

cobas[®] **HBV**

Teste quantitativo de ácidos nucleicos para utilização com os cobas[®] **6800/8800 Systems**

Para diagnóstico in vitro

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

Índice

Utilização prevista	4
Resumo e explicação do teste	4
Reagentes e materiais	7
Reagentes e controlos do cobas® HBV	7
Reagentes cobas omni para preparação da amostra.....	10
Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes	11
Materiais adicionais necessários.....	12
Equipamentos e software necessários.....	12
Precauções e requisitos de manuseamento.....	13
Advertências e precauções	13
Manuseamento de reagentes.....	14
Boas práticas de laboratório.....	14
Colheita, transporte e armazenamento de amostras.....	14
Amostras.....	15
Instruções de utilização	16
Notas de procedimento	16
Execução do cobas® HBV	16
Resultados	17
Controlo de qualidade e validade dos resultados.....	17
Interpretação dos resultados.....	18
Limitações do procedimento	18
Avaliação não clínica do desempenho	19
Características principais de desempenho	19
Limite de deteção (LoD)	19
Intervalo linear	21
Precisão intra-laboratório.....	24

Determinação e verificação de genótipo.....	25
Especificidade.....	29
Especificidade analítica.....	29
Especificidade analítica – substâncias interferentes.....	30
Correlação de métodos.....	31
Equivalência de matrizes – Plasma EDTA e soro.....	32
Falha global do sistema.....	32
Contaminação cruzada.....	33
Informações adicionais.....	33
Caraterísticas principais do teste.....	33
Símbolos.....	34
Fabricante e distribuidores.....	35
Marcas comerciais e patentes.....	35
Direitos de autor.....	35
Bibliografia.....	36
Revisão do documento.....	38

Utilização prevista

O cobas® HBV é um teste *in vitro* de amplificação de ácidos nucleicos para a quantificação do ADN do vírus da hepatite B (HBV) em plasma EDTA humano ou soro de indivíduos infetados com HBV.

Este teste destina-se a ser utilizado como auxiliar no controlo de doentes com infeção crónica pelo HBV que estejam a ser sujeitos a terapia anti-viral. O teste pode ser utilizado para medir os níveis de ADN do HBV na linha de base e durante o tratamento para auxiliar na avaliação da resposta ao tratamento. Os resultados do cobas® HBV devem ser interpretados no contexto de todos os resultados clínicos e laboratoriais relevantes.

Resumo e explicação do teste

Fundamentos

O HBV é um de vários vírus conhecidos como causadores de hepatite viral. Mais de 2 mil milhões de pessoas em todo o mundo foram infetadas pelo HBV e mais de 350 milhões destes casos são portadores cronicamente infetados.¹ O HBV é uma das causas principais de doenças do fígado nos Estados Unidos da América (EUA), apesar de se registar uma menor incidência de infeção aguda associada à vacinação e às precauções universais na utilização de agulhas.² Estima-se que a prevalência geral da infeção por HBV nos EUA se encontre entre os 0,3% e os 0,5%, sendo 47% a 70% dos casos atribuídos a pessoas nascidas fora dos EUA.² No entanto, programas de rastreio direcionados indicaram um aumento de 15% das taxas de prevalência em determinadas populações imigrantes de elevado risco.³ Os pacientes com infeções crónicas por HBV correm um elevado risco de complicações decorrentes da infeção a longo prazo, incluindo hepatite crónica, cirrose e carcinoma hepatocelular.⁴⁻⁷ Marcadores serológicos são geralmente utilizados como indicadores de diagnóstico e/ou prognóstico de infeções pelo HBV crónicas ou agudas.⁸ Os centros de controlo e prevenção de doença (Centers for Disease Control and Prevention) nos EUA alargaram as suas recomendações para rastreios de rotina para indivíduos de alto risco, incluindo agora rastreios em populações nas quais a prevalência do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) é superior a 2%, abrangendo pessoas de regiões endémicas do mundo (tal como a Ásia e África), homens que têm relações sexuais com outros homens e utilizadores de drogas injetáveis.²

O marcador mais comum da infeção por HBV é a presença do HBsAg.⁸ Embora os portadores possam eliminar o HBsAg e desenvolver um anticorpo para o HBsAg, parece contudo existir um risco de desenvolvimento de complicações hepáticas graves a longo prazo.^{9,10} O antígeno HBe (HBeAg) é normalmente utilizado como marcador secundário para indicação da replicação de HBV ativa associada a doença hepática progressiva. A não eliminação do HBeAg parece aumentar o risco de doenças hepáticas em fase final.^{9,10} As estirpes variantes de mutantes pré-core de HBV podem perder a capacidade de produzir HBeAg mesmo quando uma infeção ativa está presente, limitando a utilização deste marcador para monitorizar a progressão da doença.⁷

Fundamentos dos testes HBV

O ADN do HBV em plasma EDTA e soro pode ser quantificado por tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, tal como PCR.¹¹⁻¹⁴ Várias diretrizes chave recomendam a utilização da metodologia de PCR em tempo real para a quantificação do ADN do HBV principalmente devido a uma maior sensibilidade e um intervalo linear mais amplo.^{15,16}

Explicação do teste

O cobas® HBV é um teste quantitativo que é executado no cobas® 6800 System e no cobas® 8800 System. O cobas® HBV permite a deteção e quantificação do ADN do HBV em plasma EDTA ou soro de pacientes infetados para utilização em laboratórios que suportem ensaios clínicos bem como prática médica de rotina na gestão de pacientes com HBV. É utilizada uma sonda única para detetar e quantificar, mas não para discriminar o genótipo A-H. A carga viral é quantificada em relação a um padrão de quantificação de ADN não HBV (DNA-QS), que é introduzido em cada amostra durante a preparação da amostra. O DNA-QS funciona também para monitorizar toda a preparação de amostras e o processo de amplificação por PCR. Adicionalmente, o teste utiliza três controlos externos: um controlo positivo de título elevado, um controlo positivo de título baixo e um controlo negativo.

Princípios do procedimento

O cobas® HBV baseia-se na preparação de amostras totalmente automática (extração e purificação dos ácidos nucleicos) seguida de amplificação e deteção por PCR. Os cobas® 6800/8800 Systems são constituídos pelo módulo de abastecimento de amostras, o módulo de transferência, o módulo de processamento e o módulo analítico. A gestão automática de dados é desempenhada pelo software cobas® 6800/8800, que atribui resultados a todos os testes. As diferentes possibilidades de resultados são alvo não detetado, < LLoQ (limite inferior de quantificação), > ULoQ (limite superior de quantificação) ou ADN do HBV detetado, um valor no intervalo linear $LLoQ < x < ULoQ$. Os resultados podem ser examinados diretamente no ecrã do sistema ou impressos como um relatório.

Os ácidos nucleicos de amostras de pacientes, de controlos externos e de moléculas adicionadas de ADN lambda (DNA-QS) são extraídos simultaneamente.

O ácido nucleico viral é libertado ao adicionar proteínase e reagente de lise à amostra. Os ácidos nucleicos libertados ligam-se à superfície de sílica das partículas de vidro magnéticas adicionadas. As substâncias não ligadas e impurezas, tais como proteínas desnaturadas, detritos celulares e potenciais inibidores da PCR, são removidas com os posteriores passos com reagente de lavagem, e os ácidos nucleicos purificados são eluídos das partículas de vidro magnéticas com tampão de eluição a alta temperatura.

A amplificação seletiva dos ácidos nucleicos alvo da amostra é conseguida através da utilização de primers senso e anti-senso específicos do vírus-alvo que são selecionados de regiões altamente conservadas do HBV. A amplificação seletiva de DNA-QS é conseguida através da utilização de primers senso e anti-senso específicos da sequência-alvo que são selecionados para que não tenham qualquer homologia com o genoma do HBV. É utilizada uma enzima de polimerase do ADN termoestável para a amplificação. A mistura principal inclui trifosfato de desoxiuridina (dUTP), em vez de trifosfato de desoxitimidina (dTTP), que é incorporado no ADN acabado de sintetizar (amplicon).^{14,17,18} Quaisquer amplicons contaminantes de corridas de PCR anteriores são eliminados pela enzima AmpErase, que está incluída na mistura de PCR durante o primeiro passo do ciclo térmico. No entanto, os amplicons acabados de formar não são eliminados, uma vez que a enzima AmpErase fica inativa quando exposta a temperaturas acima dos 55 °C.

A mistura principal do **cobas**® HBV contém sondas de detecção que são específicas para sequências alvo do HBV e dos ácidos nucleicos QS, respetivamente. As sondas de detecção específicas do HBV e do ADN-QS estão marcadas com um de dois corantes fluorescentes únicos, que atua como um reporter. Cada sonda tem também um segundo corante, que atua como um supressor. Os dois corantes reporter são medidos a comprimentos de onda definidos, permitindo assim a detecção e discriminação simultânea do alvo amplificado do HBV e do DNA-QS.^{12,13} Quando não ligado à sequência alvo, o sinal fluorescente da sonda intacta é suprimido pelo corante supressor. Durante o passo de amplificação por PCR, a hibridização das sondas com o ADN alvo específico, em cadeia simples resulta na sua clivagem pela atividade exonuclease 5' a 3' da polimerase do ADN, originando a separação dos corantes de sinalização e de supressão e a geração de um sinal fluorescente. Com cada ciclo da PCR, são geradas quantidades crescentes de sondas clivadas e o sinal cumulativo do corante sinalizador aumenta concomitantemente. Uma vez que os dois corantes reporter específicos são medidos a comprimentos de onda definidos, é possível a detecção e discriminação simultânea do alvo amplificado do HBV e do DNA-QS.

Reagentes e materiais

Reagentes e controlos do cobas® HBV

Todos os reagentes e controlos não abertos devem ser armazenados conforme recomendado na Tabela 1 até à Tabela 4.

Tabela 1 cobas® HBV

cobas® HBV Conservar entre 2 e 8 °C Cassete de 96 testes (P/N 07000979190)		
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit 96 testes
Solução de proteinase (PASE)	Tampão Tris, < 0,05% de EDTA, cloreto de cálcio, acetato de cálcio, 8% de proteinase EUH210: Ficha de segurança fornecida a pedido. EUH208: Contém subtilisina. Pode desencadear uma reação alérgica.	13 ml
Padrão de quantificação de ADN (DNA-QS)	Tampão Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% estrutura de ADN não HBV contendo uma região de ligação de primer não HBV e uma região de sonda única (ADN não infeccioso), 0,002% de ARN de Poli rA (sintético), < 0,1% de azida de sódio	13 ml
Tampão de Eluição (EB)	Tampão Tris, 0,2% de 4-hidroxibenzoato de metilo	13 ml
Reagente Master Mix 1 (MMX-R1)	Acetato de manganês, hidróxido de potássio, < 0,1% de azida sódica	5,5 ml
Reagente Master Mix 2 de HBV (HBV MMX-R2)	Tampão de tricina, acetato de potássio, 18% de sulfóxido de dimetilo, glicerol, < 0,1% de Tween 20, EDTA, < 0,12% de dATP, dCTP, dGTP, dUTPs, < 0,01% de primers senso e anti-senso do HBV, < 0,01% primers senso e anti-senso do padrão de quantificação, < 0,01% de sondas de oligonucleótido marcadas com fluorescência específicas do HBV e do padrão de quantificação do HBV, < 0,01% aptâmero oligonucleotídico, < 0,01% de polimerase do ADN Z05D, < 0,10% de enzima AmpErase (uracil-N-glicosilase) (de origem microbiana), < 0,1% de azida de sódio	6 ml

* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE

** Substância perigosa

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

Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança*
Controlo positivo baixo de HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 L(+))C)	<p>< 0,001% de armored ARN do HIV-1 grupo M, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, < 0,001% de ADN (de plasmídeo) sintético do HBV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago Lambda, < 0,001% de (armored) ARN sintético do HCV, encapsulado na proteína do envelope de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, anticorpos do HBc; ARN do HIV-1, ARN do HIV-2, ARN do HCV e ADN do HBV não detetáveis por métodos de PCR</p> <p>0,1% de conservante ProClin® 300**</p>	5,2 ml (8 × 0,65 ml)	  <p>ADVERTÊNCIA</p> <p>H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea.</p> <p>H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.</p> <p>P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.</p> <p>P273: Evitar a libertação para o ambiente.</p> <p>P280: Usar luvas de proteção.</p> <p>P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.</p> <p>P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.</p> <p>P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.</p> <p>55965-84-9 Massa de reação de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [n.º EC 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º EC 220-239-6] (3:1).</p>
Controlo positivo alto de HBV/HCV/HIV-1 (HBV/HCV/HIV-1 H(+))C)	<p>< 0,001% de armored ARN do HIV-1 grupo M (ARN não infeccioso em bacteriófago MS2), < 0,001% de ADN (de plasmídeo) sintético do HBV, encapsulado em proteína coberta de bacteriófago Lambda, < 0,001% de (armored) ARN sintético do HCV, encapsulado em proteína coberta de bacteriófago MS2, plasma humano normal, não-reativo em testes aprovados para anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, anticorpos do HBc; ARN do HIV-1, ARN do HIV-2, ARN do HCV e ADN do HBV não detetáveis por métodos de PCR</p> <p>0,1% de conservante ProClin® 300**</p>	5,2 ml (8 × 0,65 ml)	  <p>ADVERTÊNCIA</p> <p>H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea.</p> <p>P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.</p> <p>P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.</p> <p>P280: Usar luvas de proteção.</p> <p>P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.</p> <p>P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.</p> <p>P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.</p> <p>55965-84-9 Massa de reação de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [n.º EC 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º EC 220-239-6] (3:1).</p>

* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE

** Substância perigosa

Tabela 3 cobas® NHP Negative Control Kit

cobas® NHP Negative Control Kit

Conservar entre 2 e 8 °C

(P/N 07002220190)

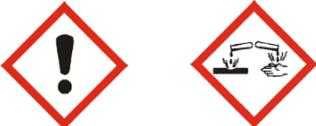
Componentes do kit	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança*
Controlo negativo de plasma humano normal (NHP-NC)	Plasma humano normal, não-reactivo em testes aprovados para anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, anticorpos do HBc; ARN do HIV-1, ARN do HIV-2, ARN do HCV e ADN do HBV não detetável por métodos de PCR. < 0,1% de conservante ProClin® 300**	16 ml (16 × 1 ml)	 <p>ADVERTÊNCIA</p> <p>H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea.</p> <p>P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.</p> <p>P272: A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.</p> <p>P280: Usar luvas de proteção.</p> <p>P333 + P313: Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.</p> <p>P362 + P364: Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.</p> <p>P501: Eliminar o conteúdo/recipiente numa instalação de eliminação de resíduos aprovada.</p> <p>55965-84-9 mistura de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona [n.º EC 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-ona [n.º EC 220-239-6] (3:1)</p>

* A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE

** Substância perigosa

Reagentes cobas omni para preparação da amostra

Tabela 4 Reagentes cobas omni para preparação da amostra*

Reagentes	Ingredientes dos reagentes	Quantidade por kit	Símbolo e advertência de segurança**
cobas omni MGP Reagent (MGP) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997546190)	Partículas de vidro magnéticas, Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	480 testes	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997511190)	Tampão Tris, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo, < 0,1% de azida sódica	4 × 875 ml	Não aplicável
cobas omni Lysis Reagent (LYS) Conservar entre 2 e 8 °C (P/N 06997538190)	43% (p/p) de tiocianato de guanidina***, 5% (p/v) de polidocanol***, 2% (p/v) de ditiotreitol***, citrato de sódio dihidratado	4 × 875 ml	 <p>PERIGO</p> <p>H302 + H332: Nocivo por ingestão e por inalação. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H412: Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. EUH032: Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P273: Evitar a libertação para o ambiente. P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. P303 + P361 + P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água. P304 + P340 + P310: EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P305 + P351 + P338 + P310: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. 593-84-0 Tiocianato de guanidina 9002-92-0 Polidocanol 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercaptobutano-2,3-diol</p>
cobas omni Wash Reagent (WASH) Conservar entre 15 e 30 °C (P/N 06997503190)	Citrato de sódio dihidratado, 0,1% de 4-hidroxibenzoato de metilo	4,2 l	Não aplicável

* Estes reagentes não estão incluídos no kit do teste cobas® HBV. Consulte a lista dos materiais adicionais necessários (Tabela 7).

** A rotulagem relativa à segurança de produtos baseia-se essencialmente na diretiva GHS da UE.

*** Substância perigosa.

Requisitos de manuseamento e armazenamento de reagentes

Os reagentes deverão ser armazenados e manuseados conforme especificado na Tabela 5 e Tabela 6.

Quando os reagentes não estiverem carregados nos cobas® 6800/8800 Systems, armazene-os à temperatura correspondente especificada na Tabela 5.

Tabela 5 Armazenamento de reagentes (quando o reagente não se encontra no sistema)

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

Os reagentes carregados nos cobas® 6800/8800 Systems são armazenados a temperaturas apropriadas e as datas de validade são controladas pelo sistema. Os cobas® 6800/8800 Systems apenas permitem que os reagentes sejam usados se as condições indicadas na Tabela 6 forem satisfeitas. O sistema impede automaticamente a utilização de reagentes expirados. A Tabela 6 permite ao utilizador compreender as condições de manuseamento de reagentes impostas pelos cobas® 6800/8800 Systems.

Tabela 6 Condições de manuseamento de reagentes impostas pelos cobas® 6800/8800 Systems

Reagente	Prazo de validade do kit	Estabilidade do kit aberto	Número de corridas para as quais este kit pode ser usado	Estabilidade a bordo do equipamento (tempo acumulado a bordo do equipamento fora do frigorífico)
cobas® HBV	Data não ultrapassada	30 dias desde a primeira utilização	Máx. 10 corridas	Máx. 8 horas
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	Data não ultrapassada	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 8 horas
cobas® NHP Negative Control Kit	Data não ultrapassada	Não aplicável	Não aplicável	Máx. 10 horas
cobas omni Lysis Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni MGP Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Specimen Diluent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável
cobas omni Wash Reagent	Data não ultrapassada	30 dias desde o carregamento*	Não aplicável	Não aplicável

* O tempo é medido a partir da primeira vez que o reagente é carregado nos cobas® 6800/8800 Systems.

Materiais adicionais necessários

Tabela 7 Materiais e consumíveis para utilizar nos cobas® 6800/8800 Systems

Material	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
Saco de resíduos sólidos	07435967001
Reservatório de resíduos sólidos	07094361001

Equipamentos e software necessários

O software **cobas®** 6800/8800 e o pacote de análise **cobas®** HBV deverão estar instalados no(s) equipamento(s). O servidor IG (Instrument Gateway) será fornecido com o sistema.

Tabela 8 Equipamentos

Equipamento	P/N
cobas® 6800 System (Opção Móvel)	05524245001 e 06379672001
cobas® 6800 System (Fixo)	05524245001 e 06379664001
cobas® 8800 System	05412722001
Módulo de abastecimento de amostras	06301037001

Para mais informações sobre os tubos primários e secundários aceites nos equipamentos, consulte o Manual do Operador dos **cobas®** 6800/8800 Systems.

Nota: Contacte o representante local da Roche para uma lista de pedidos detalhada de racks de amostras, racks de pontas obstruídas e suportes de racks aceites nos equipamentos.

Precauções e requisitos de manuseamento

Advertências e precauções

À semelhança do que sucede com qualquer procedimento de teste, boas práticas de laboratório são essenciais para um desempenho adequado deste ensaio. Em virtude da elevada sensibilidade deste teste, deverão ser tomadas as devidas precauções para manter os reagentes e as misturas de amplificação livres de contaminação.

- Apenas para diagnóstico *in vitro*.
- O **cobas® HBV** não foi avaliado quanto à utilização como um teste de rastreio para a presença do HBV no sangue ou em produtos derivados do sangue, nem como um teste de diagnóstico visando confirmar a presença de infeção por HBV.
- Todas as amostras de paciente deverão ser manuseadas como se estivessem infetadas, utilizando boas práticas de laboratório, conforme descrito em Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories e no documento M29-A4 do CLSI.^{19,20} Este procedimento só deve ser efetuado por pessoal com experiência no manuseamento de material com risco biológico e na utilização do teste **cobas® HBV** e **cobas® 6800/8800 Systems**.
- Todos os materiais de origem humana devem ser considerados potencialmente infecciosos e devem ser manipulados com as precauções universais. Se ocorrer derrame, desinfete imediatamente com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água destilada ou desionizada (lixívia doméstica diluída a 1:10) ou siga os procedimentos apropriados do laboratório.
- O **cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit** e o **cobas® NHP Negative Control Kit** contêm plasma derivado do sangue humano. O material de origem foi submetido a testes aprovados de anticorpos e considerado como não-reativo para a presença de anticorpos do HCV, anticorpos do HIV-1/2, HBsAg, e anticorpos do HBc. Os testes de plasma humano normal por métodos de PCR não apresentaram quaisquer ARN do HIV-1 (grupos M e O), ARN do HIV-2, ARN do HCV e ADN do HBV detetáveis. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer uma garantia completa de que os produtos derivados do sangue humano não transmitirão agentes infecciosos.
- **Não congele sangue total ou quaisquer amostras armazenadas em tubos primários.**
- Para garantir o desempenho ideal do teste, utilize apenas os materiais consumíveis necessários fornecidos ou especificados.
- Estão disponíveis Folhas de Dados de Segurança (SDS, Safety Data Sheets) que podem ser solicitadas ao representante local da Roche.
- Para garantir que o teste é executado corretamente, siga rigorosamente os procedimentos e diretrizes fornecidos. Qualquer desvio dos procedimentos e diretrizes poderá afetar o desempenho ideal do teste.
- Poderão ocorrer resultados positivos falsos se durante a manipulação e processamento das amostras, o carryover das amostras não for controlado adequadamente.

Manuseamento de reagentes

- Para evitar carryover de amostras ou controlos, manipule todos os reagentes, controlos e amostras de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Inspeccione visualmente todas as cassetes de reagente, diluentes, reagente de lise e reagente de lavagem, antes dos mesmos serem utilizados, para se certificar de que não existem quaisquer sinais de fugas. Se existir algum indício de fuga, não utilize esse material para testes.
- O **cobas omni** Lysis Reagent contém tiocianato de guanidina, um produto químico potencialmente perigoso. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras.
- O kit de teste **cobas**® HBV, o **cobas omni** MGP Reagent e o **cobas omni** Specimen Diluent contém azida sódica como conservante. Evite o contacto dos reagentes com a pele, os olhos ou com membranas mucosas. Em caso de contacto, lave imediatamente a zona afetada com água abundante para evitar queimaduras. No caso de derrame destes reagentes, dilua com água antes de passar com um pano para secar.
- Não permita que **cobas omni** Lysis Reagent, que contém tiocianato de guanidina, entre em contacto com solução de hipoclorito de sódio (lixívia). Esta mistura pode produzir um gás altamente tóxico.
- Elimine todos os materiais que tenham entrado em contacto com amostras e reagentes, de acordo com regulamentações nacionais, estaduais e locais.

Boas práticas de laboratório

- Não efetue pipetagem com a boca.
- Não coma, não beba nem fume nas áreas de trabalho.
- Use luvas de laboratório, bata de laboratório e proteção ocular quando manusear amostras e reagentes. Para evitar contaminação, as luvas devem ser trocadas entre o manuseamento de amostras e o manuseamento de kits **cobas**® HBV e reagentes **cobas omni**. Evite contaminar as luvas quando manusear amostras e controlos.
- Lave muito bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes do kit, e depois de retirar as luvas.
- Limpe e desinfete cuidadosamente todas as superfícies de trabalho do laboratório com uma solução preparada de fresco de hipoclorito de sódio a 0,5% em água desionizada ou destilada (diluir lixívia doméstica a 1:10). A seguir, limpe a superfície com um pano com etanol a 70%.
- Se ocorrer um derrame no equipamento **cobas**® 6800/8800, siga as instruções do Manual do Operador dos **cobas**® 6800/8800 Systems, para limpar e descontaminar adequadamente as superfícies do(s) instrumento(s).

Colheita, transporte e armazenamento de amostras

Nota: Manuseie todas as amostras e controlos tendo em conta a possibilidade de transmitirem agentes infecciosos.

Armazene todas as amostras às temperaturas especificadas.

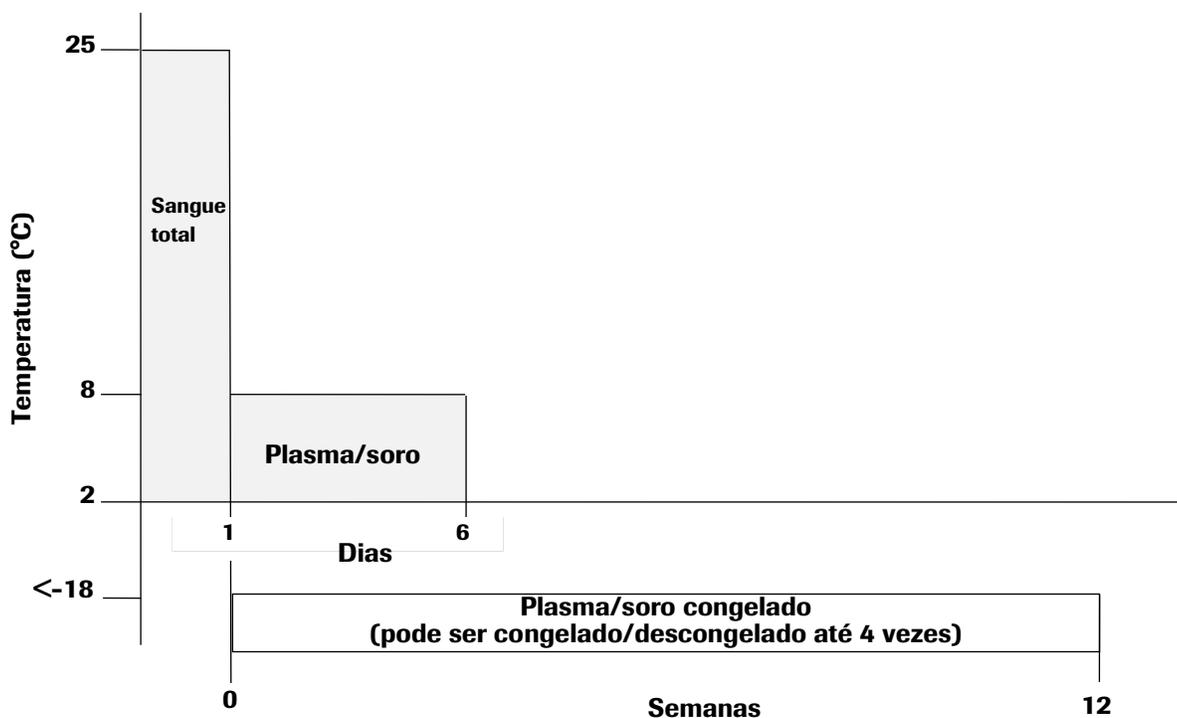
A estabilidade das amostras é afetada por altas temperaturas.

Se utilizar amostras congeladas em tubos secundários, coloque as amostras à temperatura ambiente (15-30° C) até ficarem completamente descongeladas e, em seguida, misture brevemente (por ex., com agitação forte durante 3 a 5 segundos) e centrifugue para colher todo o volume de amostra no fundo do tubo.

Amostras

- O sangue deve ser colhido em tubos de separação de soro SST™, em tubos de preparação de plasma para métodos de teste de diagnóstico molecular BD Vacutainer® PPT™ ou em tubos esterilizados que utilizem EDTA como anticoagulante. Siga as instruções do fabricante dos tubos de amostra. Consulte a Figura 1.
- O sangue total recolhido em tubos de separação de soro SST™, em tubos de preparação de plasma para métodos de teste de diagnóstico molecular BD Vacutainer® PPT™ ou em tubos esterilizados que utilizem EDTA como anticoagulante pode ser armazenado e/ou transportado durante até 24 horas a entre 2 °C e 25 °C antes da preparação do plasma/soro. A centrifugação deve ser desempenhada de acordo com as instruções do fabricante.
- Após a separação, as amostras de plasma/soro podem ser armazenadas em tubos secundários durante 6 dias entre os 2 e os 8 °C ou até 12 semanas a ≤ -18 °C.
- No caso de armazenamento de longo prazo até 6 meses, recomenda-se uma temperatura de ≤ -60 °C.
- As amostras de plasma/soro são estáveis até quatro ciclos de congelamento/descongelamento quando congeladas a temperatura ≤ -18 °C.

Figura 1 Condições de armazenamento de amostras



- Caso seja necessário expedir amostras, estas devem ser embaladas e rotuladas em conformidade com os regulamentos locais e/ou internacionais aplicáveis ao transporte de amostras e agentes etiológicos.

Instruções de utilização

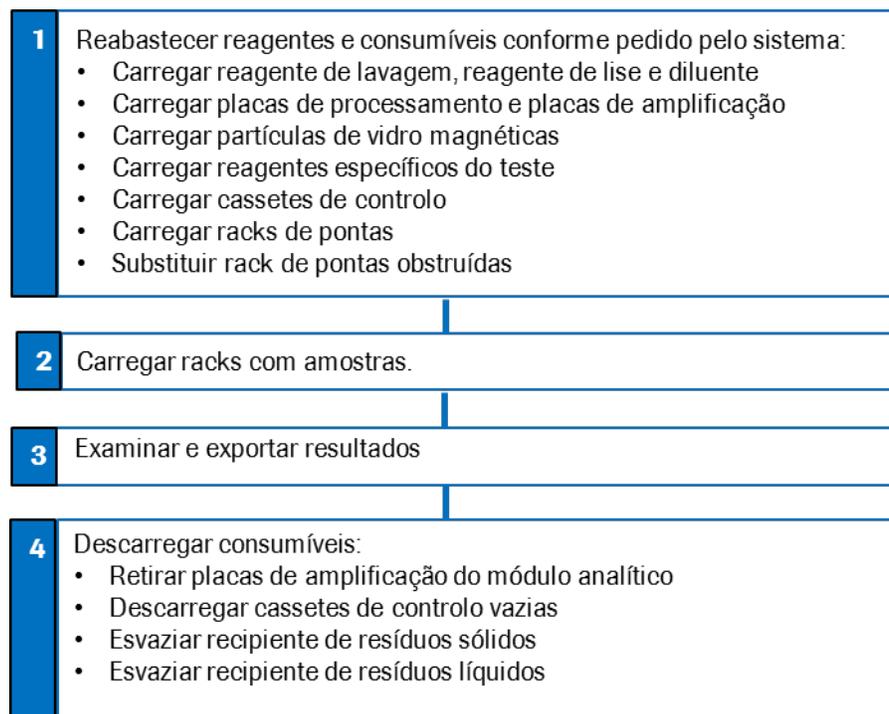
Notas de procedimento

- Não utilize reagentes do teste **cobas® HBV**, **cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit**, **cobas® NHP Negative Control Kit** ou reagentes **cobas® omni** depois de expirados os respetivos prazos de validade.
- Não reutilize consumíveis. Os consumíveis são para uma única utilização.
- Para a manutenção adequada dos equipamentos, consulte o Manual do Operador dos **cobas® 6800/8800 Systems**.

Execução do **cobas® HBV**

É possível executar o **cobas® HBV** com dois volumes mínimos de amostra: 350 µl (para o fluxo de trabalho de amostras de 200 µl) e 650 µl (para o fluxo de trabalho de amostras de 500 µl). O procedimento de teste é descrito detalhadamente no manual do operador dos **cobas® 6800/8800 Systems**. A Figura 2 a seguir resume o procedimento.

Figura 2 Procedimento do teste **cobas® HBV**



Resultados

Os cobas® 6800/8800 Systems determinam automaticamente a concentração de ADN do HBV das amostras e dos controlos. A concentração de ADN do HBV é indicada em Unidades Internacionais por mililitro (UI/ml).

Controlo de qualidade e validade dos resultados

- São processados com cada batch um controlo negativo [(-) C] e dois controlos positivos, um controlo positivo baixo [HBV L(+)C] e um controlo positivo alto [HBV H(+)C].
- No software cobas® 6800/8800 e/ou nos relatórios, verifique os alarmes e os resultados associados, para se certificar da validação do batch.
- O batch é válido se não ocorrerem alarmes nos três controlos, que incluem um controlo negativo e dois controlos positivos: HBV L(+)C, HBV H(+)C. O resultado do controlo negativo é exibido como (-) C e os resultados do controlo positivo baixo e do controlo positivo alto são exibidos como HxV L(+)C e HxV H(+)C.

A invalidação dos resultados é feita automaticamente pelo software cobas® 6800/8800, com base na falha de algum controlo positivo ou negativo.

Alarmes de controlos

Tabela 9 Alarmes de controlos negativos e positivos

Controlo negativo	Alarme	Resultado	Interpretação
(-) C	Q02 (batch de controlo falhou)	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado de titulação calculado do controlo negativo não é negativo.
Controlo positivo	Alarme	Resultado	Interpretação
HxV L(+)C	Q02 (batch de controlo falhou)	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado de titulação calculado do controlo positivo baixo não está dentro do intervalo atribuído.
HxV H(+)C	Q02 (batch de controlo falhou)	Invalid	Um resultado inválido ou o resultado do título calculado do controlo positivo alto não está dentro do intervalo atribuído.

Se o batch for inválido, repita os testes de todo o batch, incluindo todas as amostras e controlos.

HxV L(+)C significa controlo positivo baixo do cobas® HBV/HCV/HIV-1 e HxV H(+)C significa controlo positivo alto do cobas® HBV/HCV/HIV-1 no software cobas® 6800/8800.

Interpretação dos resultados

Para um batch válido, verifique todas as amostras individuais relativamente a alarmes no software **cobas**® 6800/8800 e/ou nos relatórios. A interpretação do resultado deverá ser como se segue:

- Um batch válido pode incluir resultados válidos e inválidos.

Tabela 10 Interpretação dos resultados de amostras

Resultados	Interpretação
Target Not Detected	ADN do HBV não detetado. Reportar resultados como "HBV não detetado."
< Titer Min	O título calculado está abaixo do limite inferior de quantificação (LLOQ) do ensaio. Reportar resultados como "HBV detetado, inferior a (título mín.)". Título mín. = 10 UI/ml (500 µl) Título mín. = 25 UI/ml (200 µl)
Titer	O título calculado está dentro do intervalo linear do ensaio – superior ou igual ao título mín. e inferior ou igual ao título máx. Reportar resultados como "(Título) de HBV detetado".
> Titer Max ^a	O título calculado está acima do limite superior de quantificação (ULOQ) do ensaio. Reportar resultados como "HBV detetado, superior a (título máx.)". Título máx. = 1,00E+09 UI/ml (500 µl e 200 µl)

^a Um resultado de amostra "> Titer Max" refere-se às amostras positivas de HBV detetadas com títulos acima do limite superior de quantificação (ULOQ). Caso seja desejado um resultado quantitativo, a amostra original deve ser diluída com plasma EDTA ou soro com HBV negativo, em função do tipo da amostra original e o teste deve ser repetido. Multiplique o resultado reportado pelo fator de diluição.

Limitações do procedimento

- O **cobas**® HBV foi avaliado apenas para utilização em combinação com o **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 para utilização nos **cobas**® 6800/8800 Systems.
- A obtenção de resultados fiáveis está dependente de procedimentos corretos de colheita, armazenamento e manuseamento da amostra.
- Este teste foi validado apenas para utilização com plasma EDTA ou soro. Testar outros tipos de amostra pode originar resultados imprecisos.
- A quantificação do ADN do HBV depende do número de partículas virais presentes nas amostras e pode ser afetada pelos métodos de colheita de amostra, por fatores inerentes ao paciente (por ex., a idade, a presença de sintomas) e/ou o estágio da infeção.
- Embora raras, as mutações dentro de regiões altamente conservadas de um genoma viral abrangidas pelo **cobas**® HBV podem afetar a ligação de primers e/ou sondas, resultando na subquantificação do vírus ou insucesso na deteção de presença do vírus.
- Devido a diferenças básicas entre tecnologias, recomenda-se que, antes de mudar de uma tecnologia para outra, os utilizadores realizem estudos de correlação de métodos nos seus laboratórios, para qualificar as diferenças tecnológicas. Os utilizadores deverão seguir os seus próprios procedimentos específicos e políticas específicas.
- O **cobas**® HBV não se destina à utilização como um teste de rastreio para a presença do HBV no sangue ou em produtos derivados do sangue, nem como um teste de diagnóstico visando confirmar a presença de infeção por HBV.

Avaliação não clínica do desempenho

Características principais de desempenho

Limite de detecção (LoD)

Padrão internacional da OMS

O limite de detecção do **cobas**® HBV foi determinado através da análise de diluições em série do padrão internacional da OMS para o ADN do vírus da hepatite B relativo a ensaios com tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos (2.º padrão internacional da OMS) do genótipo A obtido a partir de NIBSC, plasma EDTA humano e soro negativo para o HBV, utilizando volumes de processamento de amostras de 500 µl e 200 µl. Foram testados painéis de oito níveis de concentração e ainda um negativo com volume de processamento de amostras de 500 µl e de nove níveis de concentração com volume de processamento de amostras de 200 µl com três lotes de reagentes de teste **cobas**® HBV, corridas múltiplas, dias, operadores e equipamentos diferentes.

Os resultados do plasma EDTA e do soro obtidos com ambos os volumes de processamento de amostras são exibidos na Tabela 11 à Tabela 14, respectivamente. O estudo demonstra que o **cobas**® HBV detetou ADN do HBV a uma concentração de 3 UI/ml com uma taxa de positividade de $\geq 95\%$ para um volume de processamento de amostras de 500 µl e a uma concentração de 17,5 UI/ml com uma taxa de positividade de $\geq 95\%$ para o volume de processamento de amostras de 200 µl no plasma EDTA. No caso do soro, o estudo demonstra que o **cobas**® HBV detetou ADN do HBV a uma concentração de 3 UI/ml com uma taxa de positividade de $\geq 95\%$ para um volume de processamento de amostras de 500 µl e a uma concentração de 15 UI/ml com uma taxa de positividade de $\geq 95\%$ para o volume de processamento de amostras de 200 µl.

Tabela 11 Limite de detecção em plasma EDTA (500 µl)

Concentração de título de entrada (ADN do HBV UI/ml)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em %
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
Limite de detecção por PROBIT com taxa de positividade de 95%	2,7 UI/ml Intervalo de confiança de 95%: 2,4 - 3,1 UI/ml		

Tabela 12 Limite de detecção em soro (500 µl)

Concentração de título de entrada (ADN do HBV UI/ml)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em %
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
Limite de detecção por PROBIT com taxa de positividade de 95%	2,4 UI/ml Intervalo de confiança de 95%: 2,0 - 2,7 UI/ml		

Tabela 13 Limite de detecção em plasma EDTA (200 µl)

Concentração de título de entrada (ADN do HBV UI/ml)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em %
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
Limite de detecção por PROBIT com taxa de positividade de 95%	15,5 UI/ml Intervalo de confiança de 95%: 14,4 - 16,9 UI/ml		

Tabela 14 Limite de detecção em soro (200 µl)

Concentração de título de entrada (ADN do HBV UI/ml)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em %
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
Limite de detecção por PROBIT com taxa de positividade de 95%	12,5 UI/ml Intervalo de confiança de 95%: 11,6 – 13,8 UI/ml		

Intervalo linear

Foi conduzido um estudo de linearidade do **cobas**® HBV a partir de diluições em série de 15 membros do painel abrangendo o intervalo linear destinado ao genótipo predominante (GT A). Os membros do painel de título elevado foram preparados a partir de um stock de ADN de plasmídeo de HBV de título elevado, ao passo que os membros do painel de título baixo foram preparados a partir de amostra clínica. O painel de linearidade foi concebido para ter uma sobreposição de título de aproximadamente 2 log₁₀ entre estas duas fontes de material. O intervalo linear estimado do **cobas**® HBV vai de LLoQ (10 UI/ml em volume de processamento de amostras de 500 µl e 25 UI/ml em volume de processamento de amostras de 200 µl) a ULoQ (1,00E+09 UI/ml). O painel de linearidade foi concebido para ir de uma concentração abaixo do LLoQ (por ex., 7,5 UI/ml) a um nível de concentração acima do ULoQ (por ex., 2,0E+09 UI/ml) e para incluir pontos de decisão clínica. Além disso, o painel de linearidade foi concebido para suportar parcialmente passos de 1,0 log₁₀ ao longo do intervalo linear. Foi fornecida a concentração nominal em UI/ml e a origem do ADN do HBV para cada membro do painel.

Com volume de processamento de 500 µl, o **cobas**® HBV é linear para plasma EDTA e soro a partir de 10 UI/ml a 1,00E+09 UI/ml e demonstra um desvio absoluto inferior a ± 0,2 log₁₀ em relação à regressão não linear mais adequada. Ao longo do intervalo linear, a precisão do teste estava dentro de ± 0,24 log₁₀.

Com volume de processamento de 200 µl, o **cobas**® HBV é linear para plasma EDTA e soro a partir de 25 UI/ml a 1,00E+09 UI/ml e demonstra um desvio absoluto inferior a ± 0,2 log₁₀ a em relação à regressão não linear mais adequada. Ao longo do intervalo linear, a precisão do teste estava dentro de ± 0,24 log₁₀.

Consulte da Figura 3 à Figura 6 para obter resultados representativos.

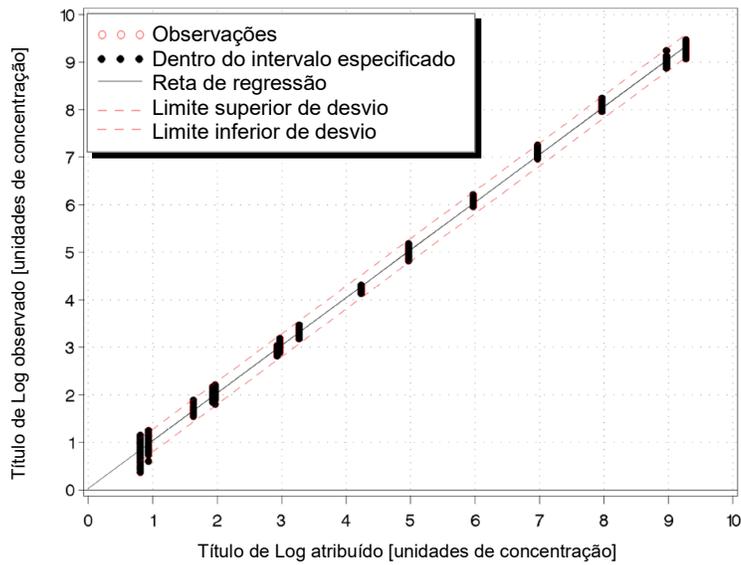
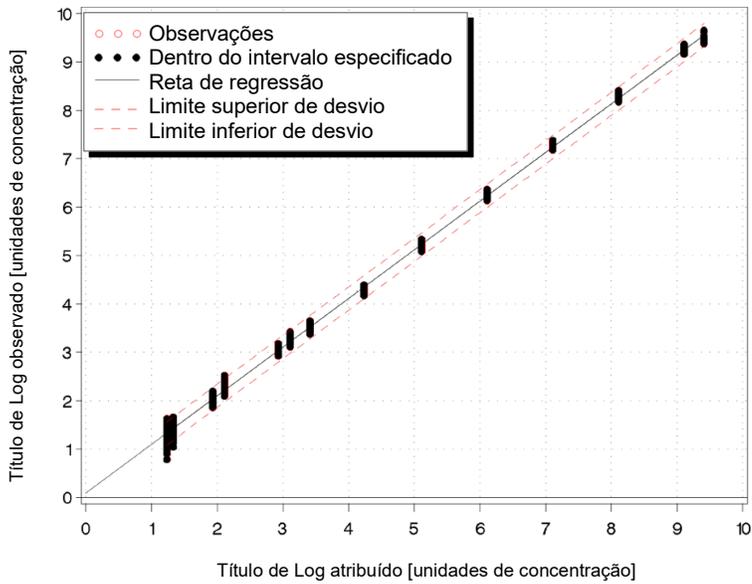
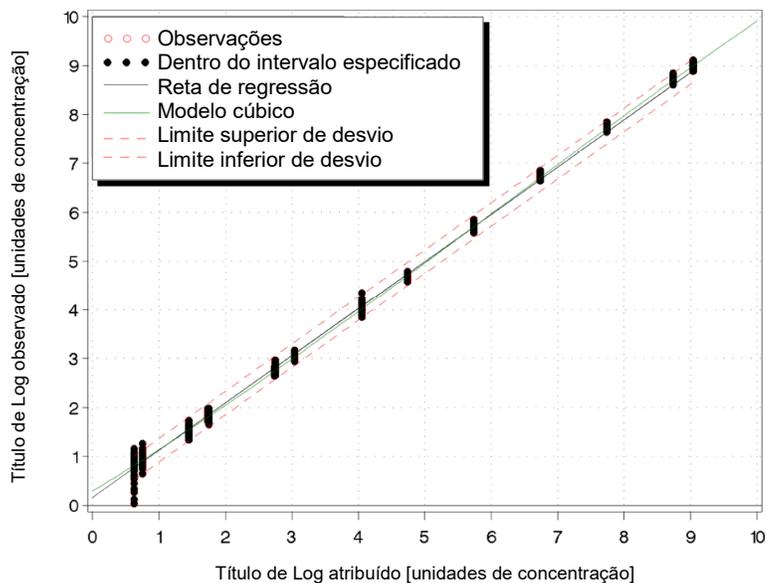
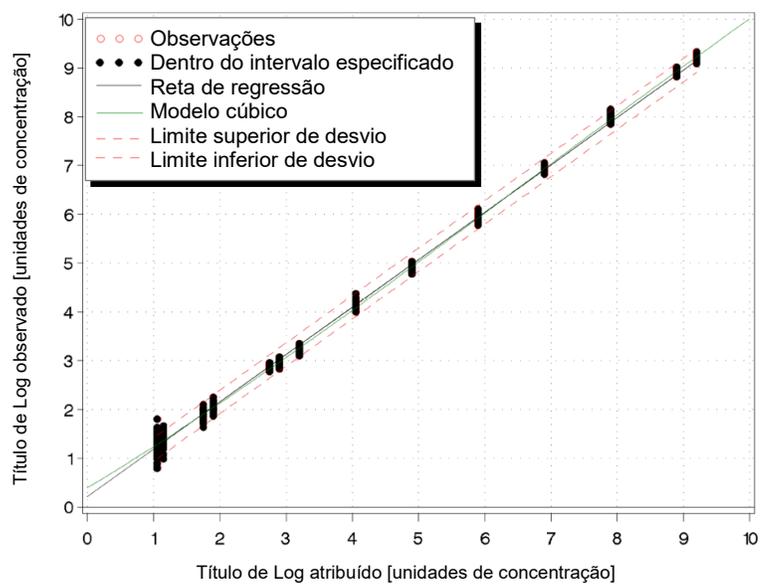
Figura 3 Determinação de intervalo linear em plasma EDTA (500 µl)**Figura 4** Determinação de intervalo linear em plasma EDTA (200 µl)

Figura 5 Determinação de intervalo linear em soro (500 µl)**Figura 6** Determinação de intervalo linear em soro (200 µl)

Precisão intra-laboratório

A precisão do cobas® HBV foi determinada através da análise de diluições em série de amostras clínicas de HBV (Genótipo A) (CS) ou de ADN de plasmídeo de HBV em plasma EDTA negativo para o HBV ou em soro. Foram testados 10 a 12 níveis de diluição em 48 réplicas para cada nível e volume de processamento em três lotes de reagentes de teste do cobas® HBV utilizando três equipamentos e três operadores num período de 12 dias. Cada amostra foi analisada de forma totalmente automática seguindo todo o procedimento do teste cobas® HBV em cobas® 6800/8800 Systems. Por conseguinte, a precisão aqui reportada representa todos os aspetos do procedimento de teste. Os resultados são exibidos da Tabela 15 à Tabela 18.

O cobas® HBV demonstrou alta precisão em três lotes de reagentes testados num intervalo de concentração de 5,00E+01 UI/ml a 1,0E+09 UI/ml com um volume de processamento de amostras de 500 µl e entre 1,00E+02 UI/ml a 1,0E+08 UI/ml (plasma EDTA) e 1,0E+09 UI/ml (soro) com volume de processamento de amostras de 200 µl.

Tabela 15 Precisão intra-laboratório do cobas® HBV (amostras de plasma EDTA – volume de processamento de 500 µl)*

Concentração nominal (UI/ml)	Concentração atribuída (UI/ml)	Material de origem	Plasma EDTA			
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Todos os lotes
			DP	DP	DP	DP em pool
1,00E+09	9,32E+08	ADN de plasmídeo	0,04	0,07	0,09	0,07
1,00E+08	9,32E+07	ADN de plasmídeo	0,04	0,08	0,05	0,06
1,00E+07	9,32E+06	ADN de plasmídeo	0,06	0,05	0,04	0,05
1,00E+06	9,32E+05	ADN de plasmídeo	0,06	0,07	0,04	0,06
1,00E+05	9,32E+04	ADN de plasmídeo	0,06	0,06	0,07	0,06
2,00E+04	1,71E+04	amostra clínica	0,05	0,03	0,03	0,04
2,00E+03	1,86E+03	ADN de plasmídeo	0,05	0,04	0,07	0,05
1,00E+03	8,54E+02	amostra clínica	0,04	0,05	0,04	0,04
1,00E+03	9,32E+02	ADN de plasmídeo	0,06	0,06	0,05	0,06
1,00E+02	8,54E+01	amostra clínica	0,07	0,08	0,07	0,07
1,00E+02	9,32E+01	ADN de plasmídeo	0,10	0,08	0,09	0,09
5,00E+01	4,27E+01	amostra clínica	0,09	0,04	0,08	0,08

* Os dados de titulação são considerados como tendo distribuição log-normal e são analisados de acordo com transformação log₁₀. As colunas de desvio padrão (DP) apresentam a totalidade dos títulos com transformação logarítmica para cada um dos três lotes de reagente.

Tabela 16 Precisão intra-laboratório do cobas® HBV (amostras de soro – volume de processamento de 500 µl)*

Concentração nominal (UI/ml)	Concentração atribuída (UI/ml)	Material de origem	Soro			
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Todos os lotes
			DP	DP	DP	DP em pool
1,00E+09	5,47E+08	ADN de plasmídeo	0,05	0,06	0,03	0,05
1,00E+08	5,47E+07	ADN de plasmídeo	0,03	0,04	0,03	0,04
1,00E+07	5,47E+06	ADN de plasmídeo	0,05	0,05	0,03	0,05
1,00E+06	5,47E+05	ADN de plasmídeo	0,04	0,06	0,06	0,05
1,00E+05	5,47E+04	ADN de plasmídeo	0,04	0,03	0,03	0,04
2,00E+04	1,12E+04	amostra clínica	0,10	0,07	0,08	0,08
2,00E+03	1,09E+03	ADN de plasmídeo	0,05	0,05	0,03	0,05
1,00E+03	5,62E+02	amostra clínica	0,03	0,14	0,03	0,09
1,00E+03	5,47E+02	ADN de plasmídeo	0,04	0,05	0,04	0,04
1,00E+02	5,62E+01	amostra clínica	0,09	0,06	0,07	0,07
1,00E+02	5,47E+01	ADN de plasmídeo	0,05	0,07	0,04	0,06
5,00E+01	2,81E+01	amostra clínica	0,07	0,06	0,10	0,08

* Os dados de titulação são considerados como tendo distribuição log-normal e são analisados de acordo com transformação log₁₀. As colunas de desvio padrão (DP) apresentam a totalidade dos títulos com transformação logarítmica para cada um dos três lotes de reagente.

Tabela 17 Precisão intra-laboratório do cobas® HBV (amostras de plasma EDTA – volume de processamento de 200 µl)*

Concentração nominal (UI/ml)	Concentração atribuída (UI/ml)	Material de origem	Plasma EDTA			
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Todos os lotes
			DP	DP	DP	DP em pool
1,00E+08	1,28E+08	ADN de plasmídeo	0,04	0,05	0,03	0,04
1,00E+07	1,28E+07	ADN de plasmídeo	0,06	0,04	0,02	0,04
1,00E+06	1,28E+06	ADN de plasmídeo	0,03	0,04	0,04	0,03
1,00E+05	1,28E+05	ADN de plasmídeo	0,02	0,06	0,05	0,05
2,00E+04	1,71E+04	amostra clínica	0,03	0,05	0,03	0,04
2,00E+03	2,57E+03	ADN de plasmídeo	0,05	0,06	0,05	0,05
1,00E+03	8,54E+02	amostra clínica	0,07	0,05	0,03	0,05
1,00E+03	1,28E+03	ADN de plasmídeo	0,06	0,07	0,03	0,05
1,00E+02	8,54E+01	amostra clínica	0,09	0,09	0,07	0,09
1,00E+02	1,28E+02	ADN de plasmídeo	0,06	0,09	0,11	0,09

* Os dados de titulação são considerados como tendo distribuição log-normal e são analisados de acordo com transformação \log_{10} . As colunas de desvio padrão (DP) apresentam a totalidade dos títulos com transformação logarítmica para cada um dos três lotes de reagente.

Tabela 18 Precisão intra-laboratório do cobas® HBV (amostras de soro – volume de processamento de 200 µl)*

Concentração nominal (UI/ml)	Concentração atribuída (UI/ml)	Material de origem	Soro			
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Todos os lotes
			DP	DP	DP	DP em pool
1,00E+09	7,92E+08	ADN de plasmídeo	0,04	0,03	0,03	0,04
1,00E+08	7,92E+07	ADN de plasmídeo	0,07	0,05	0,06	0,06
1,00E+07	7,92E+06	ADN de plasmídeo	0,04	0,03	0,04	0,04
1,00E+06	7,92E+05	ADN de plasmídeo	0,03	0,05	0,04	0,04
1,00E+05	7,92E+04	ADN de plasmídeo	0,06	0,07	0,03	0,06
2,00E+04	1,12E+04	amostra clínica	0,16	0,08	0,03	0,11
2,00E+03	1,58E+03	ADN de plasmídeo	0,05	0,04	0,05	0,05
1,00E+03	5,62E+02	amostra clínica	0,07	0,04	0,04	0,05
1,00E+03	7,92E+02	ADN de plasmídeo	0,07	0,05	0,06	0,06
1,00E+02	5,62E+01	amostra clínica	0,09	0,10	0,07	0,09
1,00E+02	7,92E+01	ADN de plasmídeo	0,08	0,09	0,09	0,08

* Os dados de titulação são considerados como tendo distribuição log-normal e são analisados de acordo com transformação \log_{10} . As colunas de desvio padrão (DP) apresentam a totalidade dos títulos com transformação logarítmica para cada um dos três lotes de reagente.

Determinação e verificação de genótipo

O desempenho do cobas® HBV em genótipos HBV foi avaliado por:

- Determinação do limite de detecção para genótipos B a H e mutante pré-core predominante com plasma EDTA e soro para volume de processamento de 500 µl
- Verificação do limite de detecção para genótipos B a H e mutante pré-core predominante com plasma EDTA e soro para volume de processamento de 200 µl
- Verificação da linearidade de genótipos B a H e do mutante pré-core predominante

Limite de detecção para genótipos B a H e do mutante pré-core predominante

O limite de detecção do cobas® HBV foi determinado pela análise de diluições em série de sete genótipos diferentes (B, C, D, E, F, G, H) e do mutante pré-core predominante (G1896A; C1858T) em plasma EDTA humano negativo para o HBV e soro utilizando volumes de processamentos de amostras de 500 µl. Foram testados painéis de oito níveis de concentração e ainda um negativo utilizando três lotes de reagentes de teste cobas® HBV em corridas múltiplas, dias, operadores e equipamentos diferentes.

Os resultados do plasma EDTA e do soro do volume de processamento de amostras de 500 µl são exibidos na Tabela 19 e na Tabela 20, respectivamente. O estudo demonstra que o cobas® HBV detetou todos os genótipos de HBV testados com um limite de detecção semelhante ao genótipo A de HBV.

Tabela 19 Limite de detecção de genótipos de ADN do HBV em plasma EDTA (500 µl)

Genótipo	Limite de detecção por PROBIT a 95%	Intervalo de confiança de 95%
GT B	3,45 UI/ml	2,95 UI/ml - 4,32 UI/ml
GT C	4,13 UI/ml	3,32 UI/ml - 5,82 UI/ml
GT D	4,52 UI/ml	3,59 UI/ml - 6,49 UI/ml
GT E	3,21 UI/ml	2,76 UI/ml - 3,98 UI/ml
GT F	1,87 UI/ml	1,66 UI/ml - 2,24 UI/ml
GT G	2,49 UI/ml	2,17 UI/ml - 3,02 UI/ml
GT H	6,55 UI/ml	5,33 UI/ml - 8,77 UI/ml
mutante pré-core	2,38 UI/ml	2,08 UI/ml - 2,90 UI/ml

Tabela 20 Limite de detecção de genótipos de ADN do HBV em soro (500 µl)

Genótipo	Limite de detecção por PROBIT a 95%	Intervalo de confiança de 95%
GT B	3,30 UI/ml	2,76 UI/ml - 4,30 UI/ml
GT C	3,34 UI/ml	2,83 UI/ml - 4,23 UI/ml
GT D	2,59 UI/ml	2,17 UI/ml - 3,42 UI/ml
GT E	2,67 UI/ml	2,25 UI/ml - 3,49 UI/ml
GT F	1,98 UI/ml	1,72 UI/ml - 2,45 UI/ml
GT G	2,07 UI/ml	1,75 UI/ml - 2,66 UI/ml
GT H	3,48 UI/ml	2,89 UI/ml - 4,60 UI/ml
mutante pré-core	1,65 UI/ml	1,43 UI/ml - 2,03 UI/ml

Verificação do limite de detecção para genótipos B a H e do mutante pré-core predominante

Foram diluídas amostras clínicas de ADN do HBV de todos os genótipos (B, C, D, E, F, G, H) e do mutante pré-core predominante (G1896A; C1858T) em três níveis de concentração diferentes em plasma EDTA e soro. A determinação da taxa de positividade foi realizada com 63 réplicas para cada nível. Os testes foram efetuados com três lotes de reagentes cobas® HBV. Os resultados de plasma EDTA e de soro utilizando 200 µl são exibidos na Tabela 21 e na Tabela 22. Estes resultados demonstram que o cobas® HBV detetou ADN do HBV em sete genótipos diferentes e o mutante pré-core predominante em concentrações de 12,50 UI/ml com uma taxa de positividade de $\geq 93,65\%$ com um intervalo de confiança superior unilateral a 95% de 97,80%.

Tabela 21 Verificação de genótipo de ADN do HBV de limite de detecção em plasma EDTA (200 µl)

Genótipo	6,25 UI/ml			12,50 UI/ml			18,75 UI/ml		
	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 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 pré-core	63	54	85,71 (92,34)	63	62	98,41 (99,92)	63	63	100,00 (100,00)

* Intervalo de confiança superior unilateral de 95%

Tabela 22 Verificação de genótipos de ADN do HBV do limite de detecção em soro (200 µl)

Genótipo	6,25 UI/ml			12,50 UI/ml			18,75 UI/ml		
	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 95%*)	N.º de réplicas válidas	Número de positivos	Taxa de positividade em % (IC de 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 pré-core	63	60	95,24 (98,66)	63	62	98,41 (99,92)	63	63	100,00 (100,00)

* Intervalo de confiança superior unilateral de 95%

Linearidade para genótipos B a H e do mutante pré-core predominante

As séries de diluição utilizadas na verificação do estudo de linearidade de genótipos do **cobas**® HBV consiste em 10 membros de painel abrangendo o intervalo linear pretendido. Os membros do painel de título elevado foram preparados a partir de um stock de ADN de plasmídeo de título elevado, ao passo que os membros do painel de título baixo foram preparados a partir de uma amostra clínica de título elevado. O painel de linearidade foi concebido para ter uma sobreposição de título de aproximadamente $2 \log_{10}$ entre estas duas fontes de material. O intervalo linear do **cobas**® HBV estendeu-se desde abaixo do LLoQ (10 UI/ml com um volume de processamento de amostras de 500 µl, 25 UI/ml com um volume de processamento de amostras de 200 µl) ao ULoQ (1,00E+09 UI/ml) e incluiu, pelo menos, um ponto de decisão clínica. Foram testadas 21 réplicas em três lotes de reagente **cobas**® HBV para cada nível em plasma EDTA e serum.

A linearidade dentro do intervalo linear do **cobas**® HBV foi verificado em todos os sete genótipos (B, C, D, E, F, G, H) e mutante pré-core predominante (G1896A; C1858T). O desvio máximo entre a regressão linear e a regressão não linear mais adequada foi igual ou inferior a $\pm 0,2 \log_{10}$.

Especificidade

A especificidade do **cobas**® HBV foi determinada através da análise de amostras de plasma EDTA negativo para HBV e soro de doadores individuais. Foram testadas 300 amostras individuais de plasma EDTA e 300 amostras individuais de soro (600 resultados no total) com dois lotes de reagentes **cobas**® HBV. Todas as amostras tiveram resultado negativo relativamente a ADN do HBV. No painel de teste, a especificidade do **cobas**® HBV foi 100% (com um intervalo de confiança unilateral a 95% de 99,5%).

Especificidade analítica

A especificidade analítica do **cobas**® HBV foi avaliada através da diluição de um painel de microrganismos com ADN do HBV positivo e com plasma EDTA com ADN de HBV negativo. Os microrganismos foram adicionados a plasma EDTA negativo humano e testados com e sem ADN do HBV. Nenhum dos agentes patogénicos não HBV interferiu com o desempenho do teste. Foram obtidos resultados negativos com o **cobas**® HBV em todas as amostras de microrganismos sem alvo de HBV e resultados positivos em todas as amostras de microrganismos com alvo de HBV. Além disso, o título médio de \log_{10} de uma das amostras de HBV positivo contendo organismos com potencial de reatividade cruzada estava $\pm 0,3 \log_{10}$ dentro do título médio de \log_{10} do respetivo controlo positivo.

Tabela 23 Microrganismos testados relativamente a reatividade cruzada

Vírus	Bactérias	Leveduras
Adenovírus tipo 5	Vírus do Nilo Ocidental	Propionibacterium acnes
Citomegalovírus	Vírus da encefalite de São Luís	Staphylococcus aureus
Vírus da hepatite A	Vírus da dengue, tipo 1, 2, 3 e 4	
Vírus da hepatite C	Vírus da encefalite da carraça (estirpe HYPR)	
Vírus da hepatite D	Vírus da febre amarela	
Vírus da imunodeficiência humana 1	Vírus do papiloma humano	
Vírus T-linfotrópico humano, tipo 1 e 2	Vírus Varicella-Zoster	
Vírus do herpes humano tipo 6	Influenza A	
Vírus do herpes simples, tipo 1 e 2	Vírus Zika	

Especificidade analítica – substâncias interferentes

Níveis elevados de triglicéridos (34,5 g/l), de bilirrubina conjugada (0,25 g/l), de bilirrubina não conjugada (0,25 g/l), de albumina (58,7 g/l), de hemoglobina (2,9 g/l) e de ADN humano (2 mg/l) nas amostras foram testados na presença e ausência de ADN do HBV. Foi demonstrado que as substâncias endógenas testadas não interferem com o desempenho do teste cobas® HBV.

Além disso, foi testada a presença de doenças autoimunes tais como lúpus eritematoso sistêmico (LES), artrite reumatoide (AR) e anticorpos antinucleares (ANA).

Além disso, os fármacos listados na Tabela 24 foram testados com o triplo da $C_{m\acute{a}x}$ na presença e ausência de ADN do HBV.

Foi demonstrado que todas substâncias potencialmente interferentes não interferem com o desempenho do teste. Foram obtidos resultados negativos com o cobas® HBV em todas as amostras de microrganismos sem alvo de HBV e resultados positivos em todas as amostras com alvo de HBV. Além disso, o título médio de \log_{10} de uma das amostras de HBV positivo contendo substâncias potencialmente interferentes estava $\pm 0,5 \log_{10}$ dentro do título médio de \log_{10} do respetivo controlo positivo.

Tabela 24 Fármacos testados relativamente à interferência com a quantificação de ADN do HBV pelo cobas® HBV

Classe do fármaco	Nome genérico do fármaco	
Modulador de imunidade	Peginterferon α -2a	Peginterferon α -2b
	Ribavirina	
Inibidor de fusão de HIV	Maraviroc	
Inibidor de integrase de HIV	Elvitegravir/Cobicistat	Raltegravir
Inibidor de transcriptase reversa não nucleotídica de HIV	Efavirenz	Nevirapine
	Etravirina	Rilpivirine
Inibidor de protease de HIV	Atazanavir	Lopinavir
	Tipranavir	Nelfinavir
	Darunavir	Ritonavir
	Fosamprenavir	Saquinavir
Inibidor de protease de HCV	Boceprevir	Telaprevir
	Simeprevir	
Inibidores de transcriptase reversa ou de polimerase de ADN	Abacavir	Tenofovir
	Emtricitabine	Adefovir dipivoxil
	Entecavir	Telbivudine
	Foscarnet	Zidovudine
	Cidofovir	Aciclovir
	Lamivudine	Valganciclovir
	Ganciclovir	Sofosbuvir
Compostos para o tratamento de infeções oportunistas	Azithromycin	Pyrazinamide
	Clarithromycin	Rifabutin
	Ethambutol	Rifampicin
	Fluconazole	Sulfametoxazol
	Isoniazid	Trimetoprim

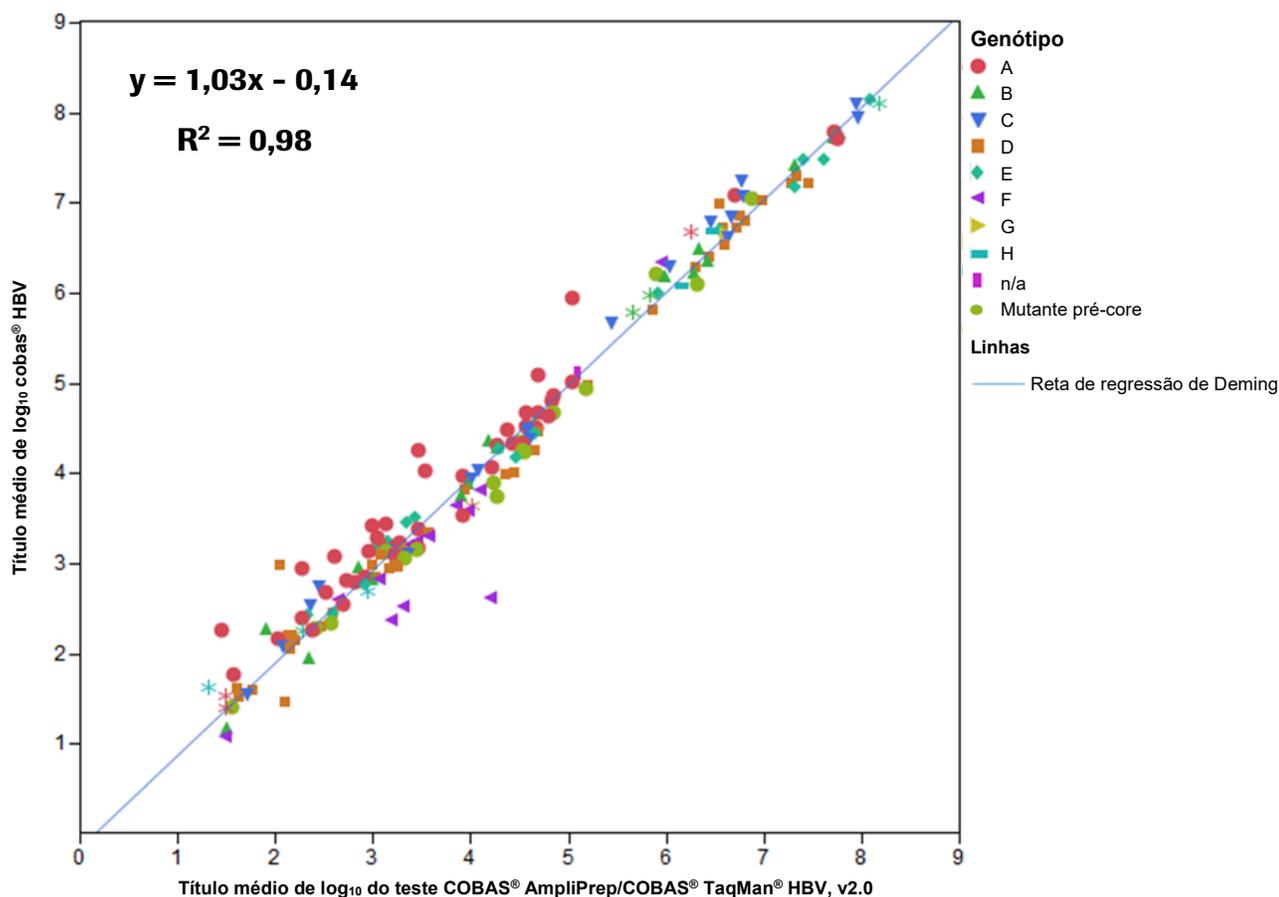
Correlação de métodos

Avaliação de desempenho do cobas® HBV em comparação com o teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0

O desempenho do cobas® HBV e do teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV, v2.0 (teste TaqMan® HBV, v2.0) foram comparados pela análise de amostras de plasma EDTA e soro de pacientes infectados com HBV. Um total de 103 amostras de plasma EDTA e de 85 amostras de soro de todos os genótipos de HBV, analisadas em duplicado, foram validadas e estavam dentro do intervalo de quantificação de ambos os testes. Foi realizada uma análise de regressão de Deming. O desvio médio de título das amostras testadas com os dois testes foi de -0,03 log₁₀.

Os resultados da regressão de Deming são apresentados na Figura 7.

Figura 7 Análise de regressão do cobas® HBV vs. teste TaqMan® HBV, v2.0, amostras de plasma EDTA e soro

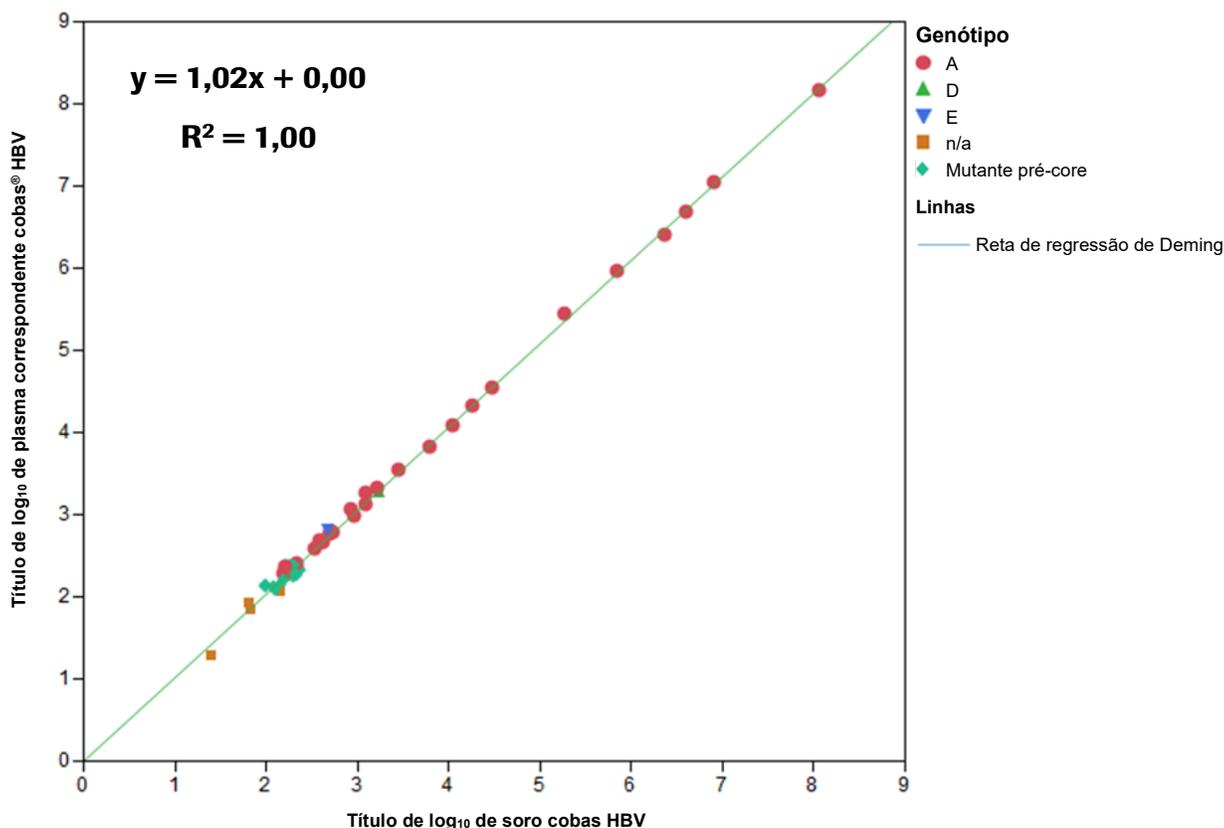


Equivalência de matrizes – Plasma EDTA e soro

Foram analisadas quanto à equivalência de matrizes 50 amostras emparelhadas de plasma EDTA e soro. As amostras com HBV positivo abrangiam a maior parte dos genótipos e apresentavam títulos ao longo de todo o intervalo linear.

A equivalência de matrizes foi demonstrada nas amostras testadas com um desvio de título médio de 0,05 \log_{10} (Figura 8).

Figura 8 Desempenho de equivalência de matrizes entre plasma EDTA e soro



Falha global do sistema

Determinou-se a taxa de falha global do sistema do **cobas**® HBV testando 100 réplicas de plasma EDTA e 100 réplicas de soro adulterado com HBV para um total de 200 réplicas. Estas amostras foram testadas com uma concentração alvo de aproximadamente 3 vezes o limite de detecção. O estudo foi realizado utilizando o **cobas**® 6800 System.

Os resultados deste estudo determinaram que todas as réplicas eram reativas para cada um dos alvos, originando uma taxa de falha global do sistema de 0%. O intervalo exato de confiança bilateral de 95% foi de 0% para o limite inferior e 3,62% para o intervalo superior de cada matriz [0%: 3,62%].

Contaminação cruzada

Foi determinada a taxa de contaminação cruzada para o cobas® HBV, analisando 240 réplicas de uma amostra de plasma EDTA humano normal, negativo quanto a vírus (HIV, HCV e HBV) e 225 réplicas de uma amostra de HBV de título elevado a 1,00E+09 UI/ml. No total, foram executadas cinco corridas com amostras positivas e negativas numa configuração de "tabuleiro de xadrez".

Todas as 240 réplicas da amostra negativa foram não-reativas, originando uma taxa de contaminação cruzada de 0%.

O intervalo exato de confiança bilateral de 95% foi de 0% para o limite inferior e 1,53% para o intervalo superior [0%: 1,53%].

Informações adicionais

Caraterísticas principais do teste

Tipo de amostra	Plasma EDTA, soro		
Quantidade de amostra mínima necessária	650 µl ou 350 µl		
Volume de processamento de amostras	500 µl ou 200 µl		
Sensibilidade analítica		<u>500 µl</u>	<u>200 µl</u>
	Plasma EDTA	2,7 UI/ml	15,5 UI/ml
	Soro	2,4 UI/ml	12,5 UI/ml
Intervalo linear	500 µl: 10 UI/ml – 1,0E+09 UI/ml		
	200 µl: 25 UI/ml – 1,0E+09 UI/ml		
Especificidade	100% (intervalo de confiança unilateral de 95%: 99,5%)		
Genótipos detetados	Genótipo HBV A-H e mutante pré-core predominante		

Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados em todas as etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche.

Tabela 25 Símbolos utilizados em etiquetas de produtos de diagnóstico por PCR da Roche

	Software auxiliar		Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Limite inferior do intervalo atribuído
	Folha de dados de códigos de barras		Fabricante
	Código do batch		Armazenar no escuro
	Risco biológico		Conteúdo suficiente para <n> testes
	Referência de catálogo		Limite de temperatura
	Consulte as instruções de utilização		Ficheiro de definição de teste
	Conteúdo do kit		Limite superior do intervalo atribuído
	Distribuído por		Prazo de validade
	Apenas para avaliação do desempenho IVD		Global Trade Item Number
Rx Only	Apenas nos EUA: a Lei federal dos Estados Unidos restringe a venda deste dispositivo a um profissional licenciado ou a pedido deste.		Data do fabrico
	Marcação de conformidade CE; este dispositivo está em conformidade com os requisitos aplicáveis para marcação CE de um dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>		

Apoio Técnico a Clientes EUA 1-800-526-1247

Fabricante e distribuidores

Tabela 26 Fabricante e distribuidores



Fabricado nos Estados Unidos

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany
www.roche.com



Fabricado nos EUA

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
Indianapolis, IN 46250-0457 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800-526-1247)

Marcas comerciais e patentes

Este produto está coberto por um ou mais patentes dos EUA n.ºs 8962293, 9102924, 8609340, 9234250, 8097717, 8192958, 10059993, 10358675, 8129118 e 6727067, e respetivas patentes estrangeiras equivalentes.

COBAS, COBAS OMNI, AMPERASE, AMPLIPREP e TAQMAN são marcas comerciais da Roche.

A marca comercial “Armored RNA®” é propriedade da Asuragen, Inc. e da Cenetron Diagnostics, Ltd.

ProClin® é uma marca registada da Rohm and Haas Company.

Vacutainer® é uma marca registada da Becton Dickinson & Company.

Todos os outros nomes de produtos e marcas comerciais são propriedade dos respetivos titulares.

A tecnologia de prevenção de carryover na enzima AmpErase® está coberta pela patente dos EUA n.º 7,687,247 de propriedade da Life Technologies e licenciada para a Roche Molecular Systems, Inc.

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

Direitos de autor

©2020 Roche Molecular Systems, Inc.



Bibliografia

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

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

Revisão do documento

Informações de revisão do documento	
Doc Rev. 5.0 12/2020	Símbolo “Rx Only” inserido na primeira página. Atualizadas as advertências de risco. Atualizada a página de símbolos harmonizados. Atualizados os endereços de distribuidores. Atualizada a secção Marcas comerciais e patentes . Adicionado o enunciado “Made in”. Se tiver quaisquer questões, contacte o representante local da Roche.