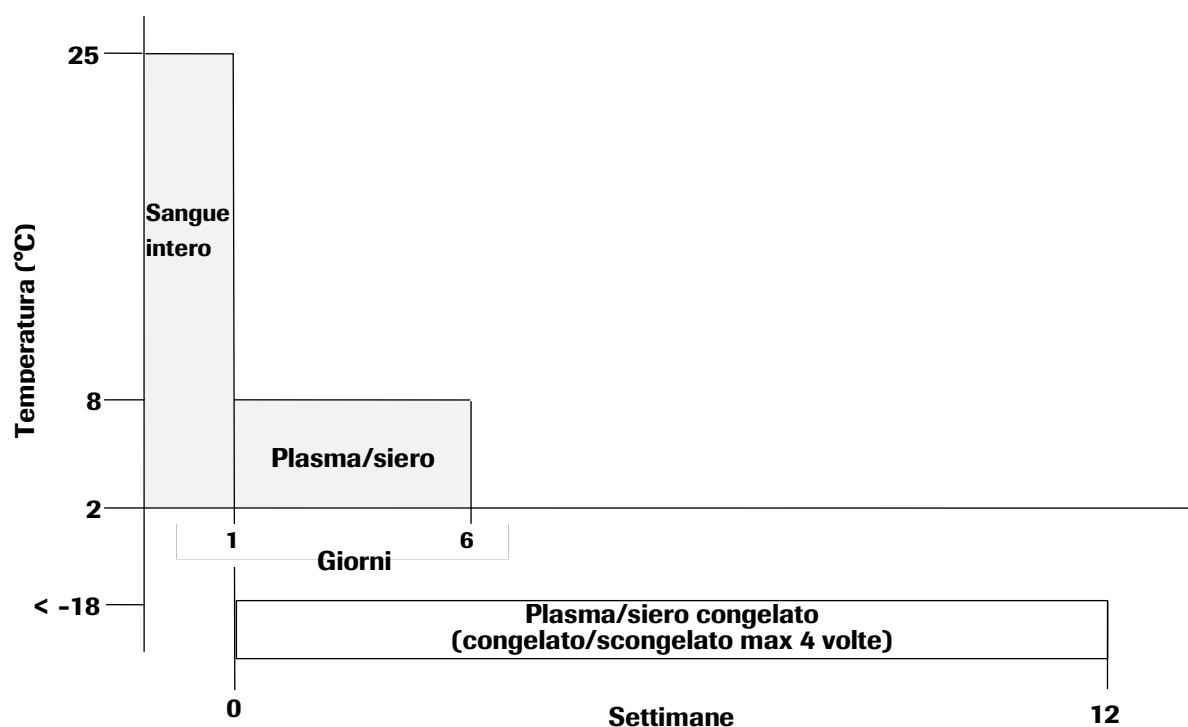
Conservare tutti i campioni alle temperature indicate.

La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.

Se si utilizzano campioni congelati nelle provette secondarie, mantenere i campioni a temperatura ambiente (15-30°C) finché non si saranno scongelati completamente, quindi miscelare brevemente (ad esempio, in vortex per 3-5 secondi) e centrifugare in modo da raccogliere tutto il volume del campione sul fondo della provetta.

Campioni

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

Figura 1 Condizioni di conservazione dei campioni

- Per l'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 l'Assistenza Utente e/o la Guida Utente del **cobas® 5800 System** o dei **cobas® 6800/8800 Systems**.

Esecuzione del test cobas® HBV sul cobas® 5800 System

È possibile eseguire il test cobas® HBV con due diversi volumi 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 in maniera dettagliata nell'Assistenza Utente e/o nella Guida Utente del cobas® 5800 System. La procedura è riassunta nella Figura 2.

Figura 2 Procedura del test cobas® HBV sul cobas® 5800 System

1	Eseguire la procedura di accesso al sistema
2	Caricamento dei campioni sul sistema: • Caricare i rack per campioni sul sistema • Il sistema si prepara automaticamente • Ordinare i test
3	Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema: • Caricare le cassette dei reagenti specifici per il test • Caricare i minirack per i controlli • Caricare i puntali di estrazione • Caricare i puntali di eluizione • Caricare le piastre di estrazione • Caricare le piastre per rifiuti liquidi • Caricare le piastre di amplificazione • Caricare la cassetta MGP • Ricaricare il diluente per campioni • Ricaricare il reagente di lisi • Ricaricare il reagente di lavaggio
4	Avviare la seduta selezionando il pulsante Start nell'interfaccia utente; tutte le sedute successive si avvieranno automaticamente, a meno che non vengano posticipate manualmente
5	Rivedere ed esportare i risultati
6	Rimuovere eappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro Pulire lo strumento: • Scaricare i minirack per i controlli vuoti • Scaricare le cassette dei reagenti specifici per il test • Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione • Svuotare i rifiuti liquidi • Svuotare i rifiuti solidi

Esecuzione del test cobas® HBV sui cobas® 6800/8800 Systems

È possibile eseguire il test cobas® HBV con due diversi volumi minimi: 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 nella Guida Utente e/o nell'Assistenza Utente dei cobas® 6800/8800 Systems. Figura 3 La procedura è riassunta nella .

Figura 3 Procedura del test cobas® HBV sui cobas® 6800/8800 Systems

1	Eeguire la procedura di accesso al sistema Premere Start per preparare il sistema Ordinare i test
2	Ricaricare i reagenti e i consumabili segnalati dal sistema: • Caricare la cassetta dei reagenti specifici per il test • Caricare le cassette dei controlli • Caricare i puntali di pipettamento • Caricare le piastre di estrazione • Caricare il reagente MGP • Caricare le piastre di amplificazione • Ricaricare il diluente per campioni • Ricaricare il reagente di lisi • Ricaricare il reagente di lavaggio
3	Caricamento dei campioni sul sistema: • Caricare i rack per campioni e i rack portapuntali otturati sullo stesso modulo di inserimento dei campioni • Confermare che i campioni sono stati accettati dal modulo di trasferimento
4	Per avviare la seduta, scegliere il pulsante Avvio manuale nell'interfaccia utente o attendere l'avvio automatico dopo 120 minuti o se il batch è al completo
5	Rivedere ed esportare i risultati
6	Rimuovere eappare le provette campione contenenti il volume minimo richiesto per eventuale uso futuro Pulire lo strumento: • Scaricare le cassette dei controlli vuote • Svuotare il cassetto per piastre di amplificazione • Svuotare i rifiuti liquidi • Svuotare i rifiuti solidi

Risultati

Il **cobas® 5800 System** e i **cobas® 6800/8800 Systems** rilevano automaticamente la concentrazione del DNA di HBV per i campioni e i controlli. La concentrazione del DNA di HBV si esprime in unità internazionali per millilitro (UI/ml).

Controllo di qualità e validità dei risultati sul **cobas® 5800 System**

- In ogni batch vengono eseguiti un controllo negativo [(-) C] e due controlli positivi: un controllo positivo basso [HBV L(+)C] e un controllo positivo alto [HBV H(+)C]. Ciò avviene almeno ogni 72 ore o per ogni nuovo lotto del kit. È possibile aumentare la frequenza con cui sono programmati i controlli positivi e/o negativi in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali.
- Nel software **cobas® 5800 System** e/o nel report, verificare se sono presenti eventuali avvisi e i risultati corrispondenti, in modo da 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.

Il **cobas® 5800** software considera automaticamente non validi i risultati in caso di fallimento del controllo negativo o dei controlli positivi.

NOTA: il **cobas® 5800 System** è preimpostato in modo che venga eseguita una serie di controlli (positivi e negativi) con ogni seduta; tuttavia è possibile configurare una frequenza inferiore, fino a 72 ore, in base alle procedure del laboratorio e/o ai regolamenti locali. Per maggiori informazioni, rivolgersi ad un tecnico Roche e/o all'assistenza clienti Roche.

Risultati dei controlli sul **cobas® 5800 System**

I risultati dei controlli sono visualizzati nell'app "Controls" del software **cobas® 5800**.

- I controlli sono contrassegnati come "validi" nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono validi. I controlli sono contrassegnati come "non validi" nella colonna del risultato del controllo se tutti i target del controllo sono non validi.
- Ai controlli "non validi" viene associato un avviso nella colonna degli avvisi. Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui il controllo è contrassegnato come non valido e vengono mostrati gli eventuali avvisi.
- Se uno dei controlli positivi non è valido, ripetere il test di tutti i controlli positivi e di tutti i campioni interessati. Se il controllo negativo non è valido, ripetere il test su tutti i controlli e su tutti i campioni interessati.

Controllo di qualità e validità dei risultati sui **cobas® 6800/8800 Systems**

- 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 Systems** e/o nei report, verificare se sono presenti eventuali avvisi e i risultati corrispondenti, in modo da 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.

Il software **cobas® 6800/8800** considera automaticamente non validi i risultati in caso di fallimento dei controlli negativo e positivo.

Avvisi dei controlli sui cobas® 6800/8800 Systems

Tabella 11 Flag per i controlli positivi e negativi

Controllo negativo	Flag	Risultato	Interpretazione
(-) C	Q02 (Batch di controllo non riuscito)	Non valido	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)	Non valido	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)	Non valido	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

Nel caso di un batch di controllo valido, verificare nel software **cobas® 5800 System** e **cobas® 6800/8800 Systems** e/o nei report se sono presenti eventuali avvisi 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 12 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)
Titer	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.

Interpretazione dei risultati sul cobas® 5800 System

I risultati dei campioni sono visualizzati nell'app "Risultati" del software **cobas® 5800**.

Nel caso di un batch di controllo valido, verificare nel software **cobas® 5800 System** e/o nel report se sono presenti eventuali avvisi per ogni singolo campione. I risultati dovranno essere interpretati applicando i seguenti criteri:

- I campioni associati a un batch di controllo valido sono mostrati come "Validi" nella colonna "Risultato di controllo" se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come validi nel report. I campioni associati a un batch di controllo non valido sono mostrati come "Non validi" nella colonna "Risultato di controllo" se tutti i risultati dei target del controllo sono stati indicati come non validi nel report.
- Se i controlli associati di un risultato campione sono non validi, verrà aggiunto un flag specifico al risultato campione nel modo seguente:
 - Q05D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo positivo non valido
 - Q06D: validazione dei risultati non riuscita a causa di un controllo negativo non valido
- I valori nella colonna "Risultati" relativi ai singoli risultati target dei campioni devono essere interpretati nel modo indicato in Tabella 12.
- Se uno o più target dei campioni sono contrassegnati con "Non valido", il software **cobas® 5800** mostra un flag nella colonna "Flag". Nella vista dettagliata viene spiegato il motivo per cui i target dei campioni sono contrassegnati come non validi e vengono mostrati gli eventuali avvisi.

Interpretazione dei risultati sul cobas® 6800/8800 Systems

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

- I campioni sono contrassegnati con "Yes" nella colonna "Valido" se tutti i target richiesti hanno generato risultati validi. I campioni contrassegnati con "No" nella colonna "Valido" potrebbero necessitare di ulteriore interpretazione e altri interventi.
- I valori per ogni risultato target del campione dovrebbero essere interpretati secondo le informazioni riportate nella precedente Tabella 12.

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®** 5800/6800/8800 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, si consiglia agli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, di svolgere uno studio sulla correlazione tra i metodi nel proprio laboratorio, così da qualificare tali differenze. Si consiglia agli utenti di elaborare norme/procedure specifiche.
- Il test **cobas®** HBV non è destinato all'uso come test di screening per la presenza dell'HBV nel sangue o negli emoderivati, né come test diagnostico per confermare la presenza di un'infezione da HBV.

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Caratteristiche delle prestazioni chiave sui cobas® 6800/8800 Systems

Limite di sensibilità (LoD)

Standard Internazionale OMS

Per determinare il limite di sensibilità del test **cobas® HBV**, è stato utilizzato lo Standard Internazionale dell'OMS (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 (National Institute for Biological Standards and Control). 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 ottenuti con entrambi i volumi di analisi del campione, sia plasma EDTA che siero, sono riportati rispettivamente nella Tabella 13 e nella Tabella 16. 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 13 Limite di sensibilità per il plasma EDTA (500 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di HBV)	N. di repliche valide	N. di 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 14 Limite di sensibilità per il siero (500 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di HBV)	N. di repliche valide	N. di 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 15 Limite di sensibilità per il plasma EDTA (200 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di HBV)	N. di repliche valide	N. di 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 16 Limite di sensibilità per il siero (200 µl)

Concentrazione iniziale del titolo (UI/ml DNA di HBV)	N. di repliche valide	N. di 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 $2 \log_{10}$ 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 $1,0 \log_{10}$ 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 $\pm 0,2 \log_{10}$. Lungo l'intervallo lineare, l'accuratezza del test è compresa entro $\pm 0,24 \log_{10}$.

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 $\pm 0,2 \log_{10}$. Lungo l'intervallo lineare, l'accuratezza del test è compresa entro $\pm 0,24 \log_{10}$.

Per una rappresentazione dei risultati, vedere dalla Figura 4 alla Figura 7.

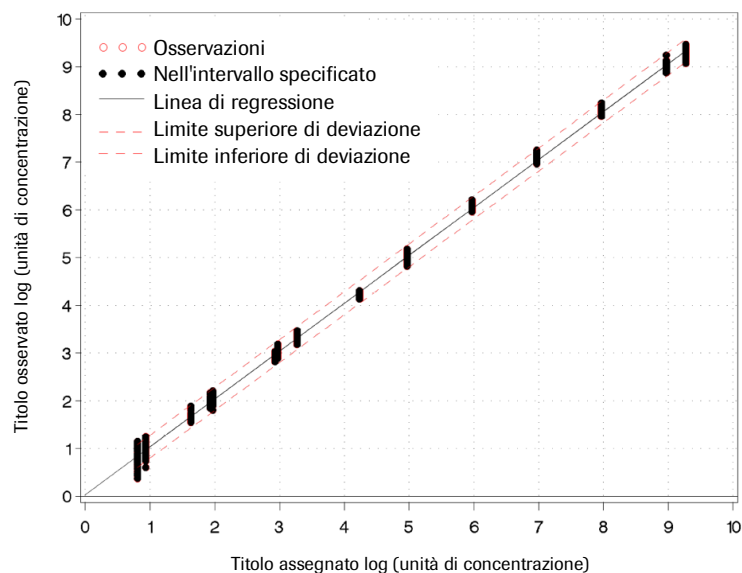
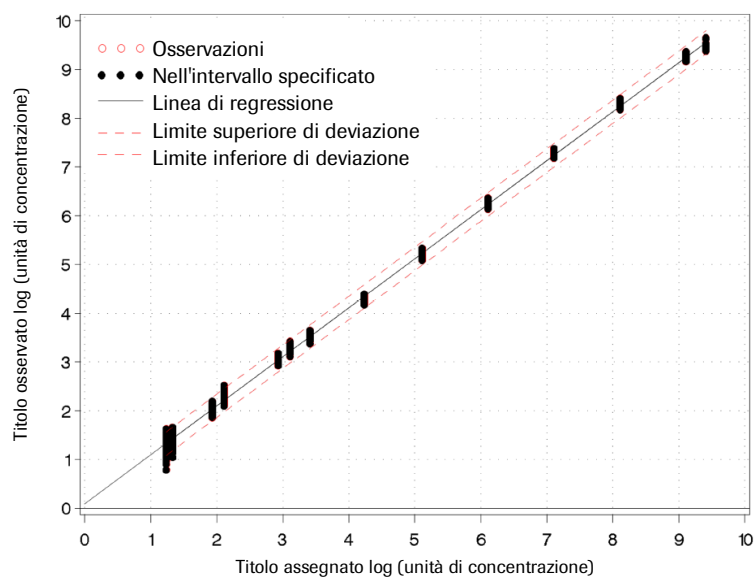
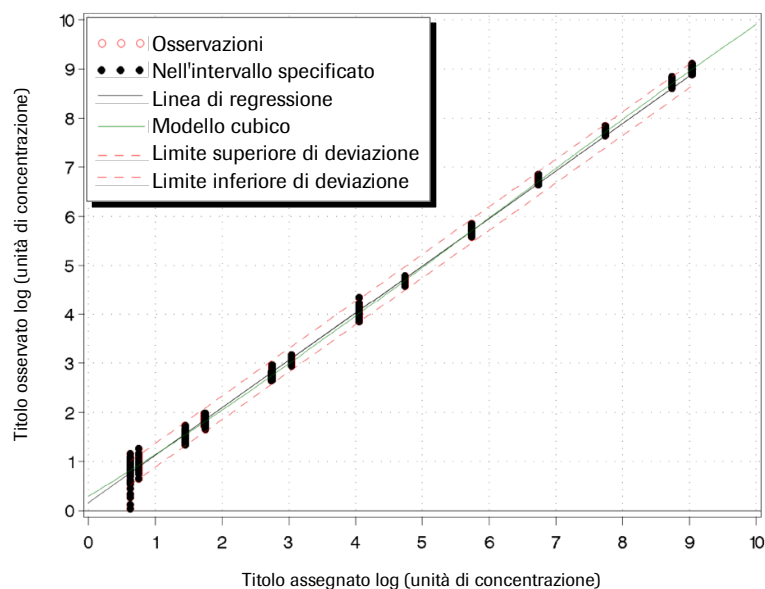
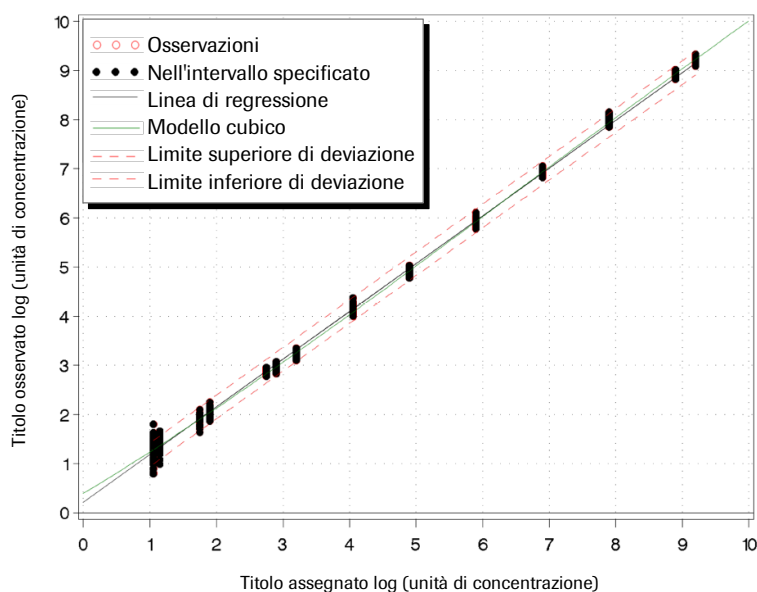
Figura 4 Definizione dell'intervallo lineare per il plasma EDTA (500 µl)**Figura 5** Definizione dell'intervallo lineare per il plasma EDTA (200 µl)

Figura 6 Definizione dell'intervallo lineare per il siero (500 µl)**Figura 7** 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 17 alla Tabella 20.

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 17 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 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 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 log₁₀. Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

Tabella 19 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 $\log_{10}$. Le colonne DS (Deviazione Standard) indicano il totale del titolo dopo la trasformazione log per ognuno dei tre lotti di reagenti.

Tabella 20 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 $\log_{10}$. 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 21 e nella Tabella 22. 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 21 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	2,95-4,32 UI/ml
GT C	4,13 UI/ml	3,32-5,82 UI/ml
GT D	4,52 UI/ml	3,59-6,49 UI/ml
GT E	3,21 UI/ml	2,76-3,98 UI/ml
GT F	1,87 UI/ml	1,66-2,24 UI/ml
GT G	2,49 UI/ml	2,17-3,02 UI/ml
GT H	6,55 UI/ml	5,33-8,77 UI/ml
Mutante pre-core	2,38 UI/ml	2,08-2,90 UI/ml

Tabella 22 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	2,76-4,30 UI/ml
GT C	3,34 UI/ml	2,83-4,23 UI/ml
GT D	2,59 UI/ml	2,17-3,42 UI/ml
GT E	2,67 UI/ml	2,25-3,49 UI/ml
GT F	1,98 UI/ml	1,72-2,45 UI/ml
GT G	2,07 UI/ml	1,75-2,66 UI/ml
GT H	3,48 UI/ml	2,89-4,60 UI/ml
Mutante pre-core	1,65 UI/ml	1,43-2,03 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 effettuato 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 23 e nella Tabella 24. 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 $\geq 93,65\%$, con un limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale pari al 97,80%.

Tabella 23 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. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)	N. di repliche valide	N. di 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 24 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. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)	N. di repliche valide	N. di positivi	Tasso di successo % (IC 95%*)	N. di repliche valide	N. di 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 nella verifica dello studio di linearità dei genotipi per il test **cobas®** HBV era costituita da un pannello di 10 membri, 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 la regressione 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 di plasma EDTA e 300 campioni individuali di siero (totale risultati: 600) 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 25 Microrganismi analizzati ai fini della reattività crociata

Virus		Batteri	Lieviti
Adenovirus tipo 5	Virus del Nilo Occidentale	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Candida albicans</i>
Citomegalovirus	Virus dell'encefalite di St. Louis	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
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 1	Papillomavirus umano	-	-
Virus linfotropico delle cellule T umane tipo 1 e 2	Virus Varicella-Zoster	-	-
Virus dell'herpes 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 (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 26, 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 26 Composti farmacologici analizzati per verificare l'interferenza con la quantificazione del DNA di HBV da parte del test **cobas® HBV**

Categoria farmacologica	Nome generico del farmaco	
Immunomodulatori	Peginterferone α -2a	Peginterferone α -2b
	Ribavirina	-
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

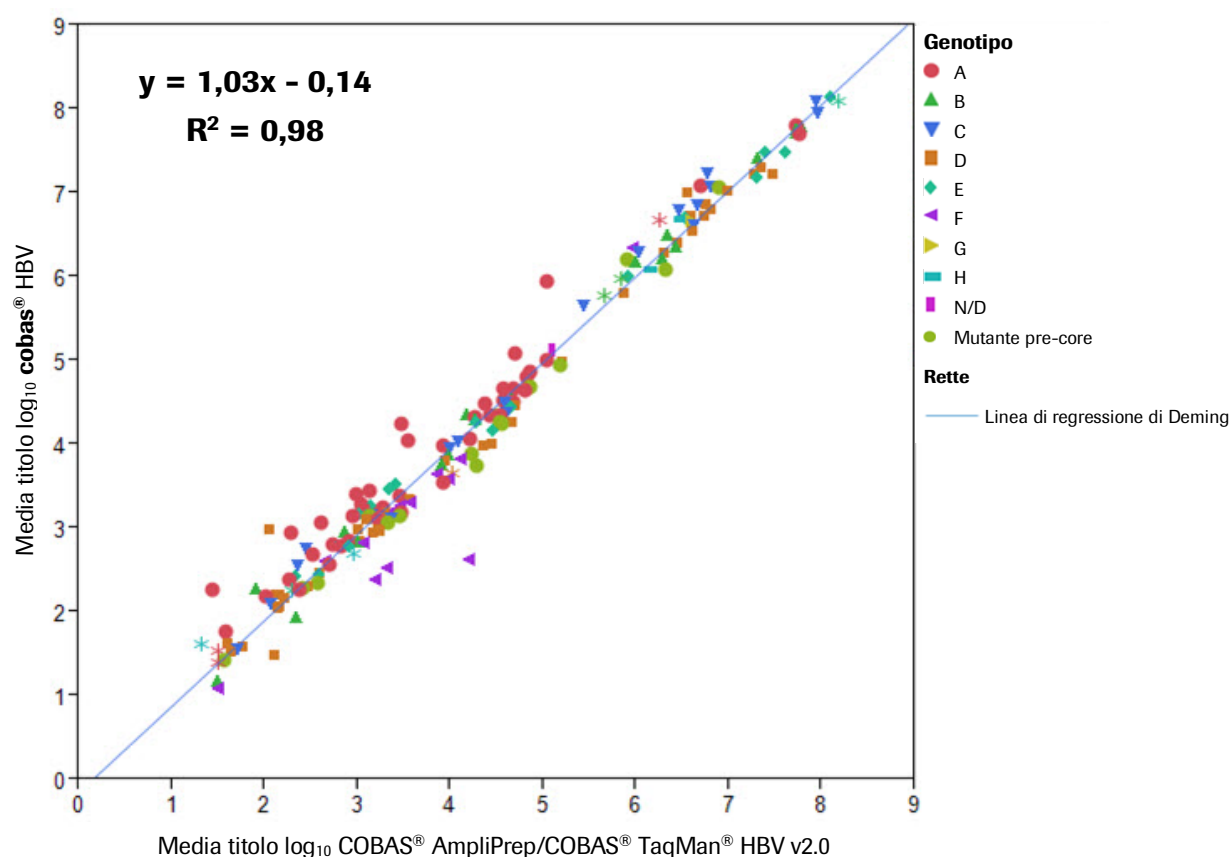
Correlazione tra i metodi

Confronto tra le prestazioni del test cobas® HBV e le prestazioni del COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test, 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 8.

Figura 8 Analisi di regressione dei campioni di plasma EDTA e siero sottoposti al test cobas® HBV vs il test TaqMan® HBV v2.0

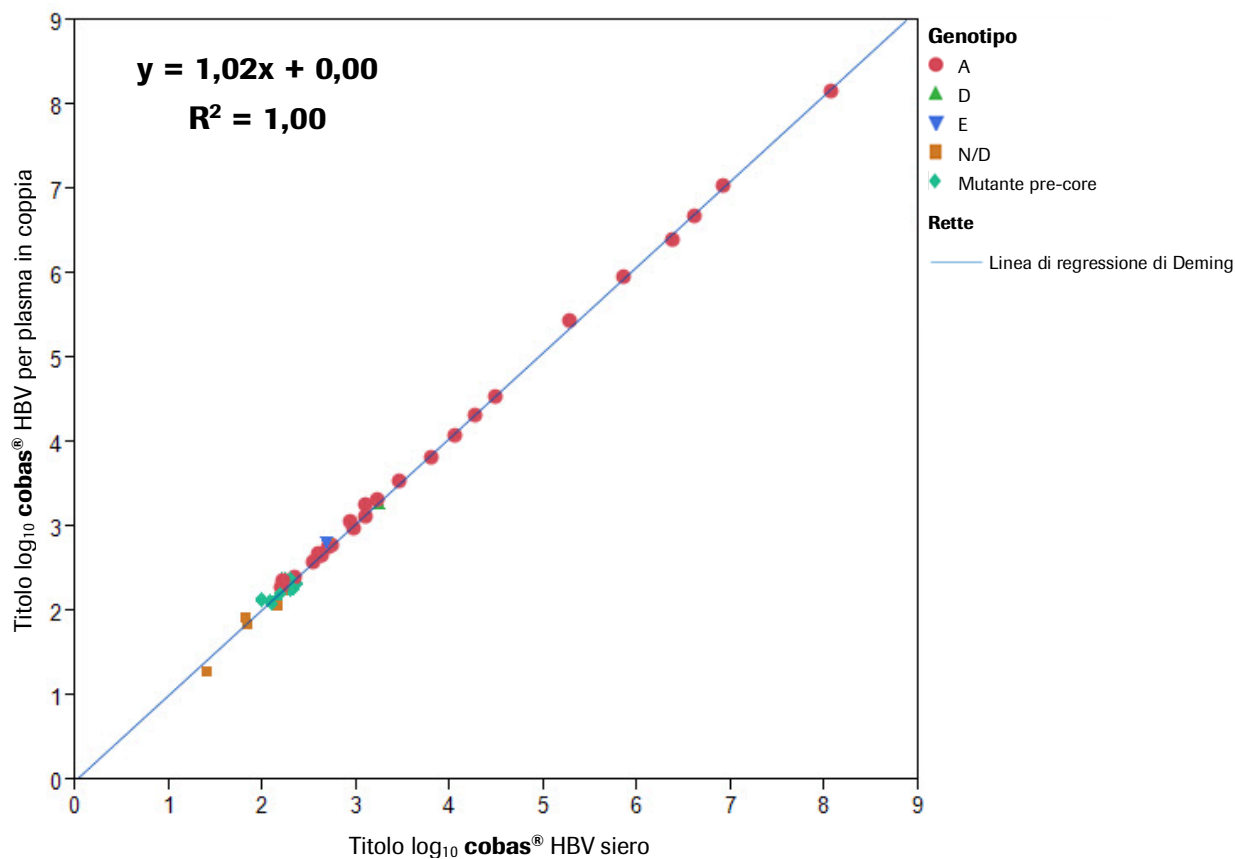


Equivalenza tra matrici - plasma EDTA e siero

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 9).

Figura 9 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 $3 \times \text{LoD}$. 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 $1,0\text{E}+09$ 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 stato dello 0%. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è pari allo 0% per il limite inferiore e all'1,53% per il limite superiore [0%: 1,53%].

Valutazione delle prestazioni cliniche

Studio sulla riproducibilità

La riproducibilità e la variabilità tra lotti di **cobas®** HBV sono state valutate nel plasma EDTA su **cobas®** 6800 System utilizzando un modello misto per stimare la varianza totale.

Per un riepilogo dei risultati della valutazione, vedere dalla Tabella 27 alla Tabella 30 di seguito.

Variabilità tra lotti

Il test di variabilità tra lotti è stato eseguito per i genotipi A e C in una sede del test, utilizzando tre lotti di reagenti. Due operatori della sede hanno analizzato ogni lotto per sei giorni. Sono state effettuate due analisi ogni giorno.

Tabella 27 di seguito riporta le percentuali attribuibili di varianza totale, le deviazioni standard (DS) della precisione totale e il coefficiente di variabilità (CV) log-normale per genotipo e la concentrazione attesa di DNA di HBV log₁₀ per **cobas®** 6800 System.

Tabella 27 Percentuale attribuibile di varianza totale, deviazione standard della precisione totale e CV (%) log-normale della concentrazione di DNA di HBV (log₁₀ UI/ml) per genotipo e membro del pannello positivo (tra lotti) su **cobas®** 6800 System (riproducibilità)

Genotipo	Concentrazione DNA HBV (log ₁₀ UI/ml)		N. di test ^b	Contributo % a varianza totale (CV (%) log-normale)					Precisione totale	
	Atteso	Media osservata ^a		Lotto	Operatore	Giorno	Seduta	Stessa seduta	DS ^c	CV (%) log-normale ^d
A	1,48	1,50	107	13% (12,90)	0% (0,00)	0% (0,00)	0% (0,00)	87% (34,68)	0,157	37,27
	2,70	2,72	108	52% (11,96)	0% (0,00)	0% (0,00)	0% (0,00)	48% (11,56)	0,072	16,69
	3,70	3,64	108	60% (14,29)	0% (0,00)	4% (3,55)	1% (1,57)	36% (11,01)	0,080	18,53
	4,70	4,65	107	47% (13,05)	0% (0,00)	3% (3,22)	1% (2,32)	49% (13,29)	0,082	19,14
	5,70	5,67	107	53% (13,66)	2% (2,59)	0% (0,00)	0% (0,00)	45% (12,54)	0,081	18,80
	6,70	6,71	105	50% (11,66)	0% (0,00)	0% (0,00)	5% (3,82)	44% (10,92)	0,071	16,48
	7,70	7,41	108	55% (13,08)	0% (0,00)	0% (0,00)	4% (3,59)	40% (11,18)	0,076	17,65
	8,70	8,41	107	51% (12,52)	0% (0,00)	0% (0,00)	10% (5,61)	38% (10,75)	0,075	17,51

	Concentrazione DNA HBV (log ₁₀ UI/ml)			Contributo % a varianza totale (CV (%) log-normale)					Precisione totale	
Genotipo	Atteso	Media osservata ^a	N. di test ^b	Lotto	Operatore	Giorno	Seduta	Stessa seduta	DS ^c	CV (%) log-normale ^d
C	1,48	1,49	107	23% (13,62)	1% (2,83)	0% (0,00)	0% (0,00)	76% (25,26)	0,124	29,05
	2,70	2,71	105	53% (13,92)	2% (2,63)	3% (3,48)	0% (0,00)	41% (12,27)	0,082	19,16
	3,70	3,64	107	61% (11,67)	0% (0,00)	0% (0,80)	0% (0,00)	39% (9,37)	0,065	15,02
	4,70	4,65	106	47% (11,44)	0% (0,00)	0% (0,00)	0% (0,00)	53% (12,25)	0,073	16,82
	5,70	5,69	107	60% (14,76)	0% (0,00)	1% (1,51)	0% (0,00)	39% (11,86)	0,082	19,08
	6,70	6,69	107	48% (11,79)	0% (0,00)	2% (2,31)	0% (0,00)	50% (12,13)	0,074	17,14
	7,70	7,38	107	51% (11,22)	0% (0,00)	0% (0,00)	1% (1,57)	48% (10,94)	0,068	15,80
	8,70	8,42	106	56% (13,92)	0% (0,00)	0% (0,00)	4% (3,54)	40% (11,72)	0,080	18,62

Nota: in questa tabella sono riportati i risultati con carica virale rilevabile; all'interno del range dell'analisi sono inclusi i risultati da 1,0E+01 UI/ml a 1,0E+09 UI/ml.

^a Calcolata mediante la procedura SAS MISTA.

^b Numero di test validi con carica virale rilevabile.

^c Calcolata a partire dalla variabilità totale ottenuta con la procedura SAS MIXED.

^d CV (%) log-normale = $\sqrt{10^{[DS^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

CV (%) = percentuale del coefficiente di variazione; DNA = acido desossiribonucleico; HBV = virus dell'epatite B; N. = numero;

DS = deviazione standard; sqrt = radice quadrata.

Nella Tabella 28 riportata di seguito, la concordanza percentuale negativa (NPA) di cobas® 6800 System con i test dei membri del pannello negativi era del 100%.

Tabella 28 Concordanza percentuale negativa con membro del pannello negativo (tra lotti)

Concentrazione del DNA di HBV attesa	N. di test validi	Risultati positivi	Risultati negativi	Concordanza percentuale negativa ^a	IC 95% ^b
Negativo	106	0	106	100,00	(96,58, 100,00)

^a NPA = (numero di risultati negativi ÷ numero totale di test validi nel membro del pannello negativo) × 100.

^b Calcolato mediante il metodo dell'intervallo di confidenza binomiale esatto Clopper-Pearson.

IC = intervallo di confidenza; DNA = acido desossiribonucleico; HBV = virus dell'epatite B; N. = numero; NPA = concordanza percentuale negativa.

Riproducibilità

Il test di riproducibilità è stato eseguito in tre sedi per i genotipi A e C, utilizzando un lotto di reagente. Due operatori in ogni sede hanno eseguito l'analisi per 6 giorni. Sono state effettuate due analisi ogni giorno.

Tabella 29 di seguito riporta le percentuali attribuibili di varianza totale, le DS della precisione totale e i CV log-normali per genotipo e la concentrazione attesa di DNA di HBV log₁₀ per cobas® 6800 System.

Tabella 29 Percentuale attribuibile di varianza totale, deviazione standard della precisione totale e CV (%) log-normale della concentrazione di DNA di HBV (log₁₀ UI/ml) per genotipo e membro del pannello positivo (riproducibilità)

Genotipo	Concentrazione DNA HBV (log ₁₀ UI/ml)		N. di test ^b	Contributo % a varianza totale (CV (%) log-normale)					Precisione totale	
	Atteso	Media osservata ^a		Sito	Operatore	Giorno	Seduta	Stessa seduta	DS ^c	CV (%) log-normale ^d
A	1,48	1,48	107	1% (4,21)	0% (0,00)	5% (7,75)	1% (3,56)	93% (34,98)	0,153	36,41
	2,70	2,66	108	34% (9,53)	0% (0,00)	0% (0,00)	16% (6,40)	50% (11,52)	0,070	16,33
	3,70	3,60	108	34% (7,49)	2% (1,90)	7% (3,42)	0% (0,00)	56% (9,58)	0,055	12,80
	4,70	4,62	107	13% (5,40)	0% (0,00)	0% (0,00)	12% (5,28)	75% (13,05)	0,065	15,12
	5,70	5,63	107	37% (7,82)	1% (1,26)	0% (0,00)	0% (0,00)	62% (10,04)	0,055	12,81
	6,70	6,67	106	20% (5,99)	3% (2,16)	4% (2,57)	15% (5,16)	60% (10,48)	0,059	13,59
	7,70	7,37	108	3% (2,70)	2% (2,06)	0% (0,00)	0% (0,00)	95% (15,12)	0,067	15,50
	8,70	8,36	107	12% (4,32)	0% (0,00)	0% (0,00)	2% (1,53)	86% (11,46)	0,053	12,36

	Concentrazione DNA HBV (log ₁₀ UI/ml)			Contributo % a varianza totale (CV (%) log-normale)					Precisione totale	
Genotipo	Atteso	Media osservata ^a	N. di test ^b	Sito	Operatore	Giorno	Seduta	Stessa seduta	DS ^c	CV (%) log-normale ^d
C	1,48	1,48	107	2% (11,79)	1% (7,06)	0% (0,00)	0% (0,00)	97% (84,30)	0,324	86,20
	2,70	2,67	105	19% (5,94)	3% (2,22)	0% (0,00)	0% (0,00)	79% (12,27)	0,060	13,84
	3,70	3,61	107	14% (4,49)	0% (0,00)	7% (3,15)	0% (0,00)	78% (10,48)	0,051	11,84
	4,70	4,62	106	24% (6,45)	0% (0,00)	0% (0,00)	0% (0,00)	76% (11,59)	0,057	13,29
	5,70	5,65	107	18% (5,96)	0% (0,00)	3% (2,29)	0% (0,00)	80% (12,68)	0,061	14,22
	6,70	6,65	107	23% (6,35)	6% (3,26)	0% (0,00)	1% (1,33)	70% (11,10)	0,057	13,29
	7,70	7,34	106	0% (0,00)	3% (2,38)	0% (0,00)	13% (5,12)	84% (13,11)	0,062	14,30
	8,70	8,36	107	4% (2,24)	0% (0,00)	16% (4,35)	10% (3,46)	70% (9,09)	0,047	10,91

Nota: in questa tabella sono riportati i risultati con carica virale rilevabile; all'interno del range dell'analisi sono inclusi i risultati da 1,0E+01 UI/ml a 1,0E+09 UI/ml.

^a Calcolata mediante la procedura SAS MISTA.

^b Numero di test validi con carica virale rilevabile.

^c Calcolata a partire dalla variabilità totale ottenuta con la procedura SAS MIXED.

^d CV (%) log-normale = $\sqrt{10^{[DS^2 \times \ln(10)]} - 1} \times 100$.

CV (%) = percentuale del coefficiente di variazione; HBV = virus dell'epatite B; DNA = acido desossiribonucleico; N. = numero;

DS = deviazione standard; sqrt = radice quadrata.

Il valore di NPA era al 100% (106/106; IC 95%: dal 96,58% al 100%) utilizzando i test dei membri del pannello negativi su **cobas® 6800 System** come specificato nella Tabella 30 di seguito.

Tabella 30 Concordezza percentuale negativa con il componente del pannello negativo sul **cobas® 6800 System** (riproducibilità)

Concentrazione del DNA di HBV attesa	N. di test	Risultati positivi	Risultati negativi	Concordezza percentuale negativa ^a	IC 95% ^b
Negativo	106	0	106	100,00	(96,58, 100,00)

^a NPA = (numero di risultati negativi ÷ numero totale di test validi nel membro del pannello negativo) × 100.

^b Calcolato mediante il metodo dell'intervallo di confidenza binomiale esatto Clopper-Pearson.

IC = intervallo di confidenza; DNA = acido desossiribonucleico; HBV = virus dell'epatite B; N. = numero; NPA = concordezza percentuale negativa.

Utilità clinica

L'obiettivo dello studio era valutare la capacità del test di predire l'esito clinico.

Sono stati analizzati campioni residui ottenuti da circa 300 soggetti randomizzati a ricevere il trattamento per 100 settimane con entecavir più tenofovir o la monoterapia con entecavir durante uno studio clinico farmaceutico. Inoltre, sono stati esaminati campioni di circa 70 soggetti affetti da epatite B cronica HBeAg negativa provenienti dalla routine clinica che avevano ricevuto un trattamento di monoterapia con tenofovir (Tabella 31).

Tabella 31 Gruppi di trattamento

Studio clinico	Stato di HBeAg	Trattamento	Braccio di trattamento
Studio clinico farmaceutico ²¹	HBeAg (+)	Monoterapia con entecavir	Braccio I
		Entecavir + tenofovir	Braccio II
	HBeAg (-)	Monoterapia con entecavir	Braccio III (comprende fino a 17 soggetti della routine clinica)
		Entecavir + tenofovir	Braccio IV
Routine clinica	HBeAg (-)	Monoterapia con tenofovir	Braccio V

HBeAg = antigene "e" dell'epatite B.

I test con **cobas**® HBV sono stati eseguiti in tre sedi. Ogni sede è stata dotata di un **cobas**® 6800 System. Nell'ambito dello studio sono stati utilizzati tre lotti di kit di reagenti; ogni campione è stato analizzato con un lotto del kit. Tabella 32 di seguito riporta le caratteristiche demografiche e alla baseline dei soggetti i cui campioni sono stati analizzati su **cobas**® 6800 System; a questo studio hanno preso parte sia soggetti HBeAg (+) che HBeAg (-): i dati di queste due popolazioni sono stati analizzati separatamente.

Tabella 32 Caratteristiche demografiche e alla baseline dei soggetti

Caratteristiche	Statistiche
N. totale	396
Fascia d'età (anni), n (%)	
< 40	186 (47,0%)
≥ 40	210 (53,0%)
Età (anni)	
Media ± DS	42 ± 15,2
Mediana	42
Intervallo	17-81
Sesso, n (%)	
Maschio	276 (69,7%)
Femmina	120 (30,3%)

Razza, n (%)	
Asiatico	204 (51,5%)
Nero/Afroamericano	14 (3,5%)
Bianco/caucasico	169 (42,7%)
Altra	9 (2,3%)
Genotipo, n (%)	
A	64 (16,2%)
A e G	1 (0,3%)
B	62 (15,7%)
C	74 (18,7%)
D	105 (26,5%)
E	4 (1,0%)
F	10 (2,5%)
Misto	1 (0,3%)
Sconosciuto	75 (18,9%)
ALT normale alla baseline, n (%)	
Sì	23 (5,8%)
No	361 (91,2%)
Sconosciuto	12 (3,0%)
ALT alla baseline (UI/l)	
Media $\pm$ DS	140 $\pm$ 169,9
Mediana	96
Intervallo	14-1583
DNA di HBV ($\log_{10}$ UI/ml) alla baseline	
Media $\pm$ DS	6,6 $\pm$ 2,38
Mediana	7,4
Intervallo	-0,0-10,1
Categoria DNA di HBV, n (%)	
$< 2,0 \times 10^3$ UI/ml	41 (10,4%)
da $2,0 \times 10^3$ a $2,0 \times 10^4$ UI/ml	13 (3,3%)
$> 2,0 \times 10^4$ UI/ml	330 (83,3%)
Sconosciuto	12 (3,0%)

ALT = alanina aminotransferasi; HBV = virus dell'epatite B; DNA = acido desossiribonucleico; DS = deviazione standard.

Previsione della risposta alla terapia antivirale

Definizioni:

- Risposta virologica (VR) alla settimana 12 = diminuzione di DNA di HBV 2 log₁₀ rispetto alla baseline
- VR alla settimana 24 = DNA di HBV < 2000 UI/ml (HBeAg (+)) o < 50 UI/ml (HBeAg (-))
- VR alla settimana 48 = DNA di HBV < 2000 UI/ml (HBeAg (+)) o < 50 UI/ml (HBeAg (-))
- VR alla settimana 96 = DNA di HBV < 50 UI/ml (endpoint VR)
- Endpoint senza VR = DNA di HBV > 50 UI/ml alla settimana 96
- Risposta biochimica (BR) = normalizzazione del valore ALT rispetto alla baseline; ALT in paziente maschio < 30 UI/l e ALT in paziente femmina < 19 UI/l
- Perdita di HBeAg = conversione dallo stato HBeAg (+) allo stato HBeAg (-) durante la terapia

Previsione della risposta virologica alla settimana 96

In questo studio, la concentrazione di DNA di HBV alla baseline e le VR alle settimane 12, 24 e 48 di trattamento sono state utilizzate per valutare la capacità di prevedere l'esito (VR, BR o perdita di HBeAg) alla settimana 96 della terapia. La VR96 (DNA di HBV < 50 UI/ml) è stata valutata utilizzando i risultati di DNA di HBV provenienti da un test approvato. Quando è stato utilizzato il test **cobas®** HBV per misurare il DNA di HBV, una concentrazione alla baseline di DNA di HBV < 10⁸ UI/ml e le VR alle settimane 12, 24 e 48 si sono dimostrate altamente predittive della VR96 per tutti i bracci di trattamento inclusi in questo studio (PPV dal 79,6% al 100%) (Tabella 33 e Tabella 34 di seguito).

Tabella 33 Probabilità di ottenere una risposta virologica alla settimana 96 dato il DNA di HBV alla baseline < 10⁸ UI/ml in base al braccio di trattamento

Visita in corso di trattamento	Braccio di trattamento	Soggetti valutabili	PPV (%)		NPV (%)		OR
			Stima (IC al 95%)	n/N	Stima (IC al 95%)	n/N	Stima (IC al 95%)
Baseline	Braccio I	103	93,5 (82,5, 97,8)	43/46	31,6 (21,0, 44,5)	18/57	6,62 (1,81, 24,20)
	Braccio II	102	96,2 (87,0, 98,9)	50/52	4,0 (1,1, 13,5)	2/50	1,04 (0,14, 7,69)
	Braccio III	49	100,0 (92,1, 100,0)	45/45	25,0 (4,6, 69,9)	1/4	30,00 (0,83, 1087,42)
	Braccio IV	48	97,9 (88,9, 99,6)	46/47	100,0 (20,7, 100,0)	1/1	92,00 (1,81, 4686,43)
	Braccio V	30	90,0 (74,4, 96,5)	27/30	NC	0	9,00 (0,15, 541,69)

Note: valore predittivo positivo (PPV) = TP ÷ (TP + FP) o la probabilità di arrivare a una VR96 dato che il soggetto ha manifestato una risposta virologica a una visita specifica.

Valore predittivo negativo (NPV) = TN ÷ (FN + TN) o la probabilità di non arrivare a una VR96 dato che il soggetto non ha manifestato una risposta virologica a una visita specifica.

Rapporto di probabilità (OR) = (TP × TN) ÷ (FP × FN).

I valori IC 95% per PPV e NPV sono stati calcolati sulla base dell'IC del punteggio di Wilson.

0,5 è stato aggiunto alle celle vuote (TP, TN, FP o FN = 0), prima del calcolo dell'OR e dell'IC 95% corrispondente.

VR settimana 96 = DNA di HBV < 50 UI/ml (endpoint VR) dal test COBAS® Ampliprep/COBAS® Taqman® HBV, versione 2

Concentrazione di DNA di HBV alla baseline < 1E8 UI/ml in base a quanto determinato con **cobas®** 6800 System.

Braccio I: monoterapia con entecavir (HBeAg (+)).

Braccio II: entecavir + tenofovir (HBeAg (+)).

Braccio III: monoterapia con entecavir (HBeAg (-)).

Braccio IV: entecavir + tenofovir (HBeAg (-)).

Braccio V: monoterapia con tenofovir (HBeAg (-)).

IC = intervallo di confidenza; DNA = acido desossiribonucleico; FN = falso negativo; FP = falso positivo; HBeAg = antigene "e" dell'epatite B; HBV = virus dell'epatite B; NC = non calcolabile (poiché non ci sono soggetti con mancate risposte virologiche alla visita indicata); TN = vero negativo; TP = vero positivo; VR = risposta virologica; VR96 = risposta virologica alla settimana 96.

Tabella 34 Probabilità di ottenere una risposta virologica alla settimana 96 data la risposta virologica in una specifica visita prevista dal trattamento in base al braccio di trattamento

Visita in corso di trattamento	Braccio di trattamento	Soggetti idonei	PPV (%)		NPV (%)		OR
			Stima (IC al 95%)	n/N	Stima (IC al 95%)	n/N	Stima (IC al 95%)
Settimana 12	Braccio I	103	79,6 (70,8, 86,3)	82 / 103	NC	0	3,90 (0,08, 202,63)
	Braccio II	100	97,0 (91,5, 99,0)	97 / 100	NC	0	32,33 (0,54, 1921,79)
	Braccio III	48	97,8 (88,7, 99,6)	45 / 46	0,0 (0,0, 65,8)	0 / 2	11,25 (0,28, 445,33)
	Braccio IV	48	95,8 (86,0, 98,8)	46 / 48	NC	0	23,00 (0,36, 1485,21)
	Braccio V	21	85,7 (48,7, 97,4)	6 / 7	7,1 (1,3, 31,5)	1 / 14	0,46 (0,02, 8,69)
Settimana 24	Braccio I	103	96,1 (89,2, 98,7)	74 / 77	69,2 (50,0, 83,5)	18 / 26	55,50 (13,37, 230,39)
	Braccio II	102	96,7 (90,8, 98,9)	89 / 92	10,0 (1,8, 40,4)	1 / 10	3,30 (0,31, 35,08)
	Braccio III	47	100,0 (89,8, 100,0)	34 / 34	7,7 (1,4, 33,3)	1 / 13	5,67 (0,18, 179,94)
	Braccio IV	49	97,7 (87,9, 99,6)	42 / 43	16,7 (3,0, 56,4)	1 / 6	8,40 (0,45, 156,19)
	Braccio V	20	94,1 (73,0, 99,0)	16 / 17	33,3 (6,1, 79,2)	1 / 3	8,00 (0,35, 184,38)
Settimana 48	Braccio I	101	89,9 (81,9, 94,6)	80 / 89	91,7 (64,6, 98,5)	11 / 12	97,78 (11,28, 847,86)
	Braccio II	97	95,9 (89,9, 98,4)	93 / 97	NC	0	23,25 (0,41, 1328,83)
	Braccio III	46	100,0 (91,6, 100,0)	42 / 42	25,0 (4,6, 69,9)	1 / 4	28,00 (0,77, 1015,78)
	Braccio IV	48	97,8 (88,4, 99,6)	44 / 45	33,3 (6,1, 79,2)	1 / 3	22,00 (0,98, 494,79)
	Braccio V	28	92,3 (75,9, 97,9)	24 / 26	50,0 (9,5, 90,5)	1 / 2	12,00 (0,53, 273,05)

Note: valore predittivo positivo (PPV) = $TP \div (TP + FP)$ o la probabilità di arrivare a una VR96 dato che il soggetto ha manifestato una risposta virologica a una visita specifica.

Valore predittivo negativo (NPV) = $TN \div (FN + TN)$ o la probabilità di non arrivare a una VR96 dato che il soggetto non ha manifestato una risposta virologica a una visita specifica.

Rapporto di probabilità (OR) = $(TP \times TN) \div (FP \times FN)$.

I valori IC 95% per PPV e NPV sono stati calcolati sulla base dell'IC del punteggio di Wilson.

0,5 è stato aggiunto alle celle vuote (TP, TN, FP o FN = 0), prima del calcolo dell'OR e dell'IC 95% corrispondente.

Si considera raggiunta la VR96 se il soggetto ha un valore di DNA di HBV < 50 UI/ml ottenuto dal test COBAS® TaqMan® HBV per l'utilizzo con il sistema High Pure System alla settimana 96.

VR alla settimana 12 = diminuzione di DNA di HBV > 2 log₁₀ dalla baseline; VR alla settimana 24 = DNA di HBV < 2000 UI/ml (HBeAg (+)) o < 50 UI/ml (HBeAg (-)); VR alla settimana 48 = DNA di HBV < 2000 UI/ml (HBeAg (+)) o < 50 UI/ml (HBeAg (-)).

Braccio I: monoterapia con entecavir (HBeAg (+)).

Braccio II: entecavir + tenofovir (HBeAg (+)).

Braccio III: monoterapia con entecavir (HBeAg (-)).

Braccio IV: entecavir + tenofovir (HBeAg (-)).

Braccio V: monoterapia con tenofovir (HBeAg (-)).

IC = intervallo di confidenza; DNA = acido desossiribonucleico; FN = falso negativo; FP = falso positivo; HBeAg = antigene "e" dell'epatite B; HBV = virus dell'epatite B; NC = non calcolabile (poiché non ci sono soggetti con mancate risposte virologiche alla visita indicata);

TN = vero negativo; TP = vero positivo; VR = risposta virologica; VR96 = risposta virologica alla settimana 96.

Previsione della risposta biochimica alla settimana 96

Per un riepilogo della probabilità di ottenere una risposta biochimica alla settimana 96 a fronte di una specifica VR durante il trattamento alla settimana 12, 24 o 48, vedere la Tabella 35.

Il valore della VR alla settimana 12, 24 o 48 come elemento predittivo della BR96 variava in base alla settimana di VR e al braccio di trattamento.

Tabella 35 Probabilità di ottenere una risposta biochimica alla settimana 96 data la risposta virologica in una specifica visita prevista dal trattamento in base al braccio di trattamento

Visita in corso di trattamento	Braccio di trattamento	Soggetti idonei	PPV (%)		NPV (%)		OR
			Stima (IC al 95%)	n/N	Stima (IC al 95%)	n/N	Stima (IC al 95%)
Settimana 12	Braccio I	101	62,4 (52,6, 71,2)	63 / 101	NC	0	1,66 (0,03, 85,30)
	Braccio II	100	43,0 (33,7, 52,8)	43 / 100	NC	0	0,75 (0,01, 38,79)
	Braccio III	49	50,0 (36,1, 63,9)	23 / 46	66,7 (20,8, 93,9)	2 / 3	2,00 (0,17, 23,62)
	Braccio IV	49	32,7 (21,2, 46,6)	16 / 49	NC	0	0,48 (0,01, 25,57)
	Braccio V	21	40,0 (16,8, 68,7)	4 / 10	90,9 (62,3, 98,4)	10 / 11	6,67 (0,60, 74,51)
Settimana 24	Braccio I	102	66,2 (55,1, 75,8)	51 / 77	60,0 (40,7, 76,6)	15 / 25	2,94 (1,16, 7,45)
	Braccio II	103	44,6 (34,8, 54,7)	41 / 92	81,8 (52,3, 94,9)	9 / 11	3,62 (0,74, 17,68)
	Braccio III	51	47,2 (32,0, 63,0)	17 / 36	33,3 (15,2, 58,3)	5 / 15	0,45 (0,13, 1,57)
	Braccio IV	50	38,6 (25,7, 53,4)	17 / 44	100,0 (61,0, 100,0)	6 / 6	7,56 (0,40, 144,09)
	Braccio V	24	42,1 (23,1, 63,7)	8 / 19	80,0 (37,6, 96,4)	4 / 5	2,91 (0,27, 31,22)
Settimana 48	Braccio I	100	65,2 (54,8, 74,3)	58 / 89	81,8 (52,3, 94,9)	9 / 11	8,42 (1,71, 41,41)
	Braccio II	97	43,3 (33,9, 53,2)	42 / 97	NC	0	0,76 (0,01, 39,29)
	Braccio III	49	52,3 (37,9, 66,2)	23 / 44	40,0 (11,8, 76,9)	2 / 5	0,73 (0,11, 4,81)
	Braccio IV	49	37,0 (24,5, 51,4)	17 / 46	100,0 (43,9, 100,0)	3 / 3	3,52 (0,17, 74,51)
	Braccio V	28	33,3 (18,0, 53,3)	8 / 24	75,0 (30,1, 95,4)	3 / 4	1,50 (0,13, 16,82)

Note: valore predittivo positivo (PPV) = $TP \div (TP + FP)$ o la probabilità di arrivare a una BR96 dato che il soggetto ha manifestato una risposta virologica a una visita specifica.

Valore predittivo negativo (NPV) = $TN \div (FN + TN)$ o la probabilità di non arrivare a una BR96 dato che il soggetto non ha manifestato una risposta virologica a una visita specifica.

Rapporto di probabilità (OR) = $(TP \times TN) \div (FP \times FN)$.

I valori IC 95% per PPV e NPV sono stati calcolati sulla base dell'IC del punteggio di Wilson.

09198946001-03IT

0,5 è stato aggiunto alle celle vuote (TP, TN, FP o FN = 0), prima del calcolo dell'OR e dell'IC 95% corrispondente.

Braccio I: monoterapia con entecavir (HBeAg (+)).

Braccio II: entecavir + tenofovir (HBeAg (+)).

Braccio III: monoterapia con entecavir (HBeAg (-)).

Braccio IV: entecavir + tenofovir (HBeAg (-)).

Braccio V: monoterapia con tenofovir (HBeAg (-)).

La risposta biochimica viene definita come la normalizzazione della ALT (ALT < 30 UI/l per i pazienti maschi e ALT < 19 UI/l per le pazienti femmine) alla settimana 96 rispetto alla baseline per i soggetti con ALT elevata alla baseline.

VR alla settimana 12 = diminuzione di DNA di HBV > 2 log₁₀ rispetto alla baseline. VR alla settimana 24 = DNA di HBV < 2000 UI/ml (HBeAg (+)) o < 50 UI/ml (HBeAg (-)). VR alla settimana 48 = DNA di HBV < 2000 UI/ml (HBeAg (+)) o < 50 UI/ml (HBeAg (-)).

ALT = alanina aminotransferasi; IC = intervallo di confidenza; DNA = acido desossiribonucleico; FN = falso negativo; FP = falso positivo; HBeAg = antigene "e" dell'epatite B; HBV = virus dell'epatite B; NC = non calcolabile (poiché non ci sono soggetti con mancate risposte virologiche alla visita indicata); TN = vero negativo; TP = vero positivo; VR = risposta virologica; BR96 = risposta biochimica alla settimana 96.

Previsione della perdita di HBeAg

La perdita di HBeAg poteva essere valutata solo nei soggetti che erano HBeAg (+) alla baseline.

L'assenza di VR alla settimana 24 si è rivelata altamente predittiva della persistenza dell'HBeAg (i valori NPV erano ≥ 80,0% sia per il braccio I sia per il braccio II) e anche l'assenza di VR alla settimana 48 era indice della persistenza dell'HBeAg nel braccio I (NPV erano 100%) (Tabella 36). Poiché tutti i soggetti del regime terapeutico combinato (braccio II) avevano raggiunto le VR entro la settimana 48, non è stato possibile calcolare un NPV in quella fase per questo gruppo.

Tabella 36 Probabilità della perdita di HBeAg alla settimana 96 data la risposta virologica in una specifica visita prevista dal trattamento in base al braccio di trattamento

Visita in corso di trattamento	Braccio di trattamento	Soggetti idonei	PPV (%)		NPV (%)		OR
			Stima (IC al 95%)	n/N	Stima (IC al 95%)	n/N	Stima (IC al 95%)
Settimana 12	Braccio I	102	46,1 (36,7, 55,7)	47 / 102	NC	0	0,85 (0,02, 43,91)
	Braccio II	101	41,6 (32,5, 51,3)	42 / 101	NC	0	0,71 (0,01, 36,60)
Settimana 24	Braccio I	103	52,6 (41,6, 63,3)	41 / 78	80,0 (60,9, 91,1)	20 / 25	4,43 (1,51, 13,00)
	Braccio II	104	44,1 (34,4, 54,2)	41 / 93	81,8 (52,3, 94,9)	9 / 11	3,55 (0,73, 17,33)
Settimana 48	Braccio I	101	51,1 (41,0, 61,2)	46 / 90	100,0 (74,1, 100,0)	11 / 11	23,00 (1,31, 403,28)
	Braccio II	98	40,8 (31,6, 50,7)	40 / 98	NC	0	0,69 (0,01, 35,48)

Nota: valore predittivo positivo (PPV) = $TP \div (TP + FP)$ o la probabilità di arrivare a una perdita dell'HBeAg alla settimana 96 dato che il soggetto ha manifestato una risposta virologica a una visita specifica.

Valore predittivo negativo (NPV) = $TN \div (FN + TN)$ o la probabilità di non arrivare a una perdita dell'HBeAg alla settimana 96 dato che il soggetto non ha manifestato una risposta virologica a una visita specifica.

Rapporto di probabilità (OR) = $(TP \times TN) \div (FP \times FN)$.

I valori IC 95% per PPV e NPV sono stati calcolati sulla base dell'IC del punteggio di Wilson.

0,5 è stato aggiunto alle celle vuote (TP, TN, FP o FN = 0), prima del calcolo dell'OR e dell'IC 95% corrispondente.

Braccio I: monoterapia con entecavir (HBeAg (+)).

Braccio II: entecavir + tenofovir (HBeAg (+)).

Si raggiunge la perdita di HBeAg in caso di perdita di HBeAg durante la terapia.

VR alla settimana 12 = diminuzione di DNA di HBV > 2 log₁₀ dalla baseline; VR alla settimana 24 = DNA di HBV < 2000 UI/ml (HBeAg (+));

VR alla settimana 48 = DNA di HBV < 2000 UI/ml (HBeAg (+)).

IC = intervallo di confidenza; DNA = acido desossiribonucleico; FN = falso negativo; FP = falso positivo; HBeAg = antigene "e" dell'epatite B; HBV = virus dell'epatite B; NC = non calcolabile (poiché non ci sono soggetti con mancate risposte virologiche alla visita indicata); TN = vero negativo; TP = vero positivo; VR = risposta virologica; BR96 = risposta biochimica alla settimana 96.

I risultati hanno dimostrato che il test **cobas®** HBV è utile per il monitoraggio della carica virale nei soggetti con infezione cronica da HBV all'inizio e durante il trattamento antivirale. Questo studio ha dimostrato che la misurazione della concentrazione di DNA di HBV alla baseline, una diminuzione della concentrazione di DNA di HBV alla settimana 12, o concentrazioni di DNA di HBV al di sotto di soglie specifiche alla settimana 24 o 48 durante il trattamento sono state un valido fattore predittivo della risposta alla terapia; lo studio ha identificato i soggetti che hanno raggiunto la risposta virologica, la risposta biochimica o la perdita di HBeAg alla settimana 96 della terapia.

Conclusioni

Il test **cobas®** HBV è in grado di quantificare il livello di DNA di HBV per monitorare e prevedere la risposta alla terapia antivirale. I risultati di questo studio dimostrano l'utilità clinica di questo test nel determinare la risposta precoce al trattamento nella gestione dei pazienti con infezione cronica da HBV.

Equivalenza dei sistemi / confronto tra sistemi

L'equivalenza tra i **cobas®** 5800, **cobas®** 6800 e **cobas®** 8800 Systems è stata dimostrata attraverso alcuni studi sulle prestazioni.

I risultati presentati nelle Istruzioni per l'uso dimostrano l'equivalenza delle prestazioni tra tutti i sistemi.

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		

Simboli

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

Tabella 37 Simboli utilizzati sulle etichette dei prodotti diagnostici PCR di Roche

Age/DOB	Età o data di nascita		Dispositivo non idoneo ai test POC	QS IU/PCR	UI QS per reazione PCR; utilizzare le unità internazionali (UI) QS per la reazione PCR nel calcolo dei risultati.
	Software ausiliario		Dispositivo non idoneo all'autodiagnosi	SN	Numero di serie
Assigned Range [copies/mL]	Intervallo assegnato (copie/mL)		Distributore (Nota: il paese e/o la regione applicabili potrebbero essere indicati sotto il simbolo.)	Site	Sito
Assigned Range [IU/mL]	Intervallo assegnato (UI/mL)		Non riutilizzare	Procedure Standard	Procedura standard
EC REP	Mandatario nella Comunità Europea		Femmina	STERILE EO	Sterilizzazione con ossido di etilene
BARCODE	Foglio di dati del barcode		Solo per valutazione delle prestazioni IVD		Conservare al buio
LOT	Codice del batch	GTIN	Global Trade Item Number		Limiti di temperatura
	Rischio biologico		Importatore		File di definizione del test
REF	Numero di catalogo	IVD	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>		Alto
	Contrassegno di conformità CE: questo dispositivo è conforme ai requisiti pertinenti del marchio CE relativamente ai dispositivi medico-diagnostici <i>in vitro</i>	LLR	Limite inferiore dell'intervallo assegnato	Procedure UltraSensitive	Procedura ultrasensibile
Collect Date	Data di raccolta		Maschio	UDI	Identificazione univoca del dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Fabbricante	ULR	Limite superiore dell'intervallo assegnato
	Contenuto sufficiente per <n> test	CONTROL -	Controllo negativo	Urine Fill Line	Riga di riempimento urina
CONTENT	Contenuto del kit		Non sterile	Rx Only	Solo USA: la legge federale statunitense limita la vendita di questo dispositivo ai medici o su presentazione di prescrizione medica.
CONTROL	Controllo		Nome del paziente		Utilizzare entro la data
	Data di produzione		Numero del paziente		
	Dispositivo idoneo ai test POC		Staccare qui		
	Dispositivo idoneo all'autodiagnosi	CONTROL +	Controllo positivo		
		QS copies / PCR	Copie QS per reazione PCR; usare le copie QS per reazione PCR nel calcolo dei risultati.		

Assistenza tecnica

Per richiedere assistenza tecnica, contattare la nostra filiale locale:

https://www.roche.com/about/business/roche_worldwide.htm

Produttore e importatore

Tabella 38 Produttore e importatore



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

Made in USA



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Marchi e brevetti

Vedere <https://diagnostics.roche.com/us/en/about-us/patents>

Copyright

©2022 Roche Molecular Systems, Inc.



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116
68305 Mannheim
Germany



Bibliografia

1. Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38:S158-68. PMID: 15602165.
2. Weinbaum CM, Williams I, Mast EE, et al. Recommendations for identification and public health management of persons with chronic hepatitis B virus infection. *MMWR Recomm Rep*. 2008;57:1-20. PMID: 18802412.
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;103:1824-33. PMID: 18479498.
4. Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*. 2008;359:1486-500. PMID: 18832247.
5. Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection and long-term outcome under treatment. *Liver Int*. 2009;29 Suppl 1:100-7. PMID: 19207972.
6. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. *J Hepatol*. 2008;48:335-52. PMID: 18096267.
7. But DY, Lai CL, Yuen MF. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008;14:1652-6. PMID: 18350595.
8. Kao JH. Diagnosis of hepatitis B virus infection through serological and virological markers. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2008;2:553-62. PMID: 19072403.
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;135:1192-9. PMID: 18722377.
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;54:1337-46. PMID: 19242792.
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;150:104-10. PMID: 19124811.
12. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992;10:413-7. PMID: 1368485.
13. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94. PMID: 8908518.
14. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*. 1990;93:125-8. PMID: 2227421.
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;134:405-15. PMID: 18242209.

16. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, et al. 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. PMID: 11339072.
17. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-93. PMID: 7845459.
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;80:869-78. PMID: 7697717.
19. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF>. Accessed December 2, 2020.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. https://clsi.org/media/1459/m29a4_sample.pdf. Accessed December 2, 2020.
21. Lok AS, Trinh H, Carosi G, et al. Efficacy of entecavir with or without tenofovir disoproxil fumarate for nucleos(t)ide-naïve patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*. 2012;143:619-28.e1. PMID: 22643350.

Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev. 3.0 9/2022	Aggiornamento della prima pagina, della Tabella 2 e della Tabella 3 con inserimento dei numeri di parte (P/N) dei kit di controllo. Aggiornamento della sezione Marchi e brevetti, collegamento incluso. Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.