

cobas[®] HBV

Test quantitativo degli acidi nucleici per l'uso sul sistema cobas[®] 4800

Per uso diagnostico *in vitro*

cobas[®] HBV	120 Tests	P/N: 06979564190
cobas[®] HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	10 Sets	P/N: 06979572190
cobas[®] 4800 System Sample Preparation Kit 2	240 Tests 960 Tests	P/N: 06979513190 P/N: 06979521190
cobas[®] 4800 System Wash Buffer Kit	240 Tests 960 Tests	P/N: 05235863190 P/N: 05235871190
cobas[®] 4800 System Specimen Diluent 2	240 Tests	P/N: 06979556190
cobas[®] 4800 System Lysis Kit 2	240 Tests 960 Tests	P/N: 06979530190 P/N: 06979548190

Indice generale

Uso previsto

Riassunto e spiegazione del test

Premessa	4
Perché utilizzare i test dell'HBV	4
Spiegazione del test	5
Principi della procedura	5

Materiali e reagenti

Reagenti	6
Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti.....	12
Materiali aggiuntivi necessari	12
Strumentazione e software necessari ma non forniti	13
Provette campione supportate.....	13

Precauzioni e requisiti per l'uso

Avvertimenti e precauzioni.....	14
Buone pratiche di laboratorio.....	15
Manipolazione dei reagenti.....	15
Contaminazione	15
Integrità	16
Smaltimento	16
Fuoriuscite e pulizia	16
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni	17
Prelievo dei campioni	17
Trasporto, conservazione e stabilità dei campioni	17

Istruzioni per l'uso

Esecuzione del test.....	18
Volume di analisi del campione	18
Dimensioni della seduta	18
Flusso di lavoro	19

Risultati

Controllo di qualità e validità dei risultati	21
Interpretazione dei risultati dei controlli	21
Interpretazione dei risultati	22
Elenco dei flag dei risultati	23
Limiti della procedura	24

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Caratteristiche delle prestazioni	25
Limite di sensibilità (LoD)	25
Standard Internazionale OMS	25
Intervallo lineare	27
Precisione intra-laboratorio	29
Verifica del genotipo	31
Specificità analitica	32
Specificità analitica e sostanze interferenti	32
Equivalenza tra matrici – Plasma EDTA e siero	34
Tasso globale d'errore del sistema	34
Contaminazione crociata	34

Valutazione delle prestazioni cliniche

Specificità	35
-------------------	----

Informazioni supplementari

Caratteristiche specifiche del test	36
Simboli	37
Assistenza tecnica	38
Fabbricante	38
Marchi e brevetti	38
Copyright	38
Bibliografia	39
Revisione del documento	41

Uso previsto

cobas® HBV:

Il test di amplificazione degli acidi nucleici *in vitro* cobas® HBV è destinato alla quantificazione del DNA del virus dell'epatite B (HBV) su plasma EDTA o su siero umano ottenuto da soggetti con infezione da HBV. Il test deve essere utilizzato con il cobas® 4800 System, che esegue in modo automatizzato il trattamento, l'amplificazione e la rilevazione dei campioni.

Si tratta di un test utilizzato a sostegno del trattamento dei pazienti con infezione HBV cronica che sono sottoposti a terapia antivirale. Il test può essere utilizzato per misurare i livelli di DNA di HBV nelle condizioni iniziali (baseline) e nel corso della cura, come ausilio per la 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.

cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit:

Il cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit è destinato all'uso come controllo positivo e negativo di una seduta eseguita sul sistema cobas® 4800 con i test cobas® HBV, cobas® HCV e cobas® HIV-1.

Riassunto e spiegazione del test

Premessa

Il virus dell'epatite B (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 di HBV nel plasma EDTA e nel siero applicando tecniche di amplificazione degli acidi nucleici come la PCR.¹¹⁻¹⁴ Molte linee guida raccomandano l'uso della PCR Real-Time per la quantificazione del DNA di HBV principalmente perché assicura una maggiore sensibilità e una maggiore ampiezza dell'intervallo lineare.^{15,16}

Spiegazione del test

cobas® HBV è un test degli acidi nucleici di tipo quantitativo da eseguire sul sistema **cobas® 4800**. Il test **cobas® HBV** permette la rilevazione e la quantificazione del DNA di HBV nel plasma EDTA o nel siero dei pazienti infetti. Vengono utilizzate delle sonde per rilevare e quantificare, ma non per discriminare, i genotipi di HBV A, B, C, D, E, F, G e H e il genotipo mutante pre-core predominante. La carica virale viene quantificata rispetto a uno standard di quantificazione del DNA del fago lambda (DNA QS), che viene introdotto in ogni campione nella fase di preparazione dei campioni. Il DNA QS serve inoltre come controllo interno per monitorare l'intero processo di preparazione dei campioni e amplificazione PCR. Il test utilizza inoltre tre controlli esterni: un controllo positivo a titolo alto, un controllo positivo a titolo basso e un controllo negativo. I controlli esterni positivo alto e positivo basso vengono prodotti diluendo il materiale stock tracciabile al 2° standard internazionale OMS per HBV. Ogni lotto dell'Amplification/Detection Kit è calibrato in modo tracciabile al 2° standard internazionale OMS per HBV (codice NIBSC 97/750).

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® 4800 System** è costituito dal **cobas® x 480 instrument** e dal **cobas® z 480 analyzer**. Il software **cobas® 4800** si occupa della gestione automatica dei dati, assegnando 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 $LLoQ \leq x \leq ULoQ$. I risultati possono essere rivisti 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 DNA del fago lambda (DNA QS) vengono estratti simultaneamente. In sintesi, gli acidi nucleici virali vengono liberati con l'aggiunta della proteinasi e del reagente di lisi nel campione. Dopo il loro rilascio, gli acidi nucleici si legano 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 tampone di lavaggio nei passaggi successivi, mentre gli acidi nucleici purificati vengono eluiti dalle biglie di vetro magnetiche con il tampone di eluizione a temperature elevate.

È possibile ottenere l'amplificazione selettiva degli acidi nucleici target estratti dal campione utilizzando dei primer forward e reverse virus-specifici, che vengono selezionati dalle regioni pre-core e core 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. Per l'amplificazione PCR viene utilizzata una DNA polimerasi termostabile. Il reagente Master Mix contiene deossiridina trifosfato (dUTP), anziché deossitimidina trifosfato (dTTP), che è incorporato nel DNA appena sintetizzato (amplicone).^{14, 17, 18} Tutti gli eventuali ampliconi contaminanti prodotti da sessioni di PCR precedenti vengono inattivati come stampi PCR dall'enzima AmpErase, che è presente nel reagente Master Mix, prima del primo passaggio di denaturazione della PCR. L'enzima AmpErase catalizza la rimozione di uracile dal DNA, ma non agisce sul DNA presente in natura, che non contiene uracile. L'amplicone che si forma nei successivi cicli della PCR non viene inattivato, in quanto l'enzima AmpErase non è attivo alle temperature di annealing (appaiamento) e denaturazione della PCR.

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 l'HBV e per il 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 specifici avvengono a lunghezze d'onda fisse, la rilevazione e la discriminazione del target amplificato di HBV e del DNA QS possono avvenire simultaneamente.

Materiali e reagenti

Reagenti

Tutti i reagenti e i controlli non ancora aperti devono essere conservati secondo le indicazioni contenute nella tabella **Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti**.

Kit	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento ^a
cobas® HBV 120 test (P/N: 06979564190)	MMX R1 (Reagente 1 Master Mix cobas®) Acetato di manganese, idrossido di potassio, < 0,1% sodio azide	10 × 1,75 ml	N/A
	HBV MMX R2 (Reagente 2 Master Mix cobas® HBV) 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 per QS, < 0,01% sonde oligonucleotidiche fluorescenti specifiche per HBV e per QS, < 0,01% aptamero oligonucleotidico, < 0,01% DNA polimerasi Z05D (batterica), < 0,01% enzima AmpErase (uracil-N- glicosilasi) (batterico), < 0,1% sodio azide	10 × 0,5 ml	N/A
	DNA QS (Standard di quantificazione del HBV DNA cobas®) Tampone Tris, < 0,05% EDTA, < 0,001% costruito 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	10 × 1,75 ml	N/A

Kit	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento ^a
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit 10 set (P/N: 06979572190)	HBV/HCV/HIV-1 L(+)C Controllo positivo basso cobas® HBV/HCV/HIV-1 < 0,001% RNA sintetico (armored) di HIV-1 gruppo M incapsulato in proteina di rivestimento batteriofaga MS2, < 0,001% DNA sintetico (plasmide) di HBV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofaga Lambda, < 0,001% RNA sintetico (armored) di HCV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofaga MS2, plasma umano normale, non reattivo ai test brevettati per gli anticorpi anti- HIV 1/2, anti-HCV, 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 ^b	10 × 0,75 ml	  AVVERTIMENTO 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).
	HBV/HCV/HIV-1 H(+)C Controllo positivo alto cobas® HBV/HCV/HIV-1 < 0,001% RNA sintetico (armored) di HIV-1 gruppo M incapsulato in proteina di rivestimento batteriofaga MS2, < 0,001% DNA sintetico (plasmide) di HBV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofaga Lambda, < 0,001% RNA sintetico (armored) di HCV incapsulato in proteina di rivestimento batteriofaga MS2, plasma umano normale, non reattivo ai test brevettati per gli anticorpi anti- HIV 1/2, anti-HCV, 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 ^b	10 × 0,75 ml	  AVVERTIMENTO 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).

Kit	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento ^a
	(-) C (Controllo negativo cobas®) Plasma umano normale, non reattivo ai test brevettati per gli anticorpi anti-HIV-1/2, anti-HCV, 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^b	10 × 0,75 ml	 AVVERTIMENTO 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).

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

^b Sostanza pericolosa.

Kit	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento ^a
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 240 test (P/N: 06979513190)	MGP 2 (Reagente 2 MGP cobas® 4800) Biglie di vetro magnetiche, tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	10 × 8 ml	N/A
	EB 2 (Tampone di eluizione 2 cobas® 4800)Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	10 × 17 ml	N/A
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2 960 test (P/N: 06979521190)	MGP 2 (Reagente 2 MGP cobas® 4800) Biglie di vetro magnetiche, tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	10 × 16 ml	N/A
	EB 2 (Tampone di eluizione 2 cobas® 4800)Tampone Tris, 0,2% metil-4 idrossibenzoato	10 × 17 ml	N/A
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 240 test (P/N: 05235863190)	WBD diidrato di citrato di sodio, 0,05% N-metilisotiazolone-HCl	10 × 55 ml	N/A
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit 960 test (P/N: 05235871190)	WBD diidrato di citrato di sodio, 0,05% N-metilisotiazolone-HCl	10 × 200 ml	N/A
cobas® 4800 System Specimen Diluent 2 240 test (P/N: 06979556190)	SD 2 Tampone Tris, 0,1% metil-4 idrossibenzoato, < 0,1% sodio azide	10 × 8 ml	N/A

Kit	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento ^a
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 240 test (P/N: 06979530190)	P 2 (Proteasi 2 cobas® 4800) Tampone Tris, < 0,05% EDTA, cloruro di calcio, acetato di calcio, 8% (p/v) proteinasi ^b	10 × 1,0 ml	 PERICOLO H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H334: Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. P261: Evitare di respirare la nebbia o i vapori. P280: Indossare guanti protettivi. P284: Indossare un apparecchio di protezione respiratoria. P304 + P340: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P342 + P311: In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico. 39450-01-6 Proteinasi, <i>Tritirachium album</i> serina
	LYS 2 (Tampone di lisi 2 cobas® 4800) 43% (p/p) guanidina tiocianato ^b , 5% (p/v) polidocanolo ^b , 2% (p/v) ditiotreitolo ^b , citrato di sodio diidrato	10 × 27 ml	 PERICOLO H302: Nocivo per ingestione. H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. EUH071: Corrosivo per le vie respiratorie. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito. 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. P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito. 593-84-0 Guanidina tiocianato 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo

Kit	Componenti e ingredienti dei reagenti	Quantità per kit	Simbolo di sicurezza e avvertimento ^a
cobas® 4800 System Lysis Kit 2 960 test (P/N: 06979548190)	P 2 (Proteasi 2 cobas® 4800) Tampone Tris, < 0,05% EDTA, cloruro di calcio, acetato di calcio, 8% (p/v) proteinasi ^b	10 × 1,0 ml	 PERICOLO H317: Può provocare una reazione allergica cutanea. H334: Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. P261: Evitare di respirare la nebbia o i vapori. P280: Indossare guanti protettivi. P284: Indossare un apparecchio di protezione respiratoria. P304 + P340: IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. P342 + P311: In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico. 39450-01-6 Proteinasi, <i>Tritirachium album</i> serina
	LYS 2 (Tampone di lisi 2 cobas® 4800) 43% (p/p) guanidina tiocianato ^b , 5% (p/v) polidocanolo ^b , 2% (p/v) ditiotreitolo ^b , citrato di sodio diidrato	10 × 84 ml	 PERICOLO H302: Nocivo per ingestione. H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. H411: Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. EUH032: A contatto con acidi libera gas molto tossici. EUH071: Corrosivo per le vie respiratorie. P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito. 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. P391: Raccogliere il materiale fuoriuscito. 593-84-0 Guanidina tiocianato 9002-92-0 Polidocanolo 3483-12-3 (R*,R*)-1,4-dimercapto-2,3-butandiolo

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

^b Sostanza pericolosa.

Requisiti per la conservazione e la manipolazione dei reagenti

Reagente	Temperatura di conservazione	Tempo di conservazione
cobas® HBV	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Wash Buffer Kit	15-25°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Specimen Diluent 2	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata
cobas® 4800 System Lysis Kit 2	2-8°C	Stabile fino alla data di scadenza indicata

Non congelare i reagenti.

Materiali aggiuntivi necessari

Materiali	P/N
Piastra di preparazione (DWP) da 2,0 ml per cobas® 4800 System	06884008001
Micropiastra (MWP) da 0,3 ml per cobas® 4800 System	05232724001
Applicatore per pellicola adesiva	04900383001
Puntali CORE da 1000 µl, rack da 96	04639642001
Vaschetta per reagenti da 200 ml	05232759001
Vaschetta per reagenti da 50 ml	05232732001
Rack da 24 posizioni	04639502001
Rack da 32 posizioni	04639529001
Sacchetto per rifiuti solidi	05530873001 (piccolo) o 04691989001 (grande)
Manica di smaltimento in plastica Hamilton STAR	04639669001
Guanti da laboratorio, senza talco	È ammesso l'uso di guanti da laboratorio senza talco di qualsiasi marca.
Miscelatore vortex (monoprovetta)	È ammesso l'uso di un miscelatore vortex di qualsiasi marca.
Centrifuga dotata di cestello basculante con RCF minimo di 1500	È ammesso l'uso di una centrifuga di qualsiasi marca.

Per maggiori informazioni sui prodotti venduti separatamente, rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Strumentazione e software necessari ma non forniti

Strumentazione e software necessari, non forniti
cobas® 4800 System cobas® x 480 instrument cobas® z 480 analyzer Unità di controllo
cobas® 4800 System Application Software (Core) versione 2.2.0 o successiva
cobas® 4800 System cobas® HBV AP v1.1.0 o successiva

Nota: contattare il rappresentante Roche locale per richiedere un listino dettagliato dei rack per campioni, dei rack portapuntali, dei rack per reagenti e dei rack per piastre compatibili con gli strumenti.

Provette campione supportate

Il test può essere eseguito con le provette primarie e i tubi secondari comunemente utilizzati.

Sono supportate le seguenti provette campione:

Provette primarie

Diametro nominale (mm)	Volume iniziale del campione - sangue intero trattato (centrifugato)		Additivo provetta	
	Volume di analisi del campione 400 µl	Volume di analisi del campione 200 µl	Plasma EDTA	Siero
11-14	1800 µl o più	1000 µl o più	Con o senza gel	Con gel
14,5-16	Oltre 4000 µl	Oltre 4000 µl	Con o senza gel	Con gel

Per ordinare provette specifiche e ricevere informazioni sul volume iniziale minimo del campione per particolari tipi di provette primarie, contattare il rappresentante Roche locale.

Tubi secondari

Diametro nominale (mm)	Volume iniziale del campione	
	Volume di analisi del campione 400 µl	Volume di analisi del campione 200 µl
11-16	1000 µl o più (tubi secondari specifici richiedono un volume iniziale minimo inferiore a 1000 µl)	750 µl o più (tubi secondari specifici richiedono un volume iniziale minimo inferiore a 750 µl)

Per ordinare provette specifiche e ricevere informazioni sul volume iniziale minimo del campione per particolari tipi di tubi secondari, contattare il rappresentante Roche locale.

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 analitica di questo test, prestare attenzione affinché i reagenti, i campioni e le miscele di amplificazione siano esenti da contaminazioni.

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Il test **cobas®** HBV deve essere utilizzato esclusivamente per quantificare la carica virale dell'HBV e non è indicato per la diagnosi clinica iniziale di infezione da HBV.
- 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.
- 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 con esperienza nella manipolazione di materiale a rischio biologico e nell'uso del test **cobas®** HBV e del **cobas®** 4800 System.
- Tutti i materiali di origine umana devono essere considerati a rischio biologico e quindi manipolati adottando precauzioni universalmente valide.
- Il kit di controllo **cobas®** HBV/HCV/HIV-1 contiene plasma derivato da sangue umano. Il materiale di provenienza è stato analizzato con un test degli anticorpi brevettato ed è risultato non reattivo per gli anticorpi anti-HCV, anti-HIV-1/2, HBsAg e anti-HBc. I test con i metodi PCR non hanno rilevato la presenza di RNA di HIV-1, RNA di HIV-2, RNA di HCV e DNA di HBV. Allo stato attuale, tuttavia, nessun metodo di analisi garantisce con assoluta certezza che i prodotti derivati da sangue umano non trasmettano agenti infettivi.
- Impedire che il reagente MGP sia esposto a fonti di campi magnetici.
- **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.
- Per ulteriori avvertimenti, precauzioni e procedure volte a ridurre il rischio di contaminazione per il **cobas®** x 480 instrument o il **cobas®** z 480 analyzer, consultare l'Assistenza Utente del **cobas®** 4800 System. In caso di sospetta contaminazione, eseguire la pulizia e la manutenzione settimanale seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas®** 4800 System.
- In caso di incidenti gravi che dovessero verificarsi durante l'uso di questo test, inviare una segnalazione all'autorità competente locale e al produttore.

Nota: per istruzioni specifiche, vedere "*Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni*".

Buone pratiche di laboratorio

- Non pipettare con la bocca.
- Non mangiare, bere o fumare nelle aree di lavoro del laboratorio.
- Lavare accuratamente le mani dopo avere manipolato i campioni e i reagenti dei kit e dopo avere rimosso i guanti da laboratorio.
- Indossare protezioni per gli occhi, camici e guanti da laboratorio durante la manipolazione dei reagenti. Evitare il contatto di questi materiali con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con abbondante acqua. Intervenire tempestivamente per prevenire possibili ustioni. In caso di fuoriuscita del reagente, diluire il liquido con acqua prima di asciugare.
- 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%.
- Nel laboratorio mantenere una temperatura coerente con le specifiche operative del sistema, descritte nell'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.

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 flacone e fiala di reagente per escludere eventuali perdite. In caso di perdite accertate, non utilizzare il materiale per il test.
- Il tampone di lisi 2 per **cobas® 4800** 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 test **cobas® HBV**, il kit 2 di preparazione dei campioni **cobas® 4800** e il kit 2 di diluente per campioni **cobas® 4800 System** 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 tampone di lisi 2 **cobas® 4800**, contenente guanidina tiocianato, entri in contatto con la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina). L'eventuale miscela potrebbe produrre gas altamente tossici.

Contaminazione

- Per evitare contaminazioni è necessario indossare i guanti da laboratorio e sostituirli tra la manipolazione dei campioni e dei reagenti **cobas® HBV**. Evitare di contaminare i guanti durante la manipolazione dei campioni e dei controlli. Indossare protezioni per gli occhi, camici e guanti da laboratorio durante la manipolazione dei campioni e dei reagenti del kit.
- Evitare la contaminazione dei reagenti con batteri e ribonucleasi.
- Potrebbero essere generati risultati falsi positivi senza un'adeguata prevenzione del carryover durante la manipolazione dei campioni.

Integrità

- Non utilizzare i kit dopo le date di scadenza.
- Non combinare i reagenti.
- Non utilizzare i consumabili dopo la data di scadenza.
- Tutti i consumabili sono monouso. Non riutilizzare.
- La manutenzione di tutte le apparecchiature deve essere conforme alle istruzioni fornite dal produttore.

Smaltimento

- Il test **cobas**® HBV, il kit 2 di preparazione dei campioni **cobas**® 4800 System e il kit 2 di diluenti **cobas**® 4800 System contengono sodio azide (vedere “**Avvertimenti e precauzioni**”). La sodio azide può reagire con le tubature di piombo e rame formando azidi metallici altamente esplosivi. Quando le soluzioni contenenti sodio azide vengono smaltite nei lavelli del laboratorio, è necessario sciacquare gli scarichi con abbondante acqua fredda per impedire l'accumulo di azidi.
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i materiali di scarto nel rispetto delle leggi vigenti.

Nota: *per lo smaltimento dei rifiuti liquidi, consultare l'Assistenza Utente del **cobas**® 4800 System.*

Fuoriuscite e pulizia

- Il tampone di lisi 2 **cobas**® 4800 contiene tiocianato di guanidinio. In caso di fuoriuscita di liquido contenente guanidina tiocianato, pulire con acqua e un detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido fuoriuscito contiene agenti potenzialmente infettivi, pulire la superficie interessata PRIMA con acqua e un detergente da laboratorio e poi con ipoclorito di sodio allo 0,5%.
- In caso di fuoriuscita di liquido sul **cobas**® x 480 instrument, pulire attenendosi alle istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del **cobas**® 4800 System.
- Per pulire il **cobas**® x 480 instrument o il **cobas**® z 480 analyzer, non utilizzare la soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina). Pulire il **cobas**® x 480 instrument o il **cobas**® z 480 analyzer attenendosi alle procedure descritte nell'Assistenza Utente del **cobas**® 4800 System.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

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

Conservare tutti i campioni alle temperature indicate.

La stabilità dei campioni risente delle temperature elevate.

Se si utilizzano campioni congelati in tubi secondari, mantenere i campioni a temperatura ambiente (15-30°C) finché non si saranno scongelati completamente, quindi 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.

Prelievo dei 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.

Nota: *l'utente è tenuto a seguire le istruzioni fornite dal produttore delle provette per la preparazione del siero/plasma.*

Trasporto, conservazione e stabilità dei campioni

- È possibile conservare e/o trasportare il sangue intero raccolto 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 nelle provette sterili con l'anticoagulante EDTA a 2-25°C per 24 ore al massimo, prima della preparazione del plasma/siero e dei successivi test.
- Dopo la separazione, i campioni di plasma/siero possono essere conservati in provette secondarie fino a 24 ore tra 2°C e 30°C, fino a 72 ore tra 2°C e 8°C o fino a 6 settimane a $\leq -18^{\circ}\text{C}$. I campioni di plasma/siero separati e contenuti nelle provette secondarie sono stabili per tre cicli di congelamento/scongelamento se congelati a $\leq -18^{\circ}\text{C}$.
- Per un'eventuale spedizione, imballare ed etichettare i campioni come previsto dai regolamenti nazionali e/o internazionali per il trasporto di campioni e agenti eziologici.

Istruzioni per l'uso

Esecuzione del test

Volume di analisi del campione

Il volume di analisi del campione predefinito per il test **cobas® HBV** è 400 µl. Per campioni con volume basso, è possibile selezionare 200 µl. Soltanto in questo caso sarà necessario caricare sul sistema un reagente aggiuntivo: il diluente 2 per **cobas® 4800 System**. Nella procedura guidata del software, l'utente verrà invitato ad aggiungere il reagente se ha selezionato il tipo di campione "Diluted serum or plasma" durante la creazione del work order.

Figura 1. Flusso di lavoro cobas® HBV

1	Avviare il sistema
2	Eseguire la manutenzione dello strumento
3	Prendere i campioni e i reagenti dal luogo in cui sono conservati
4	Avviare la seduta
5	Eseguire la scansione delle schede dei parametri
6	Caricare i campioni
7	Con sistema LIS: confermare il work order Senza sistema LIS: creare il work order
8	Caricare i consumabili (piastra di preparazione, micropiastra, rack portapuntali)
9	Caricare i reagenti
10	Avviare la seduta per la preparazione dei campioni
11	Scaricare e coprire la micropiastra
12	Caricare la micropiastra sull'analizzatore
13	Rimuovere i campioni, i reagenti usati e la piastra di preparazione
14	Rivedere i risultati
15	Con sistema LIS: inviare i risultati al sistema LIS
16	Scaricare tutto il materiale dall'analizzatore

Nota: per istruzioni operative dettagliate, consultare l'Assistenza Utente del **cobas® 4800 System**.

Dimensioni della seduta

I reagenti generici per la preparazione dei campioni (**cobas® 4800 System Sample Preparation Kit 2**, **cobas® 4800 System Lysis Kit 2** e **cobas® 4800 System Wash Buffer Kit**) sono disponibili in due formati, ognuno sufficiente per 10 sedute da 24 o da 96 campioni, compresi i controlli e i campioni dei pazienti da analizzare. Per il test **cobas® HBV** è disponibile un kit di un unico formato, che consente di analizzare massimo 120 campioni (10×12), inclusi i controlli e i campioni dei pazienti. Il kit di controllo **cobas® HBV/HCV/HIV-1** è disponibile in un unico formato adatto a tutte le configurazioni delle sedute. Per ogni batch di test è necessario includere un controllo positivo basso HBV/HCV/HIV-1, un controllo positivo alto HBV/HCV/HIV-1 e un controllo negativo. Per una seduta analitica singola è possibile includere al massimo 93 campioni e 3 controlli.

Nella Figura 1 è illustrata una sintesi della procedura.

Nota: *per un uso ottimale dei reagenti, è possibile utilizzare i reagenti generici per la preparazione dei campioni in una seduta contenente in totale da 1 a 21 campioni (formato del kit 10×24) o da 1 a 93 campioni (formato del kit 10×96). Non è tuttavia possibile mescolare formati diversi del kit del tampone di lavaggio per cobas® 4800 System, del kit 2 di preparazione dei campioni per cobas® 4800 System e del kit di lisi 2 per cobas® 4800 System. Ad esempio, se all'inizio della seduta viene letto il barcode di un flacone di reagente WB da 96 test, anche gli altri kit di preparazione dei campioni dovranno essere nel formato da 96 test.*

Flusso di lavoro

Il test cobas® HBV viene eseguito con il flusso di lavoro completo nel cobas® 4800 Software. Dopo la preparazione dei campioni sul cobas® x 480 instrument, è prevista la fase di amplificazione/rilevazione sul cobas® z 480 analyzer. Il test cobas® HBV non può essere eseguito in modalità batch misti, cioè insieme ad altri test. Per maggiori dettagli, consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.

1. Per l'avvio del sistema, seguire le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.
2. Eseguire gli interventi di manutenzione seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.
3. Reperire tutti i reagenti e i consumabili necessari. Tutti i reagenti, ad eccezione di HBV MMX R2 e MMX R1, devono raggiungere la temperatura ambiente prima di essere caricati sul cobas® x 480 instrument. I reagenti HBV MMX R2 e MMX R1 possono essere prelevati direttamente dal luogo in cui sono conservati a 2-8°C, in quanto avranno il tempo di raggiungere la temperatura ambiente sul cobas® x 480 instrument prima del loro utilizzo durante la seduta.

Nota: *tutti i reagenti e tutte le vaschette per reagenti sono monouso e sono provvisti di barcode. Il cobas® 4800 software tiene traccia dell'uso dei reagenti e delle vaschette e rifiuta i reagenti e le vaschette già utilizzati.*

4. Avviare una nuova seduta e selezionare il tipo di flusso di lavoro HBV.
5. Seguire la procedura guidata e scansionare il barcode sulle schede dei parametri per gli intervalli di controllo e i coefficienti di calibrazione.

Nota: *scansionare le schede dei parametri dei reagenti non scaduti. Il software non verifica la data di scadenza dei reagenti nelle schede dei parametri. Controllare la data di scadenza stampata sulla scheda dei parametri o sui kit dei reagenti prima di scansionare l>ID barcode corrispondente.*

6. Caricare i campioni. È possibile caricare i tubi primari o secondari; il volume minimo dei campioni dipenderà dal tipo e dalle dimensioni delle provette. Per maggiori dettagli, consultare la sezione “Tipi di provette campione supportate”.
7. Creare il work order. Per creare il work order, è possibile procedere in tre modi:
 - Utilizzando il Sample Editor prima di caricare il rack per campioni sul cobas® x 480 instrument (pulsante “Editor” sulla destra del menu principale). È possibile salvare, modificare e ricaricare i work order secondo necessità. Al momento di selezionare i risultati richiesti, scegliere “HBV”.
 - Avviare la procedura guidata per creare una nuova seduta e caricare i campioni sul cobas® x 480 instrument al momento opportuno. I barcode dei campioni saranno letti automaticamente, mentre i risultati richiesti per ogni campione devono essere definiti. Al momento di selezionare i risultati richiesti, scegliere “HBV”.
 - Utilizzare il sistema LIS della propria organizzazione.

Per maggiori dettagli, consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System. Durante la selezione dei risultati richiesti, scegliere l'opzione “HBV”. Caricare i campioni e definire/selezionare il work order oppure utilizzare il sistema LIS.

8. Caricare i consumabili seguendo le istruzioni visualizzate dalla procedura guidata. Non aggiungere o rimuovere singoli puntali da un rack portapuntali parzialmente utilizzato, poiché il software tiene il conto dei puntali rimanenti. Se i puntali disponibili non sono sufficienti per la seduta, viene generato un allarme.

9. Caricare i reagenti.

Caricare i reagenti per la preparazione dei campioni nelle apposite vaschette provviste di barcode. Le vaschette per reagenti sono disponibili in due formati: 200 ml e 50 ml. Seguire la procedura guidata per selezionare la vaschetta per reagenti del formato corretto. Il barcode delle vaschette per reagenti deve essere rivolto verso il lato destro del rack. Caricare i reagenti necessari per la preparazione dei campioni seguendo il metodo “scan-scan-pour-place”:

- “Scan”: scansionare il barcode dei flaconi dei reagenti.
- “Scan”: scansionare il barcode delle vaschette per reagenti.
- “Pour”: versare il reagente nella vaschetta.
- “Place”: collocare la vaschetta piena di reagente nella posizione prevista sul rack per reagenti.

Nota: *l'orologio interno del cobas® 4800 System calcola il tempo di permanenza dei reagenti sullo strumento. Dopo aver scansionato i barcode dei reagenti LYS 2 o WB, si ha 1 ora di tempo per completare il caricamento e fare clic sul pulsante “Start”. Nella scheda “Workplace” viene visualizzato un cronometro del tempo residuo. Il sistema non permetterà alla seduta di iniziare se il tempo è scaduto.*

Nota: *per garantire un trasferimento accurato delle biglie magnetiche (magnetic glass particles, MGP), agitare con vigore il flacone MGP immediatamente prima di versarlo nella vaschetta per reagenti.*

10. Caricare le fiale dei reagenti di amplificazione/rilevazione (HBV MMX R2, MMX R1 e DNA QS), le fiale dei controlli [HBV/HCV/HIV-1 L(+)C, HBV/HCV/HIV-1 H(+)C e (–) C] e le fiale dei reagenti generici (P2 e SD2 secondo necessità) direttamente sul rack per reagenti.

Nota: *per prevenire interruzioni delle sedute e contaminazioni indesiderate, è necessario scuotere verso il basso le fiale dei reagenti per evitare la formazione di bolle d'aria/pellicole liquide. Durante l'apertura dei controlli, iniziare da quello più vicino all'operatore (dalla posizione 24 alla 1). Sostituire i guanti da laboratorio dopo avere manipolato i controlli positivi.*

11. Avviare la seduta per la preparazione dei campioni. Se la seduta di preparazione dei campioni termina correttamente, vengono visualizzati i pulsanti “Sample Preparation results” e “Unload”. Se lo si desidera, è possibile selezionare il pulsante “Sample Preparation results” per rivedere i risultati e quindi selezionare “Unload” per scaricare i rack per piastre. In alternativa è possibile selezionare “Unload” per scaricare il rack per piastre senza rivedere i risultati. Consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.

12. Dopo avere scaricato la micropiastra, seguire le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del cobas® 4800 System per sigillare e trasferire la piastra sul cobas® z 480 analyzer.

13. Caricare la micropiastra sull'analizzatore e avviare la seduta di amplificazione e rilevazione seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.

Nota: *l'orologio interno del cobas® 4800 System calcola il tempo trascorso da quando i campioni preparati sono stati aggiunti alla soluzione Master Mix attivata. L'amplificazione e la rilevazione devono iniziare il prima possibile e comunque entro e non oltre 40 minuti dalla fine della seduta sul cobas® x 480 instrument. Nella scheda “Workplace” viene visualizzato un cronometro del tempo residuo. Il sistema annullerà la seduta allo scadere del tempo.*

14. Rimuovere i campioni, i reagenti usati e la piastra di preparazione seguendo le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.

15. Al termine della seduta di amplificazione e rilevazione, seguire le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del cobas® 4800 System per rivedere e accettare i risultati.

16. Se è disponibile un sistema LIS, inviare i risultati al LIS.

17. Seguire le istruzioni contenute nell'Assistenza Utente del cobas® 4800 System per scaricare la micropiastra dal cobas® z 480 analyzer.

Risultati

Il cobas® 4800 System rileva 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

- In ogni batch vengono inclusi un controllo negativo (-) C e due controlli positivi, un controllo positivo basso HBV/HCV/HIV-1 L(+)C e un controllo positivo alto HBV/HCV/HIV-1 H(+)C.
- Nel cobas® 4800 software e/o nel report verificare se il batch è valido.
- Il cobas® 4800 software invalida automaticamente i risultati se il controllo negativo e il controllo positivo falliscono.

Interpretazione dei risultati dei controlli

Tabella 1. Interpretazione dei risultati dei controlli positivi e negativi

Controllo negativo	Risultato	Interpretazione
(-) C	Target Not Detected	Il controllo è valido. DNA di HBV non rilevato.
	Invalid	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo negativo non è negativo.
Controllo positivo	Risultato	Interpretazione
HBV/HCV/HIV-1 L(+)C	Titer	Il controllo è valido. Il titolo calcolato rientra nell'intervallo di controllo.
	Invalid	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo basso non rientra nell'intervallo assegnato.
HBV/HCV/HIV-1 H(+)C	Titer	Il controllo è valido. Il titolo calcolato rientra nell'intervallo di controllo.
	Invalid	Un risultato non valido, oppure il risultato del titolo calcolato per il controllo positivo alto non rientra nell'intervallo assegnato.

Interpretazione dei risultati

Nota: la validità di tutti i test e i batch è verificata dal cobas® 4800 software.

Nota: un batch valido può includere risultati dei campioni sia validi che non validi.

Se una seduta è valida, vedere l'interpretazione dei risultati dei campioni nella Tabella 2.

Tabella 2. Interpretazione dei risultati

cobas® HBV	Report e interpretazione dei risultati
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 = 1,00E+01 UI/ml (400 µl e 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 (400 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.

Elenco dei flag dei risultati

Nella tabella seguente sono riassunti tutti gli avvisi (flag) che hanno rilevanza ai fini dell'interpretazione dei risultati.

Tabella 3. Elenco dei flag

Codice flag	Descrizione	Azione consigliata
R4800	Il target non è valido per un errore di calcolo.	Il target non è valido per un errore di calcolo. 1. Eseguire la rerun del campione. 2. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica Roche.
R4801	Lo standard di quantificazione non è valido.	Lo standard di quantificazione non è valido per un campione. 1. Eseguire la rerun del campione. 2. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica Roche.
R4802	Un controllo esterno non è valido.	Un controllo esterno non è valido. ^a 1. Ripetere l'intera seduta utilizzando reagenti nuovi. 2. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica Roche.
R4803	Lo standard di quantificazione non è valido.	Lo standard di quantificazione non è valido per un controllo esterno. 1. Ripetere l'intera seduta utilizzando reagenti nuovi. 2. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica Roche.
R4804	Il controllo esterno non rientra nell'intervallo.	Il controllo esterno non rientra nell'intervallo. ^b 1. Ripetere l'intera seduta utilizzando reagenti nuovi. 2. Se il problema persiste, contattare l'assistenza tecnica Roche.
X3	Errore: rilevato coagulo. Il campione non è stato analizzato.	Verificare che i campioni siano stati trattati in conformità alle istruzioni per l'uso. 1. Verificare se il campione contiene coaguli. 2. Eseguire la rerun del campione.
X4	Errore: errore di pipettamento. Il campione non è stato analizzato.	La causa più probabile è che il volume del campione è insufficiente oppure si è verificato un errore meccanico durante il pipettamento. 1. Verificare che il volume del campione sia sufficiente. 2. Verificare che la piastra di espulsione puntali sia nella posizione corretta. 3. Eseguire la rerun del campione.

^a Questo è un flag di esempio e viene generato quando un controllo esterno incluso nella seduta non è valido.

^b Questo flag include tutte le situazioni in cui il controllo esterno non è valido (identificazione del target o titolo).

Nota: *per conoscere tutti i flag di sistema, consultare l'Assistenza Utente del cobas® 4800 System.*

Limiti della procedura

1. Il test **cobas**® HBV è stato valutato soltanto in associazione con il kit di controllo **cobas**® HBV/HCV/HIV-1, il kit 2 di preparazione dei campioni **cobas**® 4800 System, il kit 2 di lisi **cobas**® 4800 System, il kit del tampone di lavaggio **cobas**® 4800 System e il kit 2 di diluente per campioni **cobas**® 4800 System.
2. L'affidabilità dei risultati dipende dall'adeguatezza delle procedure di raccolta, trasporto, conservazione e trattamento dei campioni. Rispettare tutte le procedure descritte nel presente documento di istruzioni per l'uso (definito anche foglio illustrativo) e nell'Assistenza Utente del **cobas**® 4800 System.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Il valore predittivo di un saggio dipende dalla prevalenza della patologia in una determinata popolazione.
7. L'aggiunta dell'enzima AmpErase al reagente Master Mix del test **cobas**® HBV consente l'amplificazione selettiva dell'acido nucleico target, tuttavia per evitare la contaminazione dei reagenti e delle miscele di amplificazione è necessario attenersi scrupolosamente alle buone pratiche di laboratorio e alle procedure descritte nel presente foglio illustrativo.
8. L'uso di questo prodotto deve essere consentito esclusivamente a personale adeguatamente addestrato nelle tecniche PCR e nell'uso del **cobas**® 4800 System.
9. Soltanto il **cobas**® x 480 instrument e il **cobas**® z 480 analyzer sono stati approvati per l'uso con questo prodotto. Non è possibile utilizzare altri strumenti per la preparazione dei campioni o altri sistemi PCR con questo prodotto.
10. A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, è consigliabile che gli utenti, prima di passare da una tecnologia a un'altra, svolgano studi sulla correlazione tra i metodi nei propri laboratori allo scopo di qualificare tali differenze. Si consiglia agli utenti di elaborare norme/procedure specifiche.
11. La contaminazione crociata può essere la causa di risultati falsi positivi. Il tasso di contaminazione crociata da campione a campione per il test **cobas**® HBV è stato determinato in uno studio non clinico ed è dello 0,0% con un intervallo di confidenza al 95% unilaterale dell'1,3%. È stata studiata anche la contaminazione crociata da seduta a seduta.
12. Il test **cobas**® HBV non è destinato all'uso per lo screening dell'HBV nel sangue o negli emoderivati o come test diagnostico per confermare la presenza di un'infezione da HBV.

Valutazione delle prestazioni non cliniche

Caratteristiche delle prestazioni

Limite di sensibilità (LoD)

Standard Internazionale OMS

Per determinare il limite di sensibilità del test **cobas® HBV**, lo Standard Internazionale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità per il DNA di HBV destinato ai test basati sulla tecnologia di amplificazione dell'acido nucleico (2° standard internazionale OMS, codice NIBSC 97/750), genotipo A, ottenuto dal NIBSC, è stato diluito in serie in plasma EDTA o in siero HBV-negativi, con volumi di analisi del campione di 400 µl e di 200 µl. I pannelli, costituiti da sei livelli di concentrazione più un campione negativo, sono stati analizzati utilizzando tre lotti di reagenti **cobas® HBV** in più sedute, in più giorni e con più operatori e strumenti.

I risultati relativi ai campioni di siero e plasma EDTA nei due volumi preparati sono riportati nella Tabella 4 e nella Tabella 7. Lo studio dimostra che il test **cobas® HBV** rileva il DNA di HBV a una concentrazione di 4,4 UI/ml nel plasma EDTA e di 2,8 UI/ml nel siero, con un tasso di successo $\geq 95\%$ in base all'analisi PROBIT per il volume di analisi del campione di 400 µl; a una concentrazione di 7,6 UI/ml nel plasma EDTA e di 5,5 UI/ml nel siero, con un tasso di successo $\geq 95\%$ in base all'analisi PROBIT per il volume di analisi del campione di 200 µl.

Tabella 4. Limite di sensibilità per il plasma EDTA (400 µl)

Concentrazione del titolo iniziale (DNA di HBV, UI/ml)	N. ripetizioni valide	Numero di positivi	Tasso di successo
25,0	126	126	100,0%
15,0	126	126	100,0%
10,0	126	126	100,0%
5,0	126	122	96,8%
2,0	125	94	75,2%
0,5	126	38	30,2%
0,0	36	0	0,0%
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	4,4 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 3,6-5,7 UI/ml		

Tabella 5. Limite di sensibilità per il siero (400 µl)

Concentrazione del titolo iniziale (DNA di HBV, UI/ml)	N. ripetizioni valide	Numero di positivi	Tasso di successo
25,0	125	125	100,0%
15,0	126	126	100,0%
10,0	126	126	100,0%
5,0	126	126	100,0%
2,0	126	109	86,5%
0,5	126	54	42,9%
0,0	36	0	0,0%
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	2,8 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 2,3-3,8 UI/ml		

Tabella 6. Limite di sensibilità per il plasma EDTA (200 µl)

Concentrazione del titolo iniziale (DNA di HBV, UI/ml)	N. ripetizioni valide	Numero di positivi	Tasso di successo
25,0	126	126	100,0%
15,0	126	125	99,2%
10,0	126	125	99,2%
5,0	126	109	86,5%
2,0	126	71	56,4%
0,5	126	18	14,3%
0,0	36	0	0,0%
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	7,6 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 6,3-9,6 UI/ml		

Tabella 7. Limite di sensibilità per il siero (200 µl)

Concentrazione del titolo iniziale (DNA di HBV, UI/ml)	N. ripetizioni valide	Numero di positivi	Tasso di successo
25,0	126	126	100,0%
15,0	126	126	100,0%
10,0	126	126	100,0%
5,0	126	115	91,3%
2,0	126	90	71,4%
0,5	126	26	20,6%
0,0	36	0	0,0%
LoD tramite analisi PROBIT con tasso di successo al 95%	5,5 UI/ml Intervallo di confidenza al 95%: 4,5-7,0 UI/ml		

Intervallo lineare

La linearità del test **cobas**® HBV è stata determinata analizzando una serie di diluizioni costituita da ≥ 14 membri del pannello con il genotipo HBV predominante (GT A), rappresentativi dell'intero intervallo lineare del test. I campioni del pannello con titolo alto sono stati preparati da uno stock di DNA lambda con titolo alto, mentre i campioni del pannello con titolo basso sono stati preparati da un campione clinico (clinical sample, CS) con titolo alto. Il pannello dello studio di linearità è stato concepito prevedendo una sovrapposizione del titolo di $2 \log_{10}$ tra i due materiali di origine.

Con il volume di analisi del campione di 400 μl , il test **cobas**® HBV è lineare per il plasma EDTA e per il siero tra 10,0 UI/ml e $1,0\text{E}+09$ UI/ml, con una deviazione massima dalla regressione nonlineare di migliore adattamento minore o uguale a $\pm 0,06 \log_{10}$. Sull'intero intervallo lineare, l'accuratezza del test è stata di $\pm 0,08 \log_{10}$ per il plasma EDTA e di $\pm 0,12 \log_{10}$ per il siero.

Con il volume di analisi del campione di 200 μl , il test **cobas**® HBV è lineare per il plasma EDTA e per il siero tra 10,0 UI/ml e $1,0\text{E}+09$ UI/ml, con una deviazione massima dalla regressione nonlineare di migliore adattamento minore o uguale a $\pm 0,05 \log_{10}$. Sull'intero intervallo lineare, l'accuratezza del test è stata di $\pm 0,08 \log_{10}$ per il plasma EDTA e di $\pm 0,16 \log_{10}$ per il siero.

Per una rappresentazione dei risultati, vedere dalla Figura 2 alla Figura 5.

Figura 2. Linearità per il plasma EDTA (400 μl)

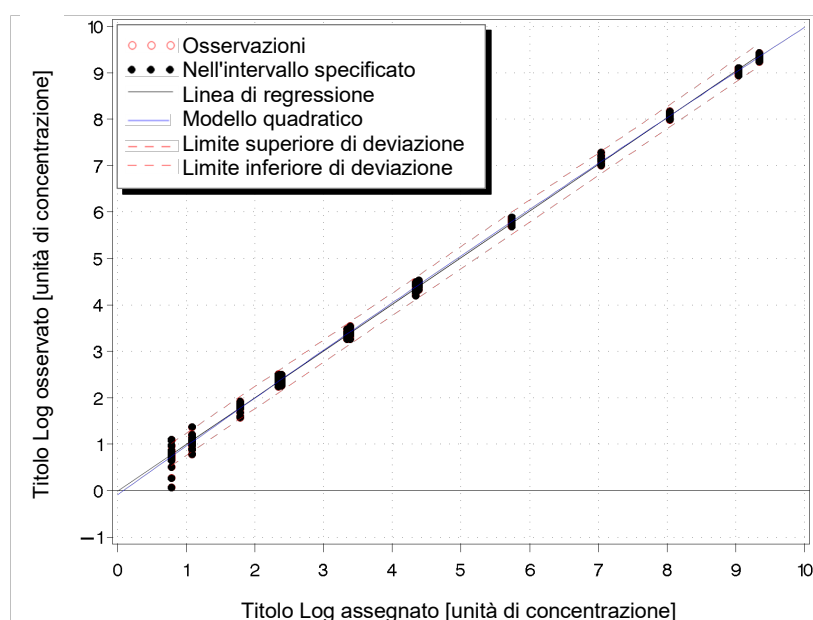


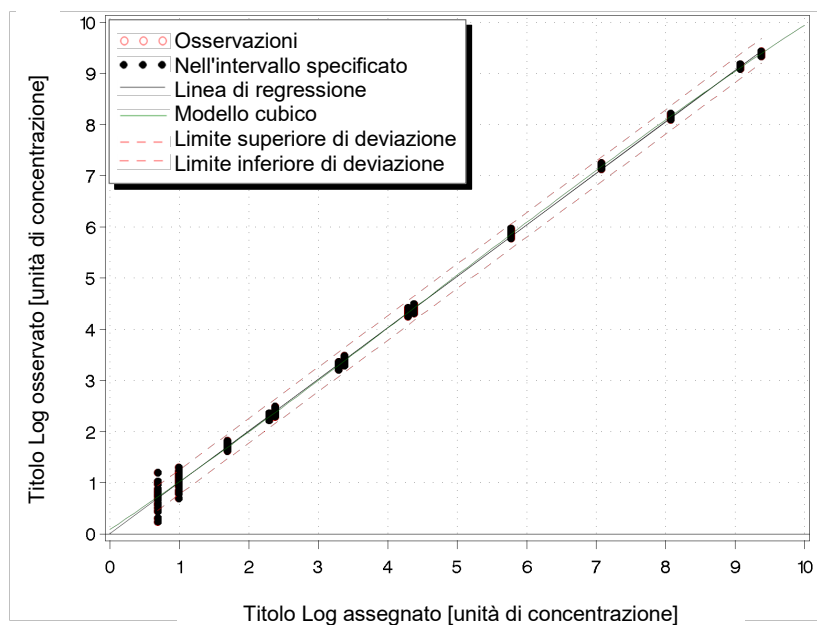
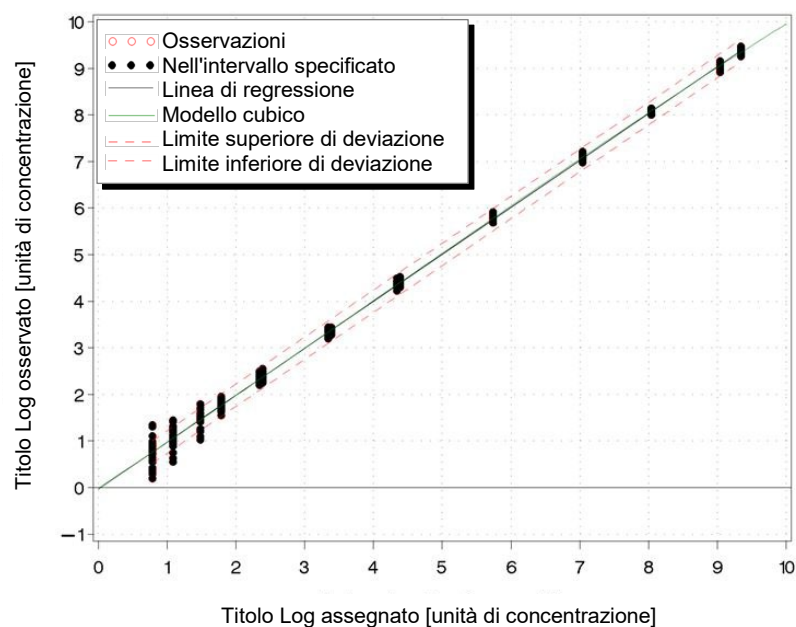
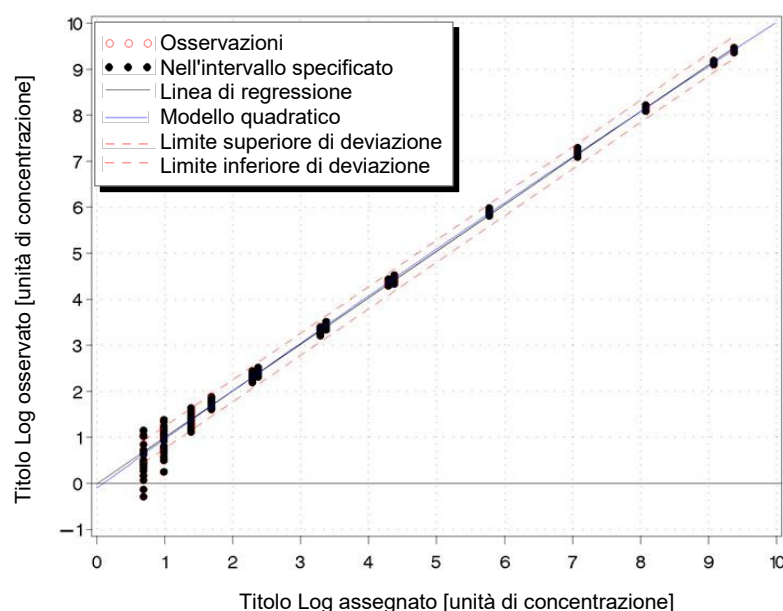
Figura 3. Linearità per il siero (400 µl)**Figura 4. Linearità per il plasma EDTA (200 µl)**

Figura 5. Linearità per il siero (200 µl)

Precisione intra-laboratorio

La precisione del test **cobas® HBV** è stata determinata analizzando diluizioni seriali di campioni clinici (CS) del genotipo di HBV (GT A) e stock di DNA lambda con alto titolo di HBV (DNA lambda) in plasma EDTA e in siero HBV-negativi. Sono stati analizzati sette livelli di diluizione con 72 ripetizioni per ogni livello, matrice e volume di analisi del campione, utilizzando tre lotti di reagenti **cobas® HBV** con tre strumenti e tre operatori per 12 giorni. Ogni campione è stato sottoposto all'intera procedura prevista per il test **cobas® HBV** sul **cobas® 4800 System**. La precisione riferita in questa sede è dunque rappresentativa di tutti gli aspetti della procedura del test. I risultati sono riportati dalla Tabella 8 alla Tabella 11.

Il test **cobas® HBV** ha evidenziato un'elevata precisione per i tre lotti di reagenti analizzati su un intervallo di concentrazione compreso tra $2,5E+01$ UI/ml e $1,0E+09$ UI/ml, con entrambi i volumi di analisi del campione presi in considerazione (200 µl e 400 µl).

Tabella 8. Precisione intra-laboratorio del test cobas® HBV (campioni di plasma EDTA - volume di analisi 400 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
$1,0E+09$	$1,10E+09$	DNA Lambda	0,07	0,08	0,05	0,07
$1,0E+07$	$1,10E+07$	DNA Lambda	0,05	0,05	0,05	0,05
$5,0E+05$	$5,49E+05$	DNA Lambda	0,06	0,04	0,05	0,05
$2,0E+04$	$2,44E+04$	CS	0,06	0,05	0,05	0,05
$2,0E+03$	$2,44E+03$	CS	0,08	0,06	0,06	0,07
$2,0E+02$	$2,44E+02$	CS	0,06	0,07	0,06	0,06
$2,5E+01$	$3,05E+01$	CS	0,14	0,13	0,09	0,12

*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 9. Precisione intra-laboratorio del test cobas® HBV (campioni di siero - volume di analisi 400 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
1,0E+09	1,19E+09	DNA Lambda	0,04	0,04	0,03	0,04
1,0E+07	1,19E+07	DNA Lambda	0,05	0,05	0,04	0,05
5,0E+05	5,93E+05	DNA Lambda	0,03	0,04	0,03	0,03
2,0E+04	1,95E+04	CS	0,04	0,03	0,03	0,03
2,0E+03	1,95E+03	CS	0,03	0,02	0,03	0,03
2,0E+02	1,95E+02	CS	0,05	0,04	0,03	0,04
2,5E+01	2,44E+01	CS	0,16	0,08	0,14	0,13

*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 10. 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
1,0E+09	1,10E+09	DNA Lambda	0,04	0,06	0,04	0,05
1,0E+07	1,10E+07	DNA Lambda	0,04	0,07	0,05	0,05
5,0E+05	5,49E+05	DNA Lambda	0,03	0,04	0,04	0,04
2,0E+04	2,44E+04	CS	0,04	0,05	0,06	0,05
2,0E+03	2,44E+03	CS	0,05	0,07	0,05	0,06
2,0E+02	2,44E+02	CS	0,05	0,07	0,04	0,06
2,5E+01	3,05E+01	CS	0,30	0,14	0,22	0,23

*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 11. Precisione intra-laboratorio del test cobas® HBV (campioni di 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
1,0E+09	1,19E+09	DNA Lambda	0,02	0,02	0,02	0,02
1,0E+07	1,19E+07	DNA Lambda	0,03	0,04	0,04	0,04
5,0E+05	5,93E+05	DNA Lambda	0,02	0,03	0,04	0,03
2,0E+04	1,95E+04	CS	0,03	0,02	0,03	0,03
2,0E+03	1,95E+03	CS	0,04	0,03	0,03	0,03
2,0E+02	1,95E+02	CS	0,06	0,15	0,05	0,10
2,5E+01	2,44E+01	CS	0,14	0,18	0,15	0,16

*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.

Verifica del genotipo

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

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

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

I campioni clinici di DNA di HBV corrispondenti a otto diversi genotipi (B, C, D, E, F, G, H, mutante pre-core G1896A) sono stati diluiti in plasma EDTA e in siero fino alla concentrazione LoD del plasma EDTA del genotipo predominante (HBV GT A), in base all'analisi LoD con tasso di successo al 95% (5,0 UI/ml). L'analisi del tasso di successo è stata eseguita con 42 ripetizioni per ogni genotipo e matrice di campioni. I risultati dimostrano che il test **cobas®** HBV ha rilevato l'HBV per i genotipi di HBV B, C, D, E, F, G e mutante pre-core (PC) alla concentrazione di 5 UI/ml, con un limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% unilaterale che maggiore o uguale al tasso di successo atteso del 95%.

Tabella 12. Verifica LoD dei genotipi di HBV B-H e mutante pre-core, in 400 µl di plasma EDTA

Genotipo	Tasso di successo	Limite superiore IC 95% unilaterale
B	97,6%	99,9%
C	95,2%	99,2%
D	100,0%	100,0%
E	100,0%	100,0%
F	100,0%	100,0%
G	100,0%	100,0%
H	90,5%	96,7%
PC	100,0%	100,0%

Tabella 13. Verifica LoD dei genotipi di HBV B-H e mutante pre-core, in 400 µl di siero

Genotipo	Tasso di successo	Limite superiore IC 95% unilaterale
B	100,0%	100,0%
C	100,0%	100,0%
D	100,0%	100,0%
E	100,0%	100,0%
F	100,0%	100,0%
G	100,0%	100,0%
H	97,6%	99,9%
PC	100,0%	100,0%

Verifica dell'intervallo lineare per i genotipi B-H e il mutante pre-core

La serie di diluizioni utilizzata nella verifica dello studio di linearità dei genotipi per il test **cobas**® HBV era costituita da un pannello di nove membri, rappresentativi dell'intervallo lineare previsto. I campioni del pannello con titolo alto sono stati preparati da uno stock di DNA lambda con titolo alto, mentre i campioni del pannello con titolo basso sono stati preparati da un campione clinico (clinical sample, CS) con titolo alto. Il pannello dello studio di linearità è stato concepito prevedendo una sovrapposizione minima del titolo di 2 log₁₀ tra i due materiali di origine. L'intervallo lineare del test **cobas**® HBV era compreso tra i valori LLoQ (10,0 UI/ml per 400 µl di volume di analisi del campione) e ULoQ (1,0E+09 UI/ml) e includeva almeno due punti di decisione medica. Sono state eseguite dodici ripetizioni per livello in plasma EDTA.

L'intervallo lineare del test **cobas**® HBV è stato verificato per tutti gli otto genotipi (B, C, D, E, F, G, H e mutante pre-core). La deviazione massima tra la regressione lineare e la regressione nonlineare di migliore adattamento è risultata minore o uguale a ±0,08 log₁₀.

Specificità analitica

La specificità analitica del test **cobas**® HBV è stata valutata diluendo un pannello di patogeni (Tabella 14) in plasma EDTA negativo per il DNA di HBV e positivo per il DNA di HBV. I patogeni sono stati aggiunti al plasma EDTA negativo e sono stati analizzati con e senza il DNA di HBV. Il test **cobas**® HBV ha generato risultati negativi per tutti i campioni contenenti i patogeni ma non il target HBV, mentre ha generato risultati positivi per tutti i campioni contenenti sia i patogeni che il target HBV. Inoltre, per ognuno dei campioni HBV-positivi contenenti organismi che possono causare potenziali reazioni crociate, la media del titolo log₁₀ si è attestata entro ± 0,12 log₁₀ rispetto alla media del titolo log₁₀ del rispettivo controllo spike positivo.

Tabella 14. Patogeni analizzati per verificarne la reattività crociata

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

Specificità analitica e sostanze interferenti

Sono stati analizzati campioni contenenti livelli elevati di sostanze endogene potenzialmente interferenti: trigliceridi (27,9-30,1 g/l), bilirubina coniugata (0,18-0,22 g/l), bilirubina non coniugata (0,19-0,2 g/l), albumina (57,8-60,6 g/l), emoglobina (1,8-2,3 g/l) e DNA umano (2 mg/l), sia in presenza che in assenza di DNA di HBV. Le sostanze che sono state analizzate non hanno interferito con le prestazioni del test **cobas**® HBV. Non ha interferito con il test neppure la presenza di marker di patologie autoimmuni quali il lupus eritematoso sistemico (LES), l'artrite reumatoide (AR) e gli anticorpi antinucleo (ANA).

Per ognuno dei campioni HBV-positivi contenenti sostanze endogene potenzialmente interferenti e marker di patologie autoimmuni, la media del titolo $\log_{10}$ era compresa tra $-0,05 \log_{10}$ e $0,07 \log_{10}$ rispetto alla media del titolo $\log_{10}$ del rispettivo controllo spike positivo.

In più i composti farmacologici elencati nella Tabella 15 sono stati analizzati a concentrazioni pari a tre volte il valore $C_{\max}$, sia in presenza che in assenza di DNA di HBV.

Tabella 15. Composti farmacologici analizzati per verificare l'interferenza con il test cobas® HBV ai fini della quantificazione del DNA di HBV

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

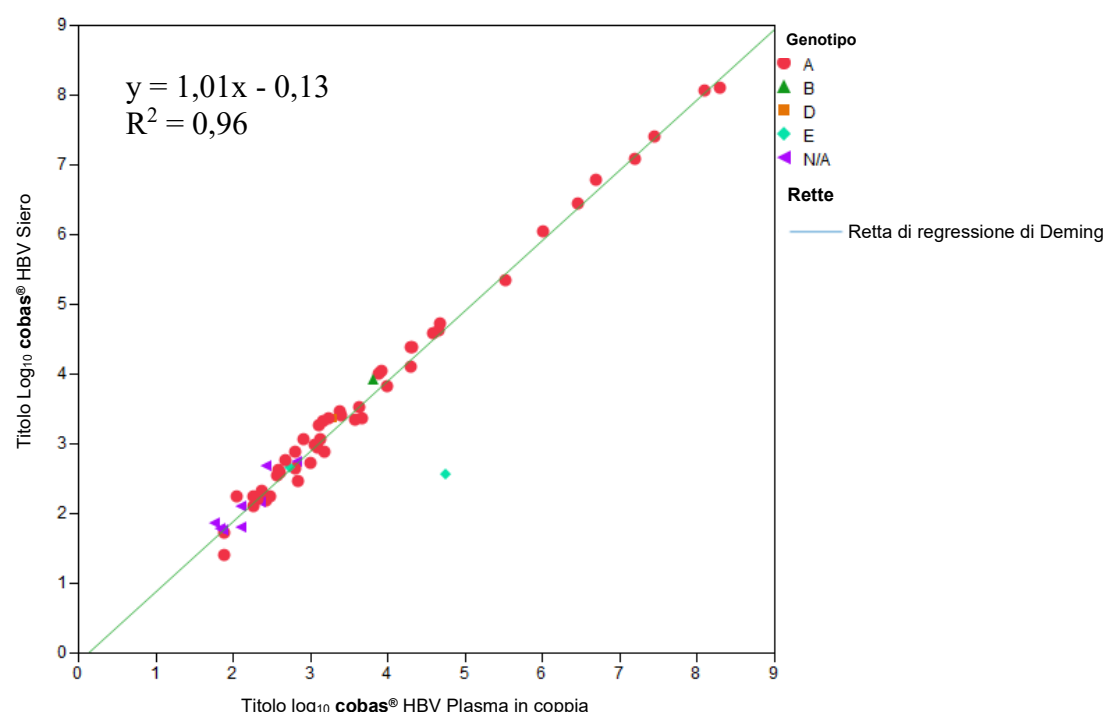
Nessuno dei composti farmacologici potenzialmente interferenti ha di fatto interferito con le prestazioni del test. Il test cobas® HBV ha prodotto risultati negativi per tutti i campioni in cui era assente il target HBV, mentre ha prodotto risultati positivi per tutti i campioni in cui era presente il target HBV. Inoltre, per ognuno dei campioni HBV-positivi contenenti componenti farmacologici potenzialmente interferenti, la media del titolo $\log_{10}$ era compresa tra $-0,02 \log_{10}$ e $0,03 \log_{10}$ rispetto alla media del titolo $\log_{10}$ del rispettivo controllo spike positivo.

Equivalenza tra matrici – Plasma EDTA e siero

Sono state analizzate 119 coppie di campioni di plasma EDTA e di siero per studiare l'equivalenza tra le matrici. Di queste, 59 coppie di campioni erano HBV-positivi. I campioni HBV-positivi appartenevano ai genotipi A, B, D ed E lungo l'intervallo lineare.

La deviazione del titolo medio delle coppie di campioni di plasma EDTA e di siero analizzate è stata di $-0,10 \log_{10}$ (intervallo di confidenza al 95%: $-0,18$; $-0,01$) (Figura 6).

Figura 6. Prestazioni dell'equivalenza tra matrici - Plasma EDTA e siero



Tasso globale d'errore del sistema

Per quanto riguarda il tasso globale d'errore del sistema per il test **cobas® HBV**, è stato calcolato eseguendo 100 ripetizioni del test su campioni di plasma EDTA arricchiti con il target HBV. I campioni sono stati analizzati a una concentrazione del target pari a circa 3 x LoD (15,0 UI/ml).

Dai risultati di questo studio si evince che tutte le ripetizioni dei test hanno prodotto risultati validi e positivi per il target HBV, generando un tasso globale d'errore del sistema dello 0,0%. L'intervallo di confidenza esatto al 95% bilaterale è pari allo 0,0% per il limite inferiore e al 3,6% per il limite superiore [0,0%; 3,6%].

Contaminazione crociata

Il tasso di contaminazione crociata del test **cobas® HBV** è stato calcolato eseguendo 230 ripetizioni del test su campioni di plasma EDTA HBV-negativi e 235 ripetizioni del test su campioni con titolo HBV elevato a 1,4E+09 UI/ml.

Complessivamente sono state eseguite cinque sedute con campioni positivi e negativi in una configurazione a scacchiera.

Tutte le 230 ripetizioni dei campioni negativi sono risultate valide e negative, generando un tasso di contaminazione crociata dello 0,0% con un intervallo di confidenza al 95% unilaterale dell'1,3%.

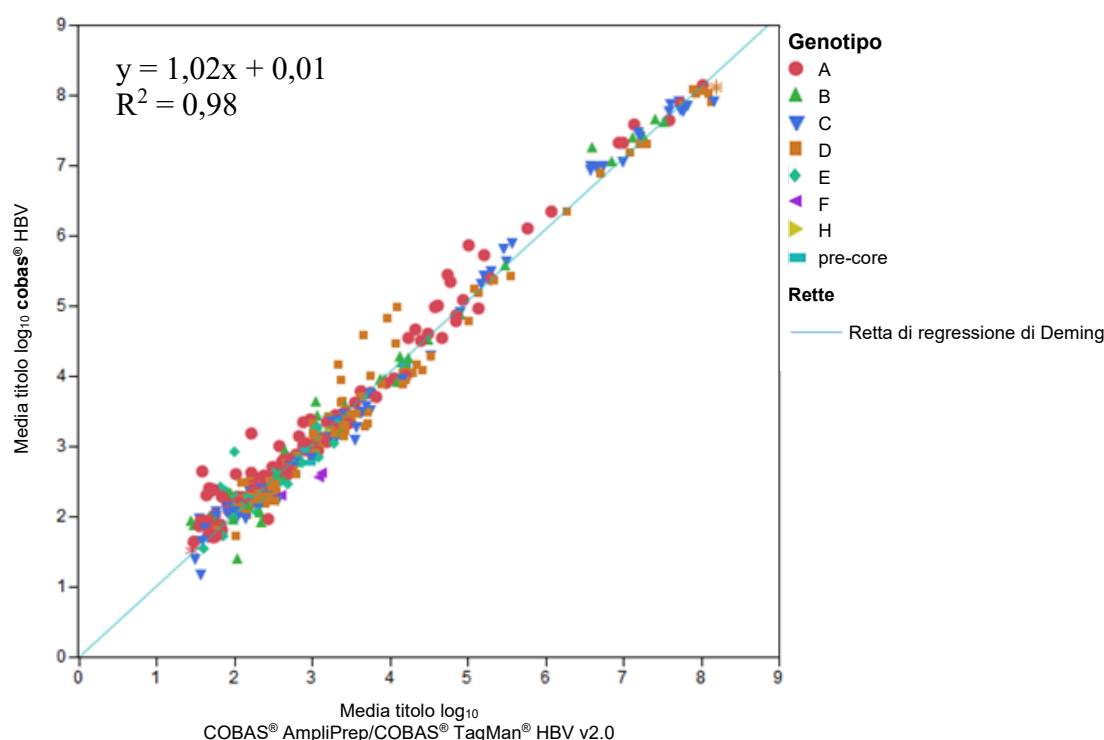
Valutazione delle prestazioni cliniche

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

Le prestazioni del test **cobas® HBV** sono state confrontate con quelle del dosaggio COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Quantitative Test, v2.0 (TaqMan® HBV Test v2.0) analizzando i campioni di siero e di plasma EDTA ottenuti da pazienti con infezione da HBV. In totale sono stati analizzati in duplicato 215 campioni di plasma EDTA e 170 campioni di siero, rappresentativi di tutti i genotipi di HBV (tranne il genotipo G), ottenendo risultati validi e compresi entro l'intervallo di quantificazione dei due test. È stata eseguita l'analisi di regressione di Deming. La deviazione del titolo medio dei campioni analizzati con i due test è stata di 0,06 log₁₀ (intervallo di confidenza al 95%: 0,04; 0,09).

I risultati della regressione di Deming sono riportati nella Figura 7. Il colore rappresenta il genotipo.

Figura 7. Analisi di regressione del test cobas® HBV rispetto al test TaqMan® HBV v2.0 eseguiti su campioni di plasma EDTA e siero



Specificità

La specificità del test **cobas® HBV** è stata determinata analizzando campioni di plasma EDTA e di siero HBV- negativi ottenuti da donatori individuali. Sono stati analizzati 615 campioni individuali di plasma EDTA e 613 campioni individuali di siero (risultati totali: 1228) con tre lotti di reagenti **cobas® HBV**. Sono risultati negativi per il DNA di HBV 615 campioni di plasma EDTA e 613 campioni di siero. Nel pannello di analisi, la specificità del test **cobas® HBV** è stata del 100,0% per il plasma e il siero (intervallo di confidenza al 95% unilaterale del 99,5%).

Informazioni supplementari

Caratteristiche specifiche del test

Tipo di campione	Plasma EDTA, siero		
Volume di analisi del campione	400 µl o 200 µl		
Sensibilità analitica	Plasma EDTA:	4,4 UI/ml (400 µl)	Siero: 2,8 UI/ml (400 µl)
		7,6 UI/ml (200 µl)	5,5 UI/ml (200 µl)
Intervallo lineare	400 µl: Tra 10,0 UI/ml e 1,0E+09 UI/ml		
	200 µl: Tra 10,0 UI/ml e 1,0E+09 UI/ml		
Specificità	100,0% (intervallo di confidenza al 95% unilaterale: 99,5%)		
Genotipi identificati	Genotipi di HBV A-H, mutante pre-core G1896A		

Simboli

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

Tabella 16. 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 <i>(Nota: il paese e/o la regione applicabili potrebbero essere indicati sotto il simbolo.)</i>	Site	Laboratorio
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 lotto	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

Fabbricante

Tabella 17. Fabbricante



Fabbricato negli USA

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

Prodotto in USA

Marchi e brevetti

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

Copyright

©2024 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. Buy 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. Belonia EA, Costa J, Gareen IF, et al. National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis B. *Ann Intern Med*. 2009; 150:104-110.
12. 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.
13. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology*. 1992;10:413-417.
14. Heid CA, Stevens J, Livak JK, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 1996; 6: 986-994.
15. 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.
16. 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.
17. Savva R, McAuley-Hecht K, Brown T, Pearl L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature*. 1995;373:487-493.
18. Mol CD, Arvai AS, Slupphaug G, et al. Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis. *Cell*. 1995;80:869-878.

19. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4:Wayne, PA;CLSI, 2014.

Revisione del documento

Informazioni sulla revisione del documento	
Doc Rev. 7.0 02/2024	Aggiornamento delle informazioni sui pericoli dei Lysis Kit 2. Aggiornamento della pagina dei simboli armonizzati. Aggiunta della sezione Assistenza tecnica. Aggiornamento agli Operatori Economici correnti. Aggiornamento della sezione Marchi e brevetti, collegamento incluso. Aggiunta della dichiarazione "Prodotto in". Aggiornamento dei marchi cobas®. Aggiunta del simbolo "Rx Only". Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.
Doc Rev. 8.0 08/2024	Aggiornamento delle informazioni sui pericoli dei Wash Buffer Kit. Rimozione del simbolo "Rx Only" dalla prima pagina. Aggiornamento della pagina dei simboli armonizzati. Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.
Doc Rev. 9.0 10/2024	Revisione per conformità ai requisiti IVDR. Aggiunta del codice NIBSC per lo standard internazionale OMS. Definizione della regione di legame per il primer. Aggiunta della sezione "Valutazione delle prestazioni cliniche". Aggiunta della dichiarazione di uso previsto per il cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit. Per ulteriori domande e chiarimenti, è possibile rivolgersi al rappresentante Roche locale.

Per prendere visione del report sintetico sulla sicurezza e sulle prestazioni, utilizzare il seguente collegamento:
<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>