# cobas® HBV

## Quantitativer Nukleinsäuretest
## zur Verwendung auf den cobas® 6800/8800 Systems

*In-vitro-Diagnostikum*

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

# Inhaltsverzeichnis

Verwendungszweck ..... 4

Zusammenfassung und Erklärung des Tests ..... 4

Reagenzien und Materialien ..... 7

cobas® HBV-Reagenzien und Kontrollen ..... 7

cobas omni-Reagenzien für die Probenvorbereitung ..... 10

Lagerung und Handhabung der Reagenzien ..... 11

Zusätzlich benötigte Materialien ..... 12

Benötigte Geräte und Software ..... 12

Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung ..... 13

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen ..... 13

Umgang mit Reagenzien ..... 14

Gute Laborpraxis ..... 14

Entnahme, Transport und Lagerung von Proben ..... 14

Proben ..... 15

Gebrauchsanleitung ..... 16

Hinweise zum Verfahren ..... 16

Durchführen des cobas® HBV-Tests ..... 16

Ergebnisse ..... 17

Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse ..... 17

Interpretation der Ergebnisse ..... 18

Verfahrenseinschränkungen ..... 18

Nichtklinische Leistungsmerkmale ..... 19

Wichtigste Leistungsmerkmale ..... 19

Nachweisgrenze (LoD) ..... 19

Linearer Bereich ..... 21

Laborinterne Präzision ..... 23

Bestimmung und Verifizierung des Genotyps ..... 26
Spezifität ..... 29
Analytische Spezifität ..... 29
Analytische Spezifität – Störsubstanzen ..... 29
Korrelation der Methode ..... 31
Äquivalenzerhebung: EDTA-Plasma gegen Serum ..... 32
Gesamtsystemausfall ..... 32
Kreuzkontamination ..... 33
Weitere Informationen ..... 33
Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests ..... 33
Herstellung und Vertrieb ..... 35
Marken und Patente ..... 35
Copyright ..... 35
Literatur ..... 36
Dokumentversion ..... 38

# Verwendungszweck

Der cobas® HBV-Test ist ein *in-vitro*-Nukleinsäure-Amplifikationstest zur quantitativen Bestimmung von Hepatitis-B-Virus (HBV)-DNA in EDTA-Humanplasma oder Humanserum von HBV-infizierten Personen.

Dieser Test ist als Hilfsmittel bei der Behandlung von Patienten mit chronischer HBV-Infektion vorgesehen, bei denen eine antivirale Therapie angewendet wird. Mit diesem Test werden HBV-DNA-Konzentrationen vor und während der Behandlung gemessen, anhand derer die Therapieantwort beurteilt werden kann. Die Ergebnisse des cobas® HBV-Tests müssen im Kontext aller relevanten klinischen Befunde und Laborwerte interpretiert werden.

# Zusammenfassung und Erklärung des Tests

## Hintergrund

HBV ist eines von mehreren Viren, die bekanntermaßen virale Hepatitis verursachen. Weltweit sind über 2 Milliarden Menschen mit HBV in Kontakt gekommen und bei über 350 Millionen handelt es sich um chronisch infizierte Träger.[1] In den USA ist HBV trotz einer abnehmenden Inzidenz akuter Infektionen infolge von Impfungen und allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen beim Gebrauch von Nadeln eine der häufigsten Ursachen für Lebererkrankungen.[2] Die Gesamtprävalenz von HBV-Infektionen liegt in den USA zwischen 0,3 % und 0,5 %, wobei 47 % bis 70 % der Fälle auf Menschen zurückgehen, die außerhalb der USA geboren wurden.[2] In zielgerichteten Screening-Programmen wurden jedoch in bestimmten Hochrisikogruppen von Immigranten Prävalenzraten von über 15 % nachgewiesen.[3] Bei Patienten mit chronischer HBV-Infektion besteht ein hohes Risiko von Langzeitkomplikationen, wie z. B. chronische Hepatitis, Zirrhose und Leberzellkarzinom.[4-7] Als diagnostische und/oder prognostische Indikatoren einer akuten oder chronischen HBV-Infektion werden häufig serologische Marker verwendet.[8] Die US-amerikanischen Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention (CDC) haben ihre Empfehlungen für das Routine-Screening von Hochrisikopersonen auf Populationen erweitert, bei denen die Prävalenz des HBV-Oberflächenantigens (HBsAg) über 2 % beträgt. Dazu gehören Menschen aus endemischen Regionen der Welt (wie z. B. Asien und Afrika), homosexuelle Männer und Konsumenten von injizierbaren Drogen.[2]

Der am häufigsten eingesetzte Marker einer HBV-Infektion ist die Anwesenheit von HBsAg.[8] Obgleich manche Träger HBsAg eliminieren und Antikörper gegen HBsAg entwickeln, scheint dennoch ein Risiko für die Spätentwicklung ernsthafter Leberschäden vorzuliegen.[9,10] Als sekundärer Marker für eine mit aktiver HBV-Replikation einhergehende, fortschreitende Lebererkrankung wird im Allgemeinen das HBe-Antigen (HBeAg) herangezogen. Wenn das HBeAg nicht eliminiert wird, erhöht sich anscheinend das Risiko einer terminalen Leberinsuffizienz.[9,10] Variante Stämme von HBV-Pre-Core-Mutanten können selbst beim Vorliegen einer aktiven Infektion ihre Fähigkeit verlieren, HBeAg zu bilden, weshalb dieser Marker zur Überwachung des Krankheitsverlaufs nur bedingt einsetzbar ist.[7]

## Nutzen von HBV-Tests

Die HBV-DNA im EDTA-Plasma und Serum lässt sich mit Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren wie z. B. der PCR quantitativ bestimmen.[11-14] Verschiedene bedeutende Leitlinien empfehlen für die quantitative Bestimmung von HBV-DNA den Einsatz der Echtzeit-PCR, insbesondere wegen der höheren Sensitivität und des breiteren linearen Bereichs.[15,16]

## Erklärung des Tests

Der cobas® HBV-Test ist ein quantitativer Test zur Verwendung auf dem cobas® 6800 System und dem cobas® 8800 System. Der cobas® HBV-Test ermöglicht den Nachweis und die quantitative Bestimmung von HBV-DNA in EDTA-Plasma oder Serum von infizierten Patienten und ist für die Anwendung in Labors zur Unterstützung klinischer Studien und in der klinischen Routinepraxis zur Versorgung von HBV-Patienten geeignet. Anhand einer einzelnen Sonde werden die Genotypen A bis H nachgewiesen und quantifiziert, nicht jedoch differenziert. Zur quantitativen Bestimmung der Viruslast dient ein nicht aus HBV stammender DNA-Quantifizierungsstandard (DNA-QS), der bei der Probenvorbereitung zugegeben wird. Der DNA-QS dient zudem zur Überwachung des gesamten Prozesses der Probenvorbereitung und PCR-Amplifikation. Zusätzlich kommen bei dem Test drei externe Kontrollen zum Einsatz: eine Positivkontrolle mit hohem Titer, eine Positivkontrolle mit niedrigem Titer und eine Negativkontrolle.

## Testprinzipien

Der cobas® HBV-Test beruht auf einer vollautomatisierten Probenvorbereitung (Extraktion und Aufreinigung der Nukleinsäuren) gefolgt von PCR-Amplifikation und Detektion. Die cobas® 6800/8800 Systems bestehen aus einem Probenzufuhrmodul, einem Transfermodul, einem Aufarbeitungsmodul und einem Analysenmodul. Die automatisierte Datenverwaltung erfolgt über die cobas® 6800/8800 Software, die die Ergebnisse aller Tests als 'nicht nachgewiesen', 'unter unterer Quantifizierungsgrenze', 'über oberer Quantifizierungsgrenze' oder 'HBV-DNA nachgewiesen' einstuft. Im letzteren Fall liegt das Ergebnis im linearen Bereich von 'untere Quantifizierungsgrenze <*x*< obere Quantifizierungsgrenze'. Die Ergebnisse können direkt am Bildschirm des Systems eingesehen, exportiert und als Bericht gedruckt werden.

In der Patientenprobe enthaltene Nukleinsäure, externe Kontrollen und hinzugegebene Lambda-DNA (DNA-QS) werden gleichzeitig extrahiert.

Die virale Nukleinsäure wird durch Zugabe von Proteinase und Lysereagenz zur Probe freigesetzt. Die freigesetzte Nukleinsäure bindet an die Siliziumdioxid-Oberfläche der hinzugefügten magnetischen Glaspartikel. Nicht gebundene Substanzen und Verunreinigungen, beispielsweise denaturiertes Protein, Zelltrümmer und potenzielle PCR-Inhibitoren werden durch anschließende Waschreagenzschritte entfernt. Die aufgereinigte Nukleinsäure wird danach mit einem Elutionspuffer bei erhöhter Temperatur von den Glaspartikeln gelöst.

Zur selektiven Amplifikation der Zielnukleinsäure aus der Probe werden virusspezifische Forward- und Reverse-Primer eingesetzt, die aus hochkonservierten Regionen des HBV-Genoms ausgewählt wurden. Zur selektiven Amplifikation des DNA-QS werden speziell ausgewählte, sequenzspezifische Forward- und Reverse-Primer eingesetzt, die keine Homologie mit dem HBV-Genom aufweisen. Für die Amplifikation wird eine thermostabiles DNA-Polymeraseenzym eingesetzt. Der Master-Mix enthält anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) Desoxyuridintriphosphat (dUTP), das in die neu synthetisierte DNA (Amplifikat) eingebaut wird.[14,17,18] Etwaige Verunreinigungen durch Amplifikat aus vorherigen PCR-Läufen werden im ersten thermozyklischen Schritt durch das im PCR-Gemisch enthaltene Enzym AmpErase eliminiert. Neu gebildete Amplifikate dagegen werden nicht eliminiert, da das AmpErase-Enzym durch Temperaturen über 55 °C inaktiviert wird.

Der cobas® HBV-Master-Mix enthält Detektionssonden, die jeweils für die HBV-Zielsequenzen und die QS-Nukleinsäure spezifisch sind. Die spezifischen HBV- und DNA-QS-Detektionssonden sind alle mit einem von zwei fluoreszierenden Reporterfarbstoffen markiert. Zudem ist jede Sonde mit einem zweiten Farbstoff versehen, der als Quencher dient. Da die zwei spezifischen Reporterfarbstoffe bei definierten Wellenlängen gemessen werden, ist die gleichzeitige Detektion und Unterscheidung der amplifizierten HBV-Zielsequenz sowie des DNA-QS möglich.[12,13] Das Fluoreszenzsignal der intakten, nicht an die Zielsequenz gebundenen Sonde wird durch einen Quencher-Farbstoff unterdrückt. Während des PCR-Amplifikationsschritts werden die Sonden an die betreffenden einsträngigen DNA-Templates hybridisiert, was zur Spaltung der Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase führt. Dadurch kommt es zur Abtrennung des Reporter- und Quencher-Farbstoffs, und es entsteht ein Fluoreszenzsignal. Mit jedem PCR-Zyklus werden zunehmende Mengen gespaltener Sonden erzeugt, und das kumulative Signal des Reporterfarbstoffs steigt entsprechend an. Da die zwei spezifischen Reporterfarbstoffe bei definierten Wellenlängen gemessen werden, ist die gleichzeitige Detektion und Unterscheidung der amplifizierten HBV-Zielsequenz sowie des DNA-QS möglich.

# Reagenzien und Materialien

## cobas® HBV-Reagenzien und Kontrollen

Sämtliche ungeöffneten Reagenzien und Kontrollen sollten wie in Tabelle 1 bis Tabelle 4 empfohlen gelagert werden.

Tabelle 1 cobas® HBV

cobas® HBV
Bei 2–8 °C lagern.
Kassette mit 96 Tests (P/N 07000979190)

| Kitkomponenten | Reagenzienbestandteile | Menge je Kit 96 Tests |
|---|---|---|
| Proteinase-Lösung (PASE) | Tris-Puffer, < 0,05 % EDTA, Calciumchlorid, Calciumacetat, 8 % Proteinase<br>EUH210: Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.<br>EUH208: Kann allergische Reaktionen hervorrufen.<br>Enthält: Subtilisin, 9014-01-1 | 13 ml |
| DNA-Quantifizierungs-standard (DNA-QS) | Tris-Puffer, < 0,05 % EDTA, < 0,001 % Nicht-HBV-DNA-Konstrukt mit einer Nicht-HBV-Primer- und einer eindeutigen Sonden-Bindungsregion (nicht-infektiöse DNA), 0,002 % Poly-rA-RNA (synthetisch), < 0,1 % Natriumazid | 13 ml |
| Elutionspuffer (EB) | Tris-Puffer, 0,2 % Methyl-4-Hydroxybenzoat | 13 ml |
| Master-Mix-Reagenz 1 (MMX-R1) | Manganacetat, Kaliumhydroxid, < 0,1 % Natriumazid | 5,5 ml |
| HBV-Master-Mix-Reagenz 2 (HBV MMX-R2) | Tricin-Puffer, Kaliumacetat, 18 % Dimethylsulfoxid, Glycerin, < 0,1 %Tween 20, EDTA, < 0,12 % dATP, dCTP, dGTP, dUTP, < 0,01 % Upstream- und Downstream-HBV-Primer, < 0,01 % Quantifizierungsstandard-Forward- und -Reverse-Primer, < 0,01 % fluoreszenzmarkierte, für HBV bzw. den HBV-Quantifizierungsstandard spezifische Oligonukleotid-sonden, < 0,01 % Oligonukleotid-Aptamer, < 0,01 % Z05D-DNA-Polymerase, < 0,10% AmpErase-Enzym (Uracil-N-Glykosylase, mikrobiell), < 0,1 % Natriumazid | 6 ml |

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

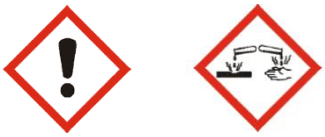
| cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit<br>Bei 2–8 °C lagern.<br>(P/N: 06997767190) | | | |
|---|---|---|---|
| Kitkomponenten | Reagenzienbestandteile | Menge je Kit | Sicherheitssymbole und -hinweise |
| Schwach positive HBV/HCV/HIV-1-Kontrolle (HBV/HCV/HIV-1 L(+)C) | < 0,001% in Bakteriophagen-Hüllprotein MS2 verkapselte Armored-RNA der HIV-1 Gruppe M, < 0,001 % in Lambda-Bakteriophagen-Hüllprotein verkapselte synthetische (Plasmid-)HBV-DNA, < 0,001 % in MS2-Bakteriophagen-Hüllprotein verkapselte synthetische (Armored) HCV-RNA, Humanplasma, das in zugelassenen Tests nicht reaktiv auf HCV-Antikörper, HIV-1/2-Antikörper, HBsAg oder HBc-Antikörper war und in dem mittels PCR-Methoden keine HIV-1-RNA, HIV-2-RNA, HCV-RNA, HBV-DNA, HEV-RNA, WNV-RNA und CMV-DNA nachgewiesen werden konnte.<br>0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel | 5,2 ml (8 x 0,65 ml) | <br>Achtung<br>H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.<br>P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/ Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.<br>P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.<br>P280: Schutzhandschuhe tragen.<br>P302 + P352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.<br>P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.<br>P363: Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen. |
| Hoch positive HBV/HCV/HIV-1-Kontrolle (HBV/HCV/HIV-1 H(+)C) | < 0,001 % in Bakteriophagen-Hüllprotein MS2 verkapselte synthetische (Armored) RNA der HIV-1-Gruppe M mit hohem Titer, < 0,001 % in Lambda-Bakteriophagen-Hüllprotein verkapselte synthetische (Plasmid-)HBV-DNA, < 0,001 % in MS2-Bakteriophagen-Hüllprotein verkapselte synthetische (Armored) HCV-RNA; Humanplasma, das in zugelassenen Tests nicht reaktiv auf HCV-Antikörper, HIV-1/2-Antikörper, HBsAg oder HBc-Antikörper war und in dem mittels PCR-Methoden keine HIV-1-RNA, HIV-2-RNA, HCV-RNA, HBV-DNA, HEV-RNA, WNV-RNA und CMV-DNA nachgewiesen werden konnte.<br>0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel | 5,2 ml (8 x 0,65 ml) | <br>Achtung<br>H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.<br>P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/ Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.<br>P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.<br>P280: Schutzhandschuhe tragen.<br>P302 + P352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.<br>P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.<br>P363: Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen. |

Tabelle 3 cobas® NHP Negative Control Kit

| cobas® NHP Negative Control Kit<br>Bei 2–8 °C lagern.<br>(P/N 07002220190) | | | |
|---|---|---|---|
| **Kitkomponenten** | **Reagenzienbestandteile** | **Menge je Kit** | **Sicherheitssymbole und -hinweise** |
| Normal-Humanplasma-Negativkontrolle (NHP-NC) | Humanplasma, das in zugelassenen Tests nicht reaktiv auf HCV-Antikörper, HIV-1/2-Antikörper, HBsAg und HBc-Antikörper war und in dem mittels PCR-Methoden keine HIV-1-RNA, HIV-2-RNA, HCV-RNA, HBV-DNA, HEV-RNA, WNV-RNA und CMV-DNA nachgewiesen werden konnte.<br>< 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel | 16 ml<br>(16 x 1 ml) | <br>Achtung<br>H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.<br>P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/ Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.<br>P272: Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.<br>P280: Schutzhandschuhe tragen.<br>P302 + P352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.<br>P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.<br>P363: Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen. |

# cobas omni-Reagenzien für die Probenvorbereitung

Tabelle 4 cobas omni Reagenzien für die Probenvorbereitung*

| Reagenzien | Reagenzienbestandteile | Menge je Kit | Sicherheitssymbole und -hinweise |
|---|---|---|---|
| cobas omni MGP Reagent (MGP)<br>Bei 2–8 °C lagern.<br>(P/N: 06997546190) | Magnetische Glaspartikel, Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4 Hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid | 480 Tests | keine Entsprechung |
| cobas omni Specimen Diluent (SPEC DIL)<br>Bei 2–8 °C lagern.<br>(P/N: 06997511190) | Tris-Puffer, 0,1 % Methyl-4 Hydroxybenzoat, < 0,1 % Natriumazid | 4 x 875 ml | keine Entsprechung |
| cobas omni Lysis Reagent (LYS)<br>Bei 2–8 °C lagern.<br>(P/N: 06997538190) | 42,56 % (Gew.-%) Guanidinthiocyanat, 5 % (Massenvol.-%) Polydocanol, 2 % (Massenvol.-%) Dithiothreitol, Dihydro-Natriumcitrat | 4 x 875 ml |  <br>Gefahr<br>H302: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.<br>H318: Verursacht schwere Augenschäden.<br>H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.<br>EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.<br>P301 + P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.<br>P264: Nach Gebrauch Haut gründlich waschen.<br>P270: Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.<br>P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.<br>P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/ Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.<br>P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.<br>P310: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.<br>P330: Mund ausspülen. |
| cobas omni Wash Reagent (WASH)<br>Bei 15-30°C lagern.<br>(P/N: 06997503190) | Natriumcitratdihydrat, 0,1 % Methyl-4-Hydroxybenzoat | 4,2 l | keine Entsprechung |

* Diese Reagenzien sind nicht Bestandteil des cobas® HBV-Testkits. Siehe Liste der zusätzlich benötigten Materialien (Tabelle 7).

## Lagerung und Handhabung der Reagenzien

Reagenzien müssen wie in Tabelle 5 und Tabelle 6 angegeben gelagert und gehandhabt werden.

Reagenzien außerhalb der cobas® 6800/8800 Systems bei der in Tabelle 5 angegebenen Temperatur lagern.

Tabelle 5 Reagenzienlagerung (wenn sich das Reagenz nicht im System befindet)

| Reagenz | Lagertemperatur |
|---|---|
| cobas® HBV | 2–8 °C |
| cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit | 2–8 °C |
| cobas® NHP Negative Control Kit | 2–8 °C |
| cobas omni Lysis Reagent | 2–8 °C |
| cobas omni MGP Reagent | 2–8 °C |
| cobas omni Specimen Diluent | 2–8 °C |
| cobas omni Wash Reagent | 15–30 °C |

Reagenzien in den cobas® 6800/8800 Systems werden bei angemessenen Temperaturen aufbewahrt und ihr Verfallsdatum wird vom System überwacht. Die cobas® 6800/8800 Systems lassen die Verwendung der Reagenzien nur zu, wenn alle in Tabelle 6 angegebenen Bedingungen erfüllt sind. Das System verhindert automatisch die Verwendung von abgelaufenen Reagenzien. In Tabelle 6 sind die Bedingungen für die Reagenzhandhabung aufgeführt, die von den cobas® 6800/8800 Systems geprüft werden.

Tabelle 6 Stabilitätsbedingungen für Reagenzien, die von den cobas® 6800/8800 Systems geprüft werden

| Reagenz | Verfallsdatum des Kits | Kithaltbarkeit nach dem Öffnen | Anzahl der Läufe, für die dieses Kit verwendet werden kann | Haltbarkeit im Gerät (kumulative Zeit im Gerät außerhalb der Kühlung) |
|---|---|---|---|---|
| cobas® HBV | Datum nicht überschritten | 30 Tage ab erstem Gebrauch | Max. 10 Läufe | Max. 8 Stunden |
| cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit | Datum nicht überschritten | keine Entsprechung | keine Entsprechung | Max. 8 Stunden |
| cobas® NHP Negative Control Kit | Datum nicht überschritten | keine Entsprechung | keine Entsprechung | Max. 10 Stunden |
| cobas omni Lysis Reagent | Datum nicht überschritten | 30 Tage ab dem Laden* | keine Entsprechung | keine Entsprechung |
| cobas omni MGP Reagent | Datum nicht überschritten | 30 Tage ab dem Laden* | keine Entsprechung | keine Entsprechung |
| cobas omni Specimen Diluent | Datum nicht überschritten | 30 Tage ab dem Laden* | keine Entsprechung | keine Entsprechung |
| cobas omni Wash Reagent | Datum nicht überschritten | 30 Tage ab dem Laden* | keine Entsprechung | keine Entsprechung |

* Zeit ab dem ersten Zeitpunkt, zu dem das Reagenz in die cobas® 6800/8800 Systems geladen wird

## Zusätzlich benötigte Materialien

Tabelle 7 Materialien und Verbrauchsmaterialien zur Verwendung auf den 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 |
| Beutel für Festabfälle | 07435967001 |
| Festabfallbehälter | 07094361001 |

## Benötigte Geräte und Software

Die cobas® 6800/8800 Software und das cobas® HBV-Analysenpaket müssen auf dem Instrument (bzw. den Instrumenten) installiert werden. Der IG-Server (Instrument Gateway) ist Bestandteil des Systems.

Tabelle 8 Geräte

| Gerät | P/N |
|---|---|
| cobas® 6800 System (mit beweglicher Plattform) | 05524245001 und 06379672001 |
| cobas® 6800 System (feststehend) | 05524245001 und 06379664001 |
| cobas® 8800 System | 05412722001 |
| Probenzufuhrmodul | 06301037001 |

Weitere Informationen zu Primär- und Sekundärröhrchen, die auf den Systemen verwendet werden können, enthält das Benutzerhandbuch des cobas® 6800/8800 Systems.

Hinweis: Eine ausführliche Bestellliste für Probenracks, Racks für verstopfte Spitzen und Racktrays, die auf den Geräten verwendet werden können, ist bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.

# Vorsichtsmaßnahmen und ordnungsgemäße Handhabung

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Wie bei allen Testverfahren ist gute Laborpraxis eine unerlässliche Voraussetzung für die ordnungsgemäße Durchführung dieses Tests. Aufgrund der hohen Sensitivität dieses Tests ist besonders darauf zu achten, dass die Reagenzien und Amplifikationsgemische nicht kontaminiert werden.

- Nur zur Verwendung als *in-vitro*-Diagnostikum bestimmt.
- Der cobas® HBV-Test wurde nicht als HBV-Screeningtest für Blut oder Blutprodukte oder als diagnostischer Test zur Bestätigung einer HBV-Infektion evaluiert.
- Alle Patientenproben sind als potenziell infektiös und gemäß den Vorschriften für sicheres Arbeiten im Labor wie in „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ und dem CLSI-Dokument M29-A4 beschrieben zu behandeln.[19,20] Dieses Verfahren darf nur von Personal angewandt werden, das mit dem cobas® HBV-Test und den cobas® 6800/8800 Systems vertraut und in der Handhabung infektiöser Materialien geschult ist.
- Alle aus Menschen gewonnenen Materialien sind als potenziell infektiös zu betrachten und müssen unter Anwendung genereller Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden. Wenn Material verschüttet wurde, betroffenes Areal unverzüglich mit einer frisch zubereiteten Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser (Haushaltsbleiche im Verhältnis 1:10 verdünnen) desinfizieren oder die jeweiligen Laborverfahren beachten.
- Das cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit und das cobas® NHP Negative Control Kit enthalten aus Humanblut gewonnenes Plasma. Das Ausgangsmaterial wurde mit zugelassenen Antikörpertests geprüft und erwies sich als nicht-reaktiv auf HCV-Antikörper, HIV-1/2-Antikörper, HBsAg und HBc-Antikörper. Bei der Untersuchung dieses normalen Humanplasmas konnte mit PCR-Methoden keine HIV-1-RNA (Gruppen M und O), HIV-2-RNA, HCV-RNA, HBV-DNA, HEV-RNA, WNV-RNA oder CMV-DNA nachgewiesen werden. Mit keiner der bekannten Testmethoden kann jedoch eine Übertragung von Infektionserregern durch humane Blutprodukte ausgeschlossen werden.
- Vollblut und andere Proben in Primärröhrchen nicht einfrieren.
- Nur die mitgelieferten oder angegebenen erforderlichen Verbrauchsmaterialien verwenden, um eine optimale Leistung des Tests zu gewährleisten.
- Sicherheitsdatenblätter (Safety Data Sheets, SDS) sind auf Anfrage bei der zuständigen Roche-Vertretung erhältlich.
- Alle Verfahren und Vorschriften sind sorgfältig einzuhalten, um eine korrekte Durchführung des Tests sicherzustellen. Jede Abweichung von den Verfahren und Vorschriften kann sich auf die optimale Leistung des Tests auswirken.
- Wird während der Handhabung und Bearbeitung der Proben nicht ordnungsgemäß auf eine Vermeidung von Verschleppung geachtet, kann es zu falsch-positiven Ergebnissen kommen.

## Umgang mit Reagenzien

- Alle Reagenzien, Kontrollen und Proben sind gemäß der guten Laborpraxis zu handhaben, um eine Verschleppung der Proben und Kontrollen zu vermeiden.
- Vor der Verwendung alle Reagenzkassetten, Diluenten, Lysereagenzien und Waschreagenzien mittels Sichtprüfung auf auslaufende Flüssigkeit überprüfen. Liegen Anzeichen für undichte Stellen vor, das betreffende Material nicht für den Test verwenden.
- cobas omni Lysis Reagent enthält die potenziell gefährliche Chemikalie Guanidinthiocyanat. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit Reagenzien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen, um Verätzungen zu vermeiden.
- Das cobas® HBV-Testkit, cobas omni MGP Reagent und cobas omni Specimen Diluent enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Haut, Augen und Schleimhäute vor Kontakt mit Reagenzien schützen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen, um Verätzungen zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien vor dem Aufwischen zunächst mit Wasser verdünnen.
- cobas omni Lysis Reagent enthält Guanidinthiocyanat und darf nicht in Kontakt mit Natriumhypochloritlösung (Haushaltsbleiche) gebracht werden. Dieses Gemisch kann ein hochgiftiges Gas erzeugen.
- Sämtliche Materialien, die mit Proben und Reagenzien in Berührung gekommen sind, gemäß den geltenden Vorschriften entsorgen.

## Gute Laborpraxis

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In den Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien Laborhandschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen. Um Kontamination zu vermeiden, müssen die Handschuhe zwischen der Handhabung von Proben und cobas® HBV-Kits sowie cobas omni Reagenzien jeweils gewechselt werden. Darauf achten, dass die Handschuhe beim Umgang mit den Proben und Kontrollen nicht kontaminiert werden.
- Nach Gebrauch der Proben und Kitreagenzien sowie nach dem Ausziehen der Handschuhe gründlich die Hände waschen.
- Alle Arbeitsflächen im Labor gründlich mit einer frisch hergestellten Lösung aus 0,5%igem Natriumhypochlorit in destilliertem oder entionisiertem Wasser reinigen und desinfizieren (Haushaltsbleiche im Verhältnis 1:10 verdünnen). Anschließend die Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol abreiben.
- Wenn Flüssigkeiten auf den cobas® 6800/8800 Systems verschüttet wurden, die Oberflächen gemäß den Anweisungen im Benutzerhandbuch der cobas® 6800/8800 Systems reinigen und dekontaminieren.

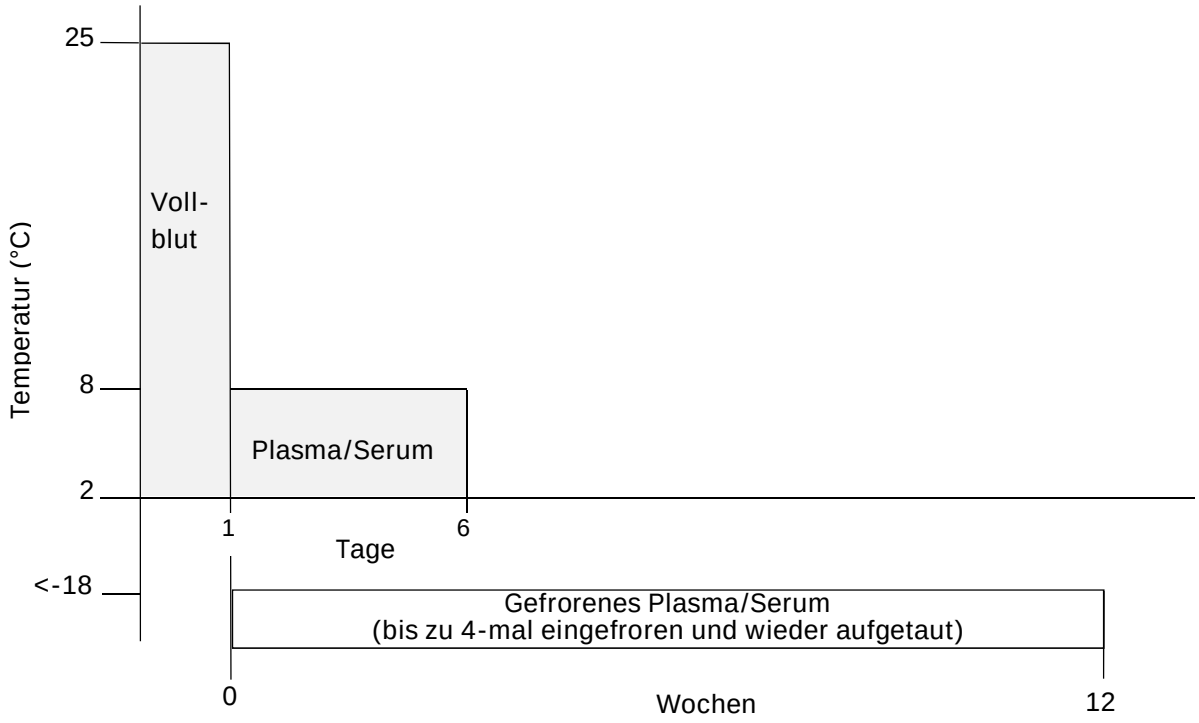
# Entnahme, Transport und Lagerung von Proben

Hinweis: Alle Proben und Kontrollen wie potenzielle Überträger von Infektionserregern behandeln.
Alle Proben bei den angegebenen Temperaturen lagern.
Erhöhte Umgebungstemperaturen wirken sich auf die Probenstabilität aus.
Bei Verwendung gefrorener Proben in Sekundärröhrchen die Proben bei Zimmertemperatur (15–30 °C) vollständig auftauen lassen und anschließend zentrifugieren, um das gesamte Probenvolumen am Röhrchenboden zu sammeln.

# Proben

- Das Blut ist in SST™ Serumtrennröhrchen, BD Vacutainer® PPT™ Plasmavorbereitungsröhrchen für molekulare diagnostische Tests oder in sterilen Röhrchen mit EDTA als Antikoagulans zu sammeln. Die Anweisungen des Probenröhrchen-Herstellers beachten. Siehe Abbildung 1.
- Vollblut, das in SST™ Serumtrennröhrchen, BD Vacutainer® PPT™ Plasmavorbereitungsröhrchen für molekulare diagnostische Tests oder in sterilen Röhrchen mit EDTA als Antikoagulans gesammelt wurde, kann vor der Vorbereitung des Plasmas bzw. Serums bei 2 bis 25 °C maximal 24 Stunden lang gelagert und transportiert werden. Beim Zentrifugieren die Anweisungen des Geräteherstellers beachten.
- Nach der Abtrennung können Plasma-/Serumproben bei 2 bis 8 °C maximal 6 Tage oder bei ≤ –18 °C maximal 12 Wochen gelagert werden.
- Zur Langzeitlagerung bis zu 6 Monate werden Temperaturen von ≤ –60 °C empfohlen.
- Plasma- und Serumproben dürfen viermal bei ≤ –18 °C eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Abbildung 1 Lagerbedingungen für Proben




- Wenn Proben versandt werden sollen, sind sie gemäß den geltenden nationalen und internationalen Vorschriften für den Transport von Proben und Krankheitserregern zu verpacken und zu beschriften.

# Gebrauchsanleitung

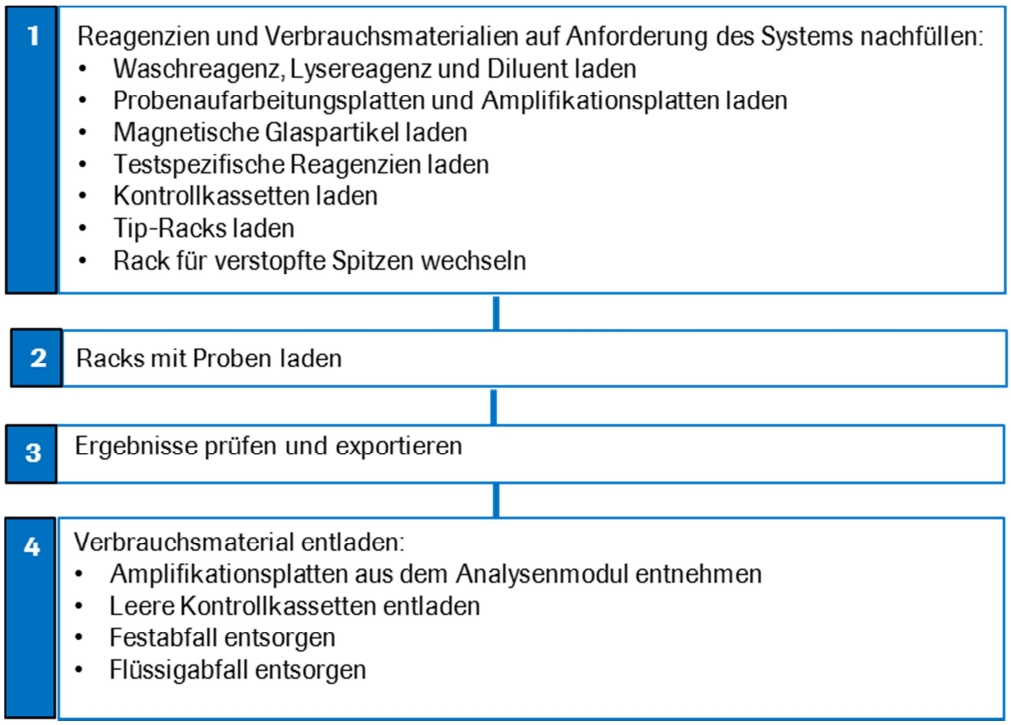
## Hinweise zum Verfahren

- Die cobas® HBV-Testreagenzien, das cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, das cobas® NHP Negative Control Kit und die cobas omni Reagenzien nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Verbrauchsmaterial nicht wiederverwenden. Es ist ausschließlich zum Einmalgebrauch vorgesehen.
- Informationen zur ordnungsgemäßen Wartung enthält das Benutzerhandbuch der cobas® 6800/8800 Systems.

## Durchführen des cobas® HBV-Tests

Zur Durchführung des cobas® HBV-Tests ist ein Probenvolumen von mindestens 350 µl (beim Workflow mit 200 µl Probe) bzw. 650 µl (beim Workflow mit 500 µl Probe) erforderlich. Der Testablauf ist im Benutzerhandbuch der cobas® 6800/8800 Systems ausführlich beschrieben. In Abbildung 2 ist der Ablauf zusammenfassend dargestellt.

Abbildung 2 cobas® HBV-Testablauf



# Ergebnisse

Die cobas® 6800/8800 Systems dienen zur automatischen Bestimmung der HBV-DNA-Konzentration in Proben und Kontrollen. Die HBV-DNA-Konzentration wird in internationalen Einheiten pro Milliliter (IE/ml) angegeben.

## Qualitätskontrolle und Gültigkeit der Ergebnisse

- Mit jedem Batch werden eine Negativkontrolle [(–) C], eine schwach positive Kontrolle [HBV L(+)C] und eine hoch positive Kontrolle [HBV H(+)C] mitgeführt.
- Die cobas® 6800/8800 Software und/oder den Bericht auf Flags und generierte Ergebnisse kontrollieren, um die Gültigkeit des Batch zu überprüfen.
- Der Batch ist gültig, wenn für keine der drei Kontrollen Flags ausgegeben wurden, d. h. weder für die Negativkontrolle noch für die beiden Positivkontrollen HBV L(+)C und HBV H(+)C. In der Ergebnisübersicht werden die Negativkontrolle als (–) C und die schwach und hoch positiven Kontrollen als HxV L(+)C bzw. HxV H(+)C dargestellt.

Die cobas® 6800/8800 Software markiert Ergebnisse bei fehlerhaften Negativ- und Positivkontrollen automatisch als ungültig.

### Kontroll-Flags

Tabelle 9 Kontroll-Flags für Negativ- und Positivkontrollen

| Negativkontrolle | Flag | Ergebnis | Interpretation |
|---|---|---|---|
| (–) C | Q02<br>(Kontrollbatch fehlerhaft) | Invalid | Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titer für die Negativkontrolle ist nicht negativ. |
| **Positivkontrolle** | **Flag** | **Ergebnis** | **Interpretation** |
| HxV L(+)C | Q02<br>(Kontrollbatch fehlerhaft) | Invalid | Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titerwert für die schwach positive Kontrolle liegt nicht im Sollbereich. |
| HxV H(+)C | Q02<br>(Kontrollbatch fehlerhaft) | Invalid | Ungültiges Ergebnis oder der errechnete Titerwert für die hoch positive Kontrolle liegt nicht im Sollbereich. |

Wenn der Batch ungültig ist, muss der Test des gesamten Batch einschließlich der Proben und Kontrollen wiederholt werden.

In der cobas® 6800/8800 Software steht HxV L(+)C für die cobas® HBV/HCV/HIV-1 schwach positive Kontrolle und HxV H(+)C für die cobas® HBV/HCV/HIV-1 hoch positive Kontrolle.

## Interpretation der Ergebnisse

Bei gültigen Batches die einzelnen Proben in der cobas® 6800/8800 Software und/oder im Bericht auf Flags kontrollieren. Die Ergebnisse sind wie folgt zu interpretieren:

- Ein gültiger Batch kann sowohl gültige als auch ungültige Probenergebnisse enthalten.

Tabelle 10 Interpretation der Ergebnisse für die einzelnen Zielsequenzen

| Ergebnisse | Interpretation |
|---|---|
| Target Not Detected | HBV-DNA nicht nachgewiesen.<br>Ergebnisse als „HBV nicht nachgewiesen“ angeben. |
| < Titer Min | Der errechnete Titer liegt unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze des Tests.<br>Ergebnisse als „HBV nachgewiesen, unter (Titer min)“ angeben.<br>Titer min = 10 IE/ml (500 µl)<br>Titer min = 25 IE/ml (200 µl) |
| Titer | Der errechnete Titer liegt innerhalb des linearen Bereichs des Tests, d. h. er ist größer oder gleich Titer min und kleiner oder gleich Titer max.<br>Ergebnisse als „(Titer) von HBV nachgewiesen“ angeben. |
| > Titer Max[a] | Der errechnete Titer liegt über der oberen Quantifizierungsgrenze des Tests.<br>Ergebnisse als „HBV nachgewiesen, über (Titer max)“ angeben.<br>Titer max = 1,00E+09 IE/ml (500 µl und 200 µl) |

[a] Das Probenergebnis „> Titer max“ bezieht sich auf HBV-positive Proben, bei denen HBV mit einem Titer über der oberen Quantifizierungsgrenze nachgewiesen wurde. Wenn quantitative Ergebnisse gewünscht werden, die ursprüngliche Probe je nach Probenart mit HBV-negativem EDTA-Plasma oder Serum verdünnen und den Test wiederholen. Das dabei ermittelte Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

## Verfahrenseinschränkungen

- Der cobas® HBV-Test ist ausschließlich für den Gebrauch mit dem cobas® HBV/HCV/HIV-1 Control Kit, cobas® NHP Negative Control Kit, cobas omni MGP Reagent, cobas omni Lysis Reagent, cobas omni Specimen Diluent und cobas omni Wash Reagent auf cobas® 6800/8800 Systems validiert.
- Zuverlässige Ergebnisse sind nur bei Anwendung sachgemäßer Verfahren für Gewinnung, Lagerung und Bearbeitung der Proben gewährleistet.
- Dieser Test wurde ausschließlich für die Verwendung mit EDTA-Plasma und Serum validiert. Wenn andere Arten von Proben getestet werden, können falsche Ergebnisse erzielt werden.
- Die HBV-DNA-Quantifizierung hängt von der Anzahl der in der Probe enthaltenen Viruspartikel ab und kann durch das Probenentnahmeverfahren, patientenbezogene Faktoren (d. h. Alter, Vorhandensein von Symptomen) und/oder das Infektionsstadium beeinflusst werden.
- Mutationen in den hochkonservierten Regionen des viralen Genoms, das durch den cobas® HBV-Test abgedeckt wird, treten zwar selten auf, können jedoch die Primer- und/oder Sondenbindung beeinträchtigen und dadurch zur Unterquantifizierung oder Nichterkennung des Virus führen.
- Bevor Benutzer zwischen verschiedenen Verfahren wechseln, sollten sie aufgrund der inhärenten Unterschiede zwischen den Verfahren in ihrem Labor Studien zur Korrelation der Methoden durchführen, um die Unterschiede der Verfahren zu ermitteln. Außerdem sollten Benutzer stets die eigenen spezifischen Strategien und Verfahren beachten.
- Der cobas® HBV-Test ist nicht als HBV-Screeningtest für Blut oder Blutprodukte oder als diagnostischer Test zur Bestätigung einer HBV-Infektion vorgesehen.

# Nichtklinische Leistungsmerkmale

## Wichtigste Leistungsmerkmale

## Nachweisgrenze (LoD)

### Internationaler WHO-Standard

Die Nachweisgrenze des cobas® HBV-Tests wurde durch Analyse von Reihenverdünnungen des internationalen WHO-Standards für HBV-DNA für auf Nukleinsäure-Amplifikationstechniken basierende Tests (2nd WHO International Standard) des Genotyps A (vom NIBSC bereitgestellt) in HBV-negativem humanem EDTA-Plasma und Serum mit Probenverarbeitungsvolumina von 500 µl und 200 µl bestimmt. Panels mit acht Konzentrationen plus Negativprobe für das Probenverarbeitungsvolumen von 500 µl und neun Konzentrationen für das Probenverarbeitungsvolumen von 200 µl wurden mit drei Chargen von cobas® HBV-Testreagenzien an mehreren Tagen mit mehreren Läufen, Bedienern und Instrumenten getestet.

Die Ergebnisse für EDTA-Plasma und Serum aus beiden Probenverarbeitungsvolumina sind in Tabelle 11 bis Tabelle 14 dargestellt. Für EDTA-Plasma ergaben die Messungen, dass der cobas® HBV-Test bei einem Probenverarbeitungsvolumen von 500 µl HBV-DNA in einer Konzentration von 3 IE/ml mit einer Trefferquote von ≥ 95 % und bei einem Probenverarbeitungsvolumen von 200 µl in einer Konzentration von 17,5 IE/ml mit einer Trefferquote von ≥ 95 % nachweisen kann. Für Serum ergaben die Messungen, dass der cobas® HBV-Test bei einem Probenverarbeitungsvolumen von 500 µl HBV-DNA in einer Konzentration von 3 IE/ml mit einer Trefferquote von ≥ 95 % und bei einem Probenverarbeitungsvolumen von 200 µl in einer Konzentration von 15 IE/ml mit einer Trefferquote von ≥ 95 %nachweisen kann.

Tabelle 11 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma (500 µl)

| Ausgangstiterkonzentration (HBV-DNA, IE/ml) | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % |
|---|---|---|---|
| 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 |
| Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote | 2,7 IE/ml<br>95-%-Konfidenzintervall: 2,4 – 3,1 IE/ml | | |

Tabelle 12 Nachweisgrenze in Serum (500 µl)

| Ausgangstiterkonzentration (HBV-DNA, IE/ml) | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % |
|---|---|---|---|
| 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 |
| Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote | 2,4 IE/ml<br>95-%-Konfidenzintervall: 2,0 – 2,7 IE/ml | | |

Tabelle 13 Nachweisgrenze in EDTA-Plasma (200 µl)

| Ausgangstiterkonzentration (HBV-DNA, IE/ml) | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % |
|---|---|---|---|
| 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 |
| Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote | 15,5 IE/ml<br>95-%-Konfidenzintervall: 14,4 – 16,9 IE/ml | | |

Tabelle 14 Nachweisgrenze in Serum (200 µl)

| Ausgangstiterkonzentration (HBV-DNA, IE/ml) | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % |
|---|---|---|---|
| 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 |
| Nachweisgrenze gemäß PROBIT bei 95 % Trefferquote | 12,5 IE/ml<br>95-%-Konfidenzintervall: 11,6 – 13,8 IE/ml | | |

## Linearer Bereich

Die Linearitätsstudie zum cobas® HBV-Test wurde mit einer Verdünnungsreihe durchgeführt, deren 15 Panel-Elemente den vorgesehenen linearen Bereich für den vorherrschenden Genotyp (GT A) abdecken. Panel-Elemente mit hohem Titer wurden aus einer HBV-DNA-Stammlösung mit hohem Titer hergestellt, während die Panel-Elemente mit niedrigem Titer aus einer klinischen Probe hergestellt wurden. Das Linearitäts-Panel war auf eine Titerüberlappung von ca. 2 $\log_{10}$ zwischen den beiden Materialquellen ausgelegt. Der erwartete lineare Bereich des cobas® HBV-Tests reicht von der unteren Quantifizierungsgrenze (10 IE/ml bei 500 µl Probenverarbeitungsvolumen und 25 IE/ml bei 200 µl Probenverarbeitungsvolumen) bis zur oberen Quantifizierungsgrenze (1,00E+09 IE/ml). Das Linearitäts-Panel war auf eine Spanne von 1 Konzentrationsstufe unter der unteren Quantifizierungsgrenze (z. B. 7,5 IE/ml) bis 1 Konzentrationsstufe über der oberen Quantifizierungsgrenze (z. B. 2,0E+09 IE/ml) und die Abdeckung medizinischer Entscheidungspunkte ausgelegt. Darüber hinaus war das Panel darauf ausgelegt, Schritte von 1,0 $\log_{10}$ über den gesamten linearen Bereich teilweise zu unterstützen. Für jedes Panel-Element wurde die Nennkonzentration in IE/ml sowie die Quelle der HBV-DNA angegeben.

Bei einem Verarbeitungsvolumen von 500 µl ist der cobas® HBV-Test für EDTA-Plasma und Serum im Bereich von 10 IE/ml bis 1,00E+09 IE/ml linear und zeigt eine absolute Abweichung von der nichtlinearen Regression von weniger als ± 0,2 $\log_{10}$. Im gesamten linearen Bereich liegt die Genauigkeit des Tests innerhalb von ± 0,24 $\log_{10}$.

Bei einem Verarbeitungsvolumen von 200 µl ist der cobas® HBV-Test für EDTA-Plasma und Serum im Bereich von 25 IE/ml bis 1,00E+09 IE/ml linear und zeigt eine absolute Abweichung von der nichtlinearen Regression von weniger als ± 0,2 $\log_{10}$. Im gesamten linearen Bereich liegt die Genauigkeit des Tests innerhalb von ± 0,24 $\log_{10}$.

Repräsentative Ergebnisse siehe Abbildung 3 bis Abbildung 6.

Abbildung 3 Bestimmung des linearen Bereichs in EDTA-Plasma (500 µl)

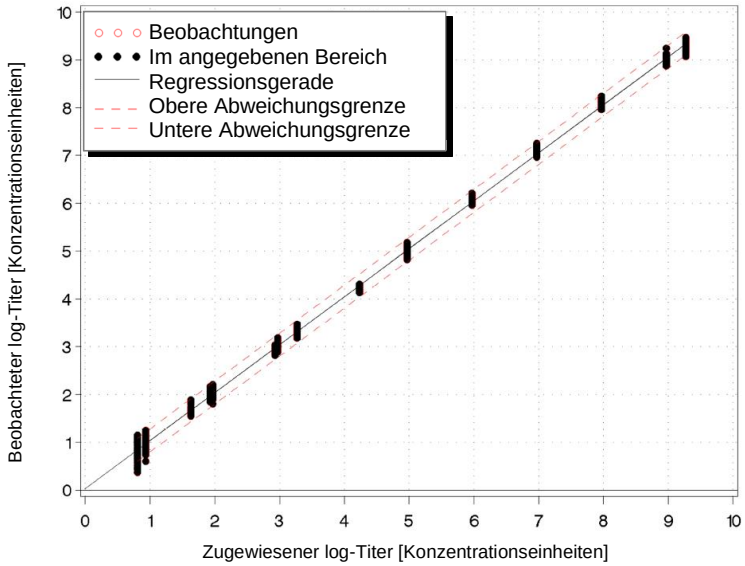



Abbildung 4 Bestimmung des linearen Bereichs in EDTA-Plasma (200 µl)

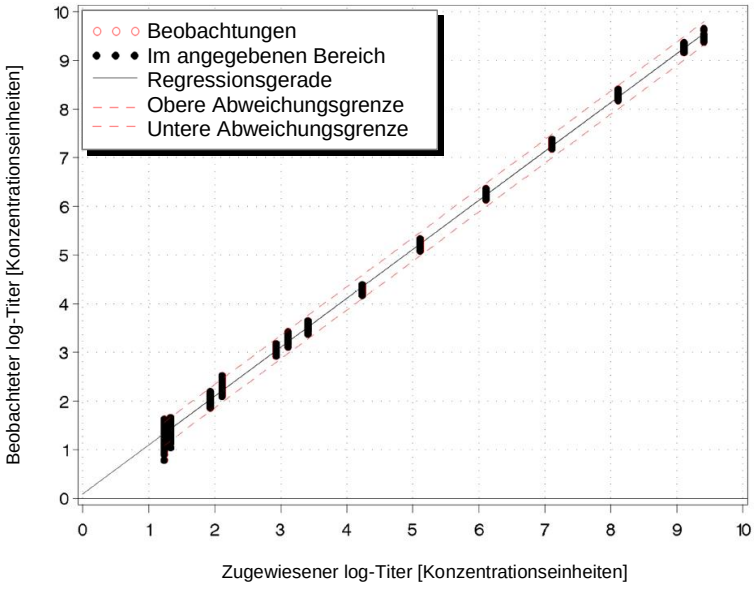


Abbildung 5 Bestimmung des linearen Bereichs in Serum (500 µl)

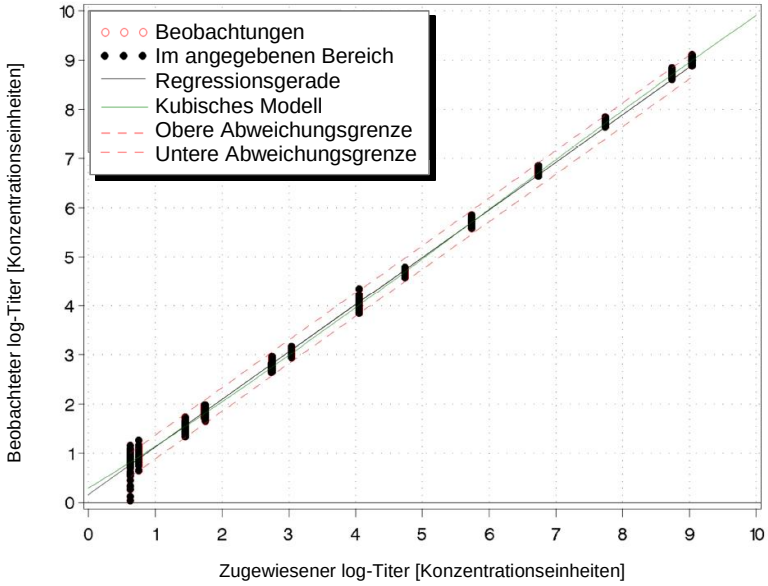
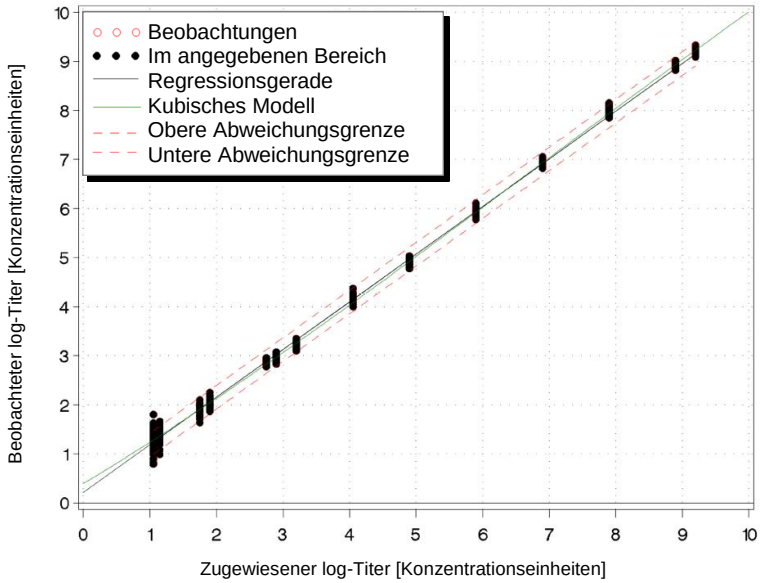



Abbildung 6 Bestimmung des linearen Bereichs in Serum (200 µl)




## Laborinterne Präzision

Zur Bestimmung der Präzision des cobas® HBV-Tests wurde eine Verdünnungsreihe von klinischen HBV-Proben (KP) des Genotyps A oder HBV-Plasmid-DNA in HBV-negativem EDTA-Plasma oder Serum analysiert. Dabei wurden an 12 Tagen unter Verwendung von drei Instrumenten und drei Bedienern 10 bis 12 Verdünnungsstufen mit 48 Replikaten für jede Verdünnung und jedes Verarbeitungsvolumen über drei Chargen von cobas® HBV-Testreagenzien getestet. Alle Proben durchliefen das gesamte cobas® HBV-Testverfahren auf vollautomatisierten cobas® 6800/8800 Systems. Die hier angegebene Präzision spiegelt daher alle Aspekte des Testverfahrens wider. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 bis Tabelle 18 zusammengefasst.

Der cobas® HBV-Test zeigte eine hohe Präzision für drei getestete Reagenzchargen über einen Konzentrationsbereich von 5,00E+01 IE/ml bis 1,0E+09 IE/ml bei einem Probenverarbeitungsvolumen von 500 µl und über einen Bereich von 1,00E+02 IE/ml bis 1,0E+08 IE/ml (EDTA-Plasma) und 1,0E+09 IE/ml (Serum) bei einem Probenverarbeitungsvolumen von 200 µl.

Tabelle 15 Laborinterne Präzision des cobas® HBV-Tests (EDTA-Plasmaproben – 500 µl Verarbeitungsvolumen)*

| Nennkonzentration (IE/ml) | Zugewiesene Konzentration (IE/ml) | Ausgangsmaterial | EDTA-Plasma | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Charge 1 | Charge 2 | Charge 3 | Alle Chargen |
| | | | SD | SD | SD | SD gepoolt |
| 1,00E+09 | 9,32E+08 | Plasmid-DNA | 0,04 | 0,07 | 0,09 | 0,07 |
| 1,00E+08 | 9,32E+07 | Plasmid-DNA | 0,04 | 0,08 | 0,05 | 0,06 |
| 1,00E+07 | 9,32E+06 | Plasmid-DNA | 0,06 | 0,05 | 0,04 | 0,05 |
| 1,00E+06 | 9,32E+05 | Plasmid-DNA | 0,06 | 0,07 | 0,04 | 0,06 |
| 1,00E+05 | 9,32E+04 | Plasmid-DNA | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,06 |
| 2,00E+04 | 1,71E+04 | Klinische Probe | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,04 |
| 2,00E+03 | 1,86E+03 | Plasmid-DNA | 0,05 | 0,04 | 0,07 | 0,05 |
| 1,00E+03 | 8,54E+02 | Klinische Probe | 0,04 | 0,05 | 0,04 | 0,04 |
| 1,00E+03 | 9,32E+02 | Plasmid-DNA | 0,06 | 0,06 | 0,05 | 0,06 |
| 1,00E+02 | 8,54E+01 | Klinische Probe | 0,07 | 0,08 | 0,07 | 0,07 |
| 1,00E+02 | 9,32E+01 | Plasmid-DNA | 0,10 | 0,08 | 0,09 | 0,09 |
| 5,00E+01 | 4,27E+01 | Klinische Probe | 0,09 | 0,04 | 0,08 | 0,08 |

* Titerdaten werden als log-normalverteilt betrachtet und nach der $\log_{10}$-Transformation analysiert. In den Spalten zur Standardabweichung (SD) sind die log-transformierten Gesamttiter für die drei Reagenzchargen angegeben.

Tabelle 16 Laborinterne Präzision des cobas® HBV-Tests (Serumproben – 500 µl Verarbeitungsvolumen)*

| Nennkonzentration (IE/ml) | Zugewiesene Konzentration (IE/ml) | Ausgangsmaterial | Serum | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Charge 1 | Charge 2 | Charge 3 | Alle Chargen |
| | | | SD | SD | SD | SD gepoolt |
| 1,00E+09 | 5,47E+08 | Plasmid-DNA | 0,05 | 0,06 | 0,03 | 0,05 |
| 1,00E+08 | 5,47E+07 | Plasmid-DNA | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,04 |
| 1,00E+07 | 5,47E+06 | Plasmid-DNA | 0,05 | 0,05 | 0,03 | 0,05 |
| 1,00E+06 | 5,47E+05 | Plasmid-DNA | 0,04 | 0,06 | 0,06 | 0,05 |
| 1,00E+05 | 5,47E+04 | Plasmid-DNA | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,04 |
| 2,00E+04 | 1,12E+04 | Klinische Probe | 0,10 | 0,07 | 0,08 | 0,08 |
| 2,00E+03 | 1,09E+03 | Plasmid-DNA | 0,05 | 0,05 | 0,03 | 0,05 |
| 1,00E+03 | 5,62E+02 | Klinische Probe | 0,03 | 0,14 | 0,03 | 0,09 |
| 1,00E+03 | 5,47E+02 | Plasmid-DNA | 0,04 | 0,05 | 0,04 | 0,04 |
| 1,00E+02 | 5,62E+01 | Klinische Probe | 0,09 | 0,06 | 0,07 | 0,07 |
| 1,00E+02 | 5,47E+01 | Plasmid-DNA | 0,05 | 0,07 | 0,04 | 0,06 |
| 5,00E+01 | 2,81E+01 | Klinische Probe | 0,07 | 0,06 | 0,10 | 0,08 |

* Titerdaten werden als log-normalverteilt betrachtet und nach der $\log_{10}$-Transformation analysiert. In den Spalten zur Standardabweichung (SD) sind die log-transformierten Gesamttiter für die drei Reagenzchargen angegeben.

Tabelle 17 Laborinterne Präzision des cobas® HBV-Tests (EDTA-Plasmaproben – 200 µl Verarbeitungsvolumen)*

| Nennkonzentration (IE/ml) | Zugewiesene Konzentration (IE/ml) | Ausgangsmaterial | EDTA-Plasma | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Charge 1 | Charge 2 | Charge 3 | Alle Chargen |
| | | | SD | SD | SD | SD gepoolt |
| 1,00E+08 | 1,28E+08 | Plasmid-DNA | 0,04 | 0,05 | 0,03 | 0,04 |
| 1,00E+07 | 1,28E+07 | Plasmid-DNA | 0,06 | 0,04 | 0,02 | 0,04 |
| 1,00E+06 | 1,28E+06 | Plasmid-DNA | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,03 |
| 1,00E+05 | 1,28E+05 | Plasmid-DNA | 0,02 | 0,06 | 0,05 | 0,05 |
| 2,00E+04 | 1,71E+04 | Klinische Probe | 0,03 | 0,05 | 0,03 | 0,04 |
| 2,00E+03 | 2,57E+03 | Plasmid-DNA | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,05 |
| 1,00E+03 | 8,54E+02 | Klinische Probe | 0,07 | 0,05 | 0,03 | 0,05 |
| 1,00E+03 | 1,28E+03 | Plasmid-DNA | 0,06 | 0,07 | 0,03 | 0,05 |
| 1,00E+02 | 8,54E+01 | Klinische Probe | 0,09 | 0,09 | 0,07 | 0,09 |
| 1,00E+02 | 1,28E+02 | Plasmid-DNA | 0,06 | 0,09 | 0,11 | 0,09 |

* Titerdaten werden als log-normalverteilt betrachtet und nach der $log_{10}$-Transformation analysiert. In den Spalten zur Standardabweichung (SD) sind die log-transformierten Gesamttiter für die drei Reagenzchargen angegeben.

Tabelle 18 Laborinterne Präzision des cobas® HBV-Tests (Serumproben – 200 µl Verarbeitungsvolumen)*

| Nennkonzentration (IE/ml) | Zugewiesene Konzentration (IE/ml) | Ausgangsmaterial | Serum | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Charge 1 | Charge 2 | Charge 3 | Alle Chargen |
| | | | SD | SD | SD | SD gepoolt |
| 1,00E+09 | 7,92E+08 | Plasmid-DNA | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,04 |
| 1,00E+08 | 7,92E+07 | Plasmid-DNA | 0,07 | 0,05 | 0,06 | 0,06 |
| 1,00E+07 | 7,92E+06 | Plasmid-DNA | 0,04 | 0,03 | 0,04 | 0,04 |
| 1,00E+06 | 7,92E+05 | Plasmid-DNA | 0,03 | 0,05 | 0,04 | 0,04 |
| 1,00E+05 | 7,92E+04 | Plasmid-DNA | 0,06 | 0,07 | 0,03 | 0,06 |
| 2,00E+04 | 1,12E+04 | Klinische Probe | 0,16 | 0,08 | 0,03 | 0,11 |
| 2,00E+03 | 1,58E+03 | Plasmid-DNA | 0,05 | 0,04 | 0,05 | 0,05 |
| 1,00E+03 | 5,62E+02 | Klinische Probe | 0,07 | 0,04 | 0,04 | 0,05 |
| 1,00E+03 | 7,92E+02 | Plasmid-DNA | 0,07 | 0,05 | 0,06 | 0,06 |
| 1,00E+02 | 5,62E+01 | Klinische Probe | 0,09 | 0,10 | 0,07 | 0,09 |
| 1,00E+02 | 7,92E+01 | Plasmid-DNA | 0,08 | 0,09 | 0,09 | 0,08 |

* Titerdaten werden als log-normalverteilt betrachtet und nach der $log_{10}$-Transformation analysiert. In den Spalten zur Standardabweichung (SD) sind die log-transformierten Gesamttiter für die drei Reagenzchargen angegeben.

## Bestimmung und Verifizierung des Genotyps

Die Leistung des cobas® HBV-Tests für die verschiedenen HBV-Genotypen wurde wie folgt evaluiert:

- Bestimmung der Nachweisgrenze für die Genotypen B bis H und die vorherrschende Pre-Core-Mutante mit EDTA-Plasma und Serum für ein Verarbeitungsvolumen von 500 µl
- Verifizierung der Nachweisgrenze für die Genotypen B bis H und die vorherrschende Pre-Core-Mutante mit EDTA-Plasma und Serum für ein Verarbeitungsvolumen von 200 µl
- Verifizierung der Linearität für die Genotypen B bis H und die vorherrschende Pre-Core-Mutante

### Nachweisgrenze für die Genotypen B bis H und die vorherrschende Pre-Core-Mutante

Die Nachweisgrenze des cobas® HBV-Tests wurde bestimmt, indem für sieben verschiedene Genotypen (B, C, D, E, F, G, H) und die vorherrschende Pre-Core-Mutante (G1896A, C1858T) Verdünnungsreihen in HBV-negativem, humanem EDTA-Plasma und Serum mit einem Probenverarbeitungsvolumen von 500 µl analysiert wurden. Panels mit acht Konzentrationen plus Negativprobe wurden mit drei Chargen von cobas® HBV-Testreagenzien an mehreren Tagen mit mehreren Läufen, Bedienern und Instrumenten getestet.

Die Ergebnisse für EDTA-Plasma und Serum bei einem Probenverarbeitungsvolumen von 500 µl sind in Tabelle 19 und Tabelle 20 dargestellt. Die Untersuchung ergab, dass der cobas® HBV-Test alle HBV-Genotypen mit einer ähnlichen Nachweisgrenze wie derjenigen des HBV-Genotyps A nachweist.

Tabelle 19 Nachweisgrenze für HBV-DNA-Genotypen in EDTA-Plasma (500 µl)

| Genotyp | Nachweisgrenze von 95 % durch PROBIT-Analyse | 95 %-Konfidenzintervall |
|---|---|---|
| GT B | 3,45 IE/ml | 2,95 IE/ml – 4,32 IE/ml |
| GT C | 4,13 IE/ml | 3,32 IE/ml – 5,82 IE/ml |
| GT D | 4,52 IE/ml | 3,59 IE/ml – 6,49 IE/ml |
| GT E | 3,21 IE/ml | 2,76 IE/ml – 3,98 IE/ml |
| GT F | 1,87 IE/ml | 1,66 IE/ml – 2,24 IE/ml |
| GT G | 2,49 IE/ml | 2,17 IE/ml – 3,02 IE/ml |
| GT H | 6,55 IE/ml | 5,33 IE/ml – 8,77 IE/ml |
| Pre-Core-Mutante | 2,38 IE/ml | 2,08 IE/ml – 2,90 IE/ml |

Tabelle 20 Nachweisgrenze für HBV-DNA-Genotypen in Serum (500 µl)

| Genotyp | Nachweisgrenze von 95 % durch PROBIT-Analyse | 95 %-Konfidenzintervall |
|---|---|---|
| GT B | 3,30 IE/ml | 2,76 IE/ml – 4,30 IE/ml |
| GT C | 3,34 IE/ml | 2,83 IE/ml – 4,23 IE/ml |
| GT D | 2,59 IE/ml | 2,17 IE/ml – 3,42 IE/ml |
| GT E | 2,67 IE/ml | 2,25 IE/ml – 3,49 IE/ml |
| GT F | 1,98 IE/ml | 1,72 IE/ml – 2,45 IE/ml |
| GT G | 2,07 IE/ml | 1,75 IE/ml – 2,66 IE/ml |
| GT H | 3,48 IE/ml | 2,89 IE/ml – 4,60 IE/ml |
| Pre-Core-Mutante | 1,65 IE/ml | 1,43 IE/ml – 2,03 IE/ml |

### Verifizierung der Nachweisgrenze für die Genotypen B bis H und die vorherrschende Pre-Core-Mutante

Klinische HBV-DNA-Proben aller Genotypen (B, C, D, E, F, G, H) und die vorherrschende Pre-Core-Mutante (G1896A, C1858T) wurden in EDTA-Plasma und Serum auf drei verschiedene Konzentrationen verdünnt. Die Trefferquote wurde mit 63 Replikaten je Konzentration bestimmt. Die Tests wurden mit drei Chargen von cobas® HBV-Reagenzien durchgeführt. Die Ergebnisse für 200 µl EDTA-Plasma und Serum sind in Tabelle 21 und Tabelle 22 dargestellt. Diese Ergebnisse belegen, dass der cobas® HBV-Test HBV-DNA der sieben verschiedenen Genotypen und der vorherrschenden Pre-Core-Mutante in Konzentrationen von 12,50 IE/ml mit einer Trefferquote von ≥ 93,65 % nachweist, wobei das obere einseitige 95-%-Konfidenzintervall bei 97,80 % liegt.

Tabelle 21 Verifizierung der Nachweisgrenze für HBV-DNA-Genotypen in EDTA-Plasma (200 µl)

| Genotyp | 6,25 IE/ml | | | 12,50 IE/ml | | | 18,75 IE/ml | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % (95-%-KI*) | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % (95-%-KI*) | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % (95-%-KI*) |
| 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) |
| Pre-Core-Mutante | 63 | 54 | 85,71 (92,34) | 63 | 62 | 98,41 (99,92) | 63 | 63 | 100,00 (100,00) |

* Oberes einseitiges 95-%-Konfidenzintervall

Tabelle 22 Verifizierung der Nachweisgrenze für HBV-DNA-Genotypen in Serum (200 µl)

| | 6,25 IE/ml | | | 12,50 IE/ml | | | 18,75 IE/ml | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Genotyp | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % (95-%-KI*) | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % (95-%-KI*) | Anzahl der gültigen Replikate | Anzahl positiver Replikate | Trefferquote in % (95-%-KI*) |
| 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) |
| Pre-Core-Mutante | 63 | 60 | 95,24 (98,66) | 63 | 62 | 98,41 (99,92) | 63 | 63 | 100,00 (100,00) |

* Oberes einseitiges 95-%-Konfidenzintervall

### Linearität für die Genotypen B bis H und die vorherrschende Pre-Core-Mutante

Die zur Verifizierung der Genotypenlinearität des cobas® HBV-Tests verwendete Verdünnungsreihe umfasste 10 Panelproben, die den vorhergesehenen linearen Bereich abdeckten. Panelproben mit hohem Titer wurden aus einer Plasmid-DNA-Stammlösung mit hohem Titer hergestellt, während Panelproben mit niedrigem Titer aus klinischen Proben mit hohem Titer hergestellt wurden. Das Linearitäts-Panel war auf eine Titerüberlappung von ca. 2 $\log_{10}$ zwischen den beiden Materialquellen ausgelegt. Der lineare Bereich des cobas® HBV-Tests reicht von der unteren Quantifizierungsgrenze (10 IE/ml bei einem Probenverarbeitungsvolumen von 500 µl und 25 IE/ml bei einem Probenverarbeitungsvolumen von 200 µl) bis zur oberen Quantifizierungsgrenze (1,00E+09 IE/ml) und umfasst mindestens einen medizinischen Entscheidungspunkt. Es wurden für jede Konzentration 21 Replikate über drei Chargen des cobas® HBV-Reagenzes in EDTA-Plasma und Serum getestet.

Die Linearität des cobas® HBV-Tests wurde für alle sieben Genotypen (B, C, D, E, F, G, H) und die vorherrschende Pre-Core-Mutant (G1896A, C1858T) über den gesamten linearen Bereich verifiziert. Die maximale Abweichung zwischen der linearen Regression und der nichtlinearen Regression war kleiner oder gleich ± 0,2 $\log_{10}$.

## Spezifität

Die Spezifität des cobas® HBV-Tests wurde durch Analyse von HBV-negativen EDTA-Plasmaproben und Serumproben von Einzelspendern bestimmt. 300 einzelne EDTA-Plasmaproben und 300 einzelne Serumproben (insgesamt 600 Ergebnisse) wurden mit zwei Chargen von cobas® HBV-Reagenzien getestet. Alle Proben wurden negativ auf HBV-DNA getestet. Die Spezifität des cobas® HBV-Tests betrug im Test-Panel 100 % (mit einem einseitigen 95-%-Konfidenzintervall von 99,5 %).

## Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des cobas® HBV-Tests wurde durch Verdünnung eines Panels von Mikroorganismen mit HBV-DNA-positivem und HBV-DNA-negativem EDTA-Plasma evaluiert. Die Mikroorganismen wurden negativem EDTA-Humanplasma zugegeben und mit und ohne HBV-DNA getestet. Keines der Nicht-HBV-Pathogene beeinträchtigte die Testleistung. Der cobas® HBV-Test lieferte bei allen Mikroorganismusproben ohne HBV-Zielsequenz negative Ergebnisse und bei allen Mikroorganismusproben mit HBV-Zielsequenz positive Ergebnisse. Darüber hinaus lag der mittlere $log_{10}$-Titer bei allen HBV-positiven Proben, die möglicherweise zu Kreuzreaktivität führende Organismen enthielten, innerhalb von ± 0,3 $log_{10}$ Abstand zum mittleren $log_{10}$-Titer der entsprechenden zugesetzten Positivkontrolle.

Tabelle 23 Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität getestete Mikroorganismen

| Viren | | Bakterien | Hefen |
|---|---|---|---|
| Adenovirus Typ 5 | West-Nil-Virus | Propionibacterium acnes | Candida albicans |
| Cytomegalievirus | St.-Louis-Encephalitis-Virus | Staphylococcus aureus | |
| Hepatitis-A-Virus | Dengue-Virus Typ 1, 2, 3 und 4 | | |
| Hepatitis-C-Virus | FSME-Virus (Stamm HYPR) | | |
| Hepatitis-D-Virus | Gelbfiebervirus | | |
| Humanes Immundefizienz-Virus Typ 1 | Humanes Papillomavirus | | |
| Humanes T-Zell-lymphotropes Virus Typ 1 und 2 | Varicella-Zoster-Virus | | |
| Humanes Herpesvirus Typ 6 | Influenza A | | |
| Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und 2 | Zika-Virus | | |

## Analytische Spezifität – Störsubstanzen

Es wurden Proben mit erhöhten Werten von Triglyzeriden (34,5 g/l), konjugiertem Bilirubin (0,25 g/l), unkonjugiertem Bilirubin (0,25 g/l), Albumin (58,7 g/l), Hämoglobin (2,9 g/l) und erhöhten Human-DNA-Werten (2 mg/l) mit und ohne HBV-DNA getestet. Die getesteten endogenen potenziellen Störsubstanzen haben nachweislich keinen störenden Einfluss auf die Leistung des cobas® HBV-Tests.

Darüber hinaus wurden Proben mit Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematosus (SLE), rheumatoider Arthritis (RA) und antinukleären Antikörpern (ANA) getestet.

Zusätzlich wurden die in Tabelle 24 aufgeführten Wirkstoffe in 3facher $C_{max}$-Konzentration mit und ohne HBV-DNA getestet.

Keine der potenziellen Störsubstanzen führte zu einer Störung der Testleistung. Der cobas® HBV-Test lieferte bei allen Proben ohne HBV-Zielsequenz negative Ergebnisse und bei allen Proben mit HBV-Zielsequenz positive Ergebnisse. Darüber hinaus lag der mittlere $log_{10}$-Titer bei allen HBV-positiven Proben, die potenzielle Störsubstanzen enthielten, innerhalb von ± 0,5 $log_{10}$ Abstand zum mittleren $log_{10}$-Titer der entsprechenden zugesetzten Positivkontrolle.

Tabelle 24 Wirkstoffe, die auf eine mögliche Störung der quantitativen Bestimmung von HBV-DNA mit dem cobas® HBV-Test getestet wurden

| Wirkstoffklasse | Freiname | |
|---|---|---|
| Immunmodulator | Peginterferon α-2a | Peginterferon α-2b |
| | Ribavirin | |
| HIV-Entry-Inhibitor | Maraviroc | |
| HIV-Integrase-Inhibitor | Elvitegravir/Cobicistat | Raltegravir |
| Nicht-Nukleosid-HIV-Reverse-Transkriptase-Inhibitor | Efavirenz | Nevirapin |
| | Etravirin | Rilpivirin |
| HIV-Protease-Inhibitor | Atazanavir | Lopinavir |
| | Tipranavir | Nelfinavir |
| | Darunavir | Ritonavir |
| | Fosamprenavir | Saquinavir |
| HCV-Protease-Inhibitor | Boceprevir | Telaprevir |
| | Simeprevir | |
| Reverse-Transkriptase- und DNA-Polymerase-Inhibitoren | Abacavir | Tenofovir |
| | Emtricitabin | Adefovir dipivoxil |
| | Entecavir | Telbivudin |
| | Foscarnet | Zidovudin |
| | Cidofovir | Aciclovir |
| | Lamivudin | Valganciclovir |
| | Ganciclovir | Sofosbuvir |
| Substanzen zur Behandlung von opportunistischen Infektionen | Azithromycin | Pyrazinamid |
| | Clarithromycin | Rifabutin |
| | Ethambutol | Rifampicin |
| | Fluconazol | Sulfamethoxazol |
| | Isoniazid | Trimethoprim |

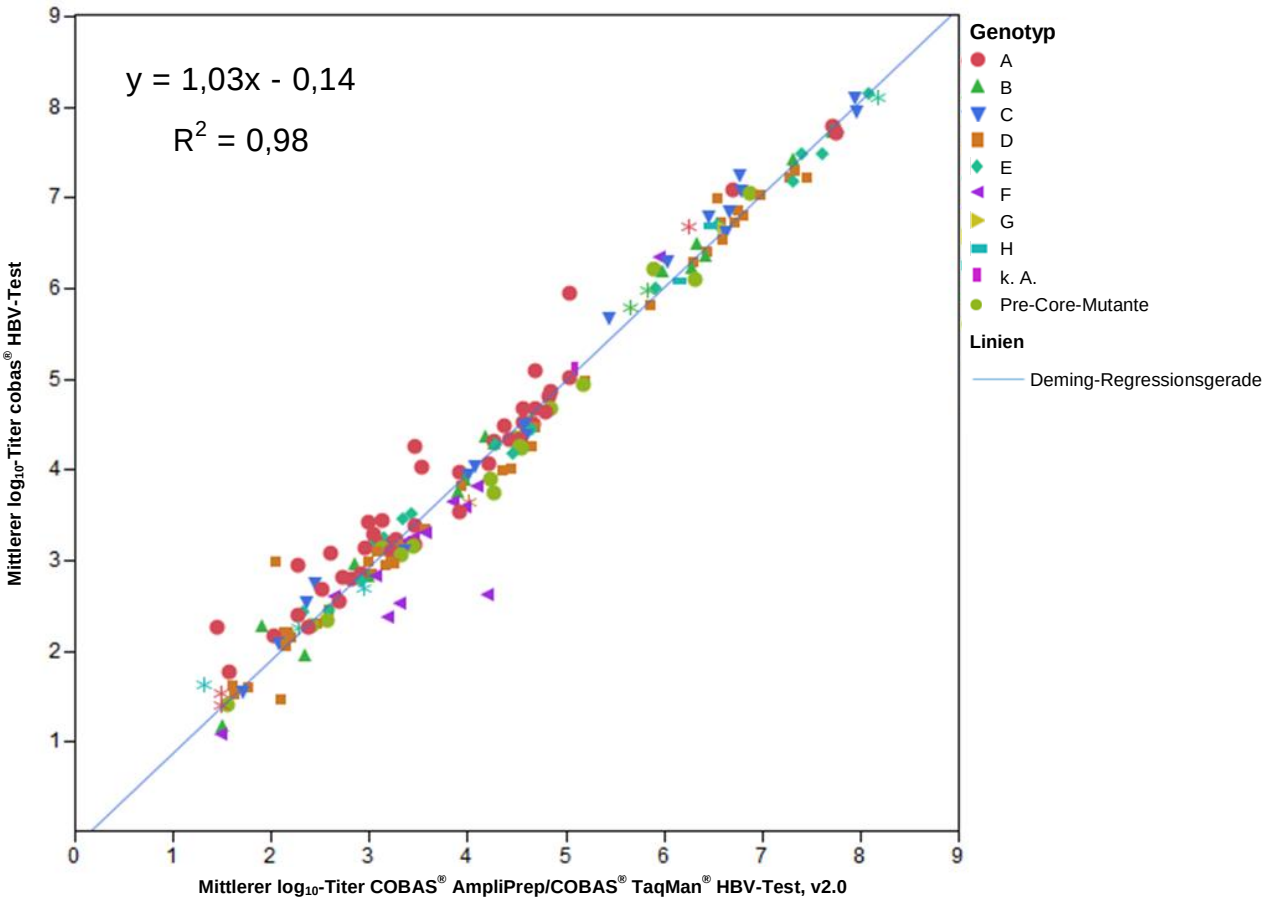
## Korrelation der Methode

Leistungsbewertung des cobas® HBV-Tests im Vergleich zum COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV-Test, v2.0

Zum Vergleich der Leistungsmerkmale des cobas® HBV-Tests und des COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV-Tests, v2.0 (TaqMan® HBV-Test, v2.0) wurden Serum- und EDTA-Plasmaproben von HBV-infizierten Patienten analysiert. Die Ergebnisse von insgesamt 103 EDTA-Plasma- und 85 Serumproben aller HBV-Genotypen (in Doppelbestimmung analysiert) waren gültig und lagen bei beiden Tests innerhalb des Quantifizierungsbereichs. Es wurde eine Deming-Regressionsanalyse durchgeführt. Die mittlere Titerabweichung der mit den beiden Tests getesteten Proben betrug -0,03 $log_{10}$.

Die Ergebnisse der Deming-Regression sind in Abbildung 7 dargestellt.

Abbildung 7 Regressionsanalyse des cobas® HBV-Tests im Vergleich zum TaqMan® HBV-Test, v2.0 anhand von EDTA-Plasma- und Serumproben

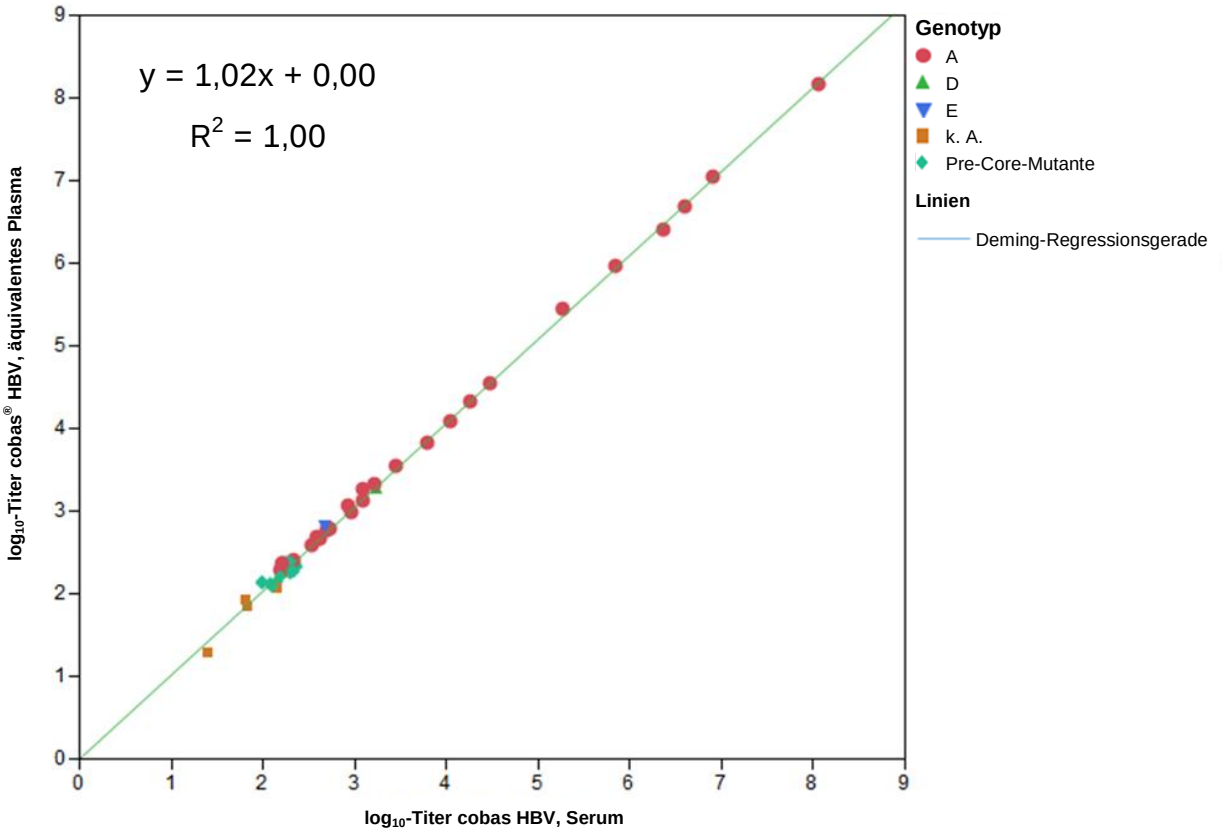


## Äquivalenzerhebung: EDTA-Plasma gegen Serum

Es wurden 50 gepaarte EDTA-Plasma- und Serumproben in Bezug auf deren Gleichwertigkeit als Ausgangsmaterial hin untersucht. Die HBV-positiven Proben deckten die meisten Genotypen ab und hatten Titer über den gesamten linearen Bereich.

Die Matrixgleichwertigkeit konnte in den getesteten Proben mit einer mittleren Titerabweichung von 0,05 $log_{10}$ bestätigt werden (Abbildung 8).

Abbildung 8 Matrixgleichwertigkeit von EDTA-Plasma und Serum




## Gesamtsystemausfall

Zur Ermittlung der Gesamtsystemausfall-Rate für den cobas® HBV-Test wurden jeweils 100 Replikate von EDTA-Plasma und Serum getestet, das mit HBV versetzt wurde (insgesamt 200 Replikate). Diese Proben wurden mit einer Zielsequenzkonzentration von ca. der 3fachen Nachweisgrenze getestet. Die Studie wurde auf dem cobas® 6800 System durchgeführt.

Die Studie ergab, dass alle Replikate reaktiv auf die einzelnen Zielsequenzen waren, was einer Gesamtsystemausfall-Rate von 0 % entspricht. Das exakte zweiseitige 95-%-Konfidenzintervall betrug bei beiden Matrizen 0 % für die Untergrenze und 3,62 % für die Obergrenze [0 %: 3,62 %].

## Kreuzkontamination

Zur Ermittlung der Kreuzkontaminationsrate des cobas® HBV-Tests wurden 240 Replikate einer normalen virusnegativen (HIV, HCV und HBV) EDTA-Humanplasmaprobe sowie 225 Replikate einer Probe mit hohem HBV-Titer von 1,0E+09 IE/ml getestet. Es wurden insgesamt fünf Läufe mit Positiv- und Negativproben in Schachbrettkonfiguration durchgeführt.

Alle 240 Replikate der negativen Probe waren nicht-reaktiv, was einer Kreuzkontaminationsrate von 0 % entspricht. Das exakte zweiseitige 95-%-Konfidenzintervall betrug 0 % für die Untergrenze und 1,53 % für die Obergrenze [0 %: 1,53 %].

# Weitere Informationen

## Wichtigste Leistungsmerkmale des Tests

| | | | |
|---|---|---|---|
| Probentyp | EDTA-Plasma, Serum | | |
| Erforderliche Probenmindestmenge | 650 µl oder 350 µl | | |
| Probenverarbeitungsvolumen | 500 µl oder 200 µl | | |
| Analytische Sensitivität | | 500 µl | 200 µl |
| | EDTA-Plasma | 2,7 IE/ml | 15,5 IE/ml |
| | Serum | 2,4 IE/ml | 12,5 IE/ml |
| Linearer Bereich | 500 µl: 10 IE/ml bis 1,0E+09 IE/ml | | |
| | 200 µl: 25 IE/ml bis 1,0E+09 IE/ml | | |
| Spezifität | 100 % (einseitiges 95-%-Konfidenzintervall: 99,5 %) | | |
| Nachweisbare Genotypen | HBV-Genotypen A–H und vorherrschende Pre-Core-Mutante | | |

Die folgenden Symbole werden bei der Etikettierung von Roche PCR-Diagnostikprodukten verwendet.

Tabelle 25 Symbole auf den Etiketten von Roche PCR-Diagnostikprodukten

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Zusatz-Software | | In-vitro-Diagnostikum |
| | Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft | | Unterer Grenzwert des Sollbereichs |
| | Barcode-Datenblatt | | Hersteller |
| | Chargenbezeichnung | | Im Dunkeln aufbewahren |
| | Biogefährdung | | Ausreichend für <n> Tests |
| | Bestellnummer | | Temperaturbegrenzung |
| | Gebrauchsanweisung beachten | | Testdefinitionsdatei |
| | Inhalt der Packung | | Oberer Grenzwert des Sollbereichs |
| | Vertrieb | | Verwendbar bis |
| | Nur zur Beurteilung der IVD-Leistung | | Globale Artikelnummer GTIN |
| | Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98/79/EG für in-vitro-diagnostische medizinische Geräte. | | |

Technischer Kundendienst in den USA: +1 800 526 1247

# Herstellung und Vertrieb

Tabelle 26 Herstellung und Vertrieb

Hergestellt in den USA

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

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

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, Germany

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

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

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

Roche Diagnostics
2, Avenue du Vercors
38240 Meylan, France

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

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

## Marken und Patente

Siehe http://www.roche-diagnostics.us/patents

## Copyright

©2015 Roche Molecular Systems, Inc.

## Literatur


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.

# Dokumentversion

| Dokumentversionsübersicht | |
|---|---|
| Doc Rev. 1.0<br>01/2015 | Erstveröffentlichung. |
| Doc Rev. 2.0<br>08/2015 | Die Dimethylsulfoxid-Konzentration in Tabele 1 wurde aktualisiert.<br>Die Anzahl der Replikate im Abschnitt Nachweisgrenze für die Genotypen B bis H und die vorherrschende Pre-Core-Mutante wurde aktualisiert.<br>Die Formel in Abbildung 7 und Abbildung 8 wurde durch ein „x“ ergänzt.<br>Informationen zum Vertrieb in den USA wurden entfernt.<br>Die Symbolbezeichnungen am Ende der Packungsbeilage wurden im Zuge der Harmonisierung aktualisiert.<br>Bei Fragen wenden Sie sich bitte an Ihre Roche-Vertretung vor Ort. |