

# HDV RNA RETROTRANSCRIPTION KIT



Kit per la trascrizione inversa dell'RNA del Virus dell'Epatite Delta (HDV)

4BShopLab

## Kit di retrotrascrizione dell' HDV RNA

### A. USO PREVISTO

Il kit di retrotrascrizione dell' HDV RNA codice RNART.HDV.CE è destinato alla trascrizione inversa del cDNA dell' RNA del virus dell'epatite D.

### B. INTRODUZIONE

La retrotrascrizione e successiva reazione di polimerizzazione a catena (RT-PCR) ha lo scopo di generare numerose copie di un cDNA da una molecola di RNA, utilizzando l'enzima della trascrittasi inversa.

Il cDNA risultante viene usato come materiale di partenza per una PCR real-time per la determinazione quantitativa in siero umano dell'RNA del virus dell'epatite D utilizzando il kit DRNA.CE (Dia.Pro srl).

### C. PRINCIPIO DEL TEST

L' HDV RNA virale, ottenuto dal campione biologico in esame attraverso una fase di estrazione, viene retrotrascritto in cDNA utilizzando i reagenti forniti nel kit.

### D. REAGENTI

Il formato standard del prodotto codificato come RNART.HDV.CE contiene reagenti per 50 test.

Reagente	Etichettatura e contenuto	RNART.HDV.CE 50 reazioni
<b>REAGENT A</b> CODIFICATO: RNART/ A CODICE COLORE: GIALLO	ENZIMA MMLV	2 provetta/35 µl
<b>REAGENT B</b> CODIFICATO: RNART/ B CODICE COLORE: ARANCIO	RETROMIX	2 provetta/0,285 ml
<b>REAGENT C</b> CODIFICATO: ALL/C CODICE COLORE: ROSSO	ACQUA MB GRADE	2 provetta/1,5 ml
Foglietto illustrativo	INSERTO	1

**Nota importante:** Su richiesta Dia.Pro può fornire reagenti per 25, 100 tests, come riportato nella tabella sottostante:

1. Reagente A	n°1 provette/35 µl	n°4 provette/35 µl
2. Reagente B	n°1 provette/0,285 ml	n°4 provette/0,285 ml
3. Reagente C	n°1 provetta/1,5 ml	n°3 provetta/1,5 ml
4. Foglietto illustrativo	n°1	n°1
<b>Numero di test</b>	<b>25</b>	<b>100</b>
<b>Codice</b>	<b>RNART.HDV.CE.25</b>	<b>RNART.HDV.CE.100</b>

### E. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate
2. Kit di purificazione dell'RNA
3. Microcentrifuga
4. Portaprovette
5. Puntali sterili con filtro con barriera aerosol
6. 0,2 ml Microprovette raccomandate dai fabbricanti degli strumenti per PCR
7. Guanti monouso non talcati
8. Termociclatore programmabile
9. Vortex o miscelatori similari

### F. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico esperto ed adeguatamente addestrato, dietro supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Il personale tecnico deve essere specificamente addestrato all'uso dei termociclatori, nonché alla manipolazione dei reagenti per biologia molecolare e deve avere familiarità con i protocolli di amplificazione per PCR.
3. Tutto il personale impiegato nell'analisi deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti privi di talco ed occhiali. Evitare di utilizzare oggetti appuntiti (aghi) e taglienti (lame). Tutto il personale interessato deve essere addestrato alle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, USA, e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
4. Tutto il personale impiegato nel trattamento dei campioni deve essere vaccinato contro HBV e HAV, per i quali sono disponibili vaccini sicuri ed efficaci.
5. L'ambiente di laboratorio deve essere controllato per evitare contaminanti come polvere o agenti microbici a trasmissione aerogena al momento dell'apertura delle provette del kit.
6. Al ricevimento, riporre il kit in un freezer a temperatura controllata o in una camera fredda a una temperatura di -15°C -35°C.
7. Non mischiare i reagenti dei kit di diversi lotti. Si raccomanda anche che non vengano scambiati reagenti tra due kit dello stesso lotto.
8. Assicurarsi che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti visibili o aggregati. In caso contrario, informare il supervisore del laboratorio per avviare le procedure necessarie alla sostituzione del kit.
9. Evitare la contaminazione crociata tra campioni, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione.
10. Evitare la contaminazione crociata tra reagenti del kit, utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni uso.
11. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza riportata all'esterno del contenitore.
12. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni di siero umano dovrebbero essere trattati al livello 2 delle norme di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, U.S. e nel rispetto delle norme riportate nella pubblicazione degli Institutes of Health's: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

13. Effettuare tutte le necessarie operazioni nel minor tempo possibile, conservando i reagenti su ghiaccio o in un blocco refrigerante.

14. Il flusso di lavoro in laboratorio deve procedere in un'unica direzione (Workflow unidirezionale), muovendo verso le aree di amplificazione ed analisi dati. Non riportare campioni, attrezzatura e reagenti nell'area dove sono stati compiuti i passaggi operativi precedenti. Non introdurre mai un prodotto di amplificazione nell'area designata per l'estrazione/la preparazione di prodotti di amplificazione.

15. Si raccomanda l'uso di materiale monouso in plastica per la preparazione dei reagenti liquidi o per il trasferimento dei reagenti nelle stazioni di lavoro robotizzate, per evitare la contaminazione crociata.

16. I materiali di rifiuto prodotti utilizzando il kit devono essere smaltiti e trattati secondo le direttive nazionali e le leggi che regolamentano il trattamento dei rifiuti di laboratorio provenienti da sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi derivanti dalle procedure di lavaggio, da residui di controlli o da campioni devono essere considerati e trattati come materiale potenzialmente infettivo ed inattivati prima di essere gettati. Si suggerisce di inattivare per trattamento con una soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina) al 10% per 16-18 ore o mediante inattivazione termica in autoclave a 121°C per 20 minuti.

17. Spargimenti accidentali da campioni o da operazioni in corso devono essere eliminati con carta assorbente imbevuta di candeggina per uso domestico e poi con acqua. La carta assorbente utilizzata deve essere gettata negli appositi contenitori per rifiuti di laboratorio od ospedalieri.

18. Altri materiali di scarto generati dall'uso del kit (ad esempio: puntali usati per controlli e campioni, micropiastre usate) devono essere maneggiate come potenzialmente infetti e smaltiti in accordo alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

#### G. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue deve essere raccolto mediante prelievo venoso in asepsi e il plasma o il siero viene preparato utilizzando le tecniche standard per il trattamento dei campioni per analisi cliniche di laboratorio.

2. Non è stata osservata alcuna influenza nella preparazione del campione in presenza di citrato, EDTA.

Attenzione: l'eparina ( $\geq 10$  UI/ml) condiziona le reazioni di PCR. Non usare campioni raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante. Inoltre, non usare campioni di pazienti eparinizzati.

3. Evitare qualsiasi aggiunta di conservanti ai campioni.

4. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare interpretazioni errate dei risultati. Quando il kit è usato per lo screening delle unità di sangue si raccomanda fortemente l'etichettatura con codice a barre e la lettura elettronica.

5. I campioni emolizzati (rossi) e visibilmente iperlipemici (lattescenti) devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati. I campioni contenenti residui di fibrina, particelle pesanti o filamenti e corpuscoli microbici devono essere scartati in quanto potrebbero generare risultati errati.

6. Se non utilizzati immediatamente i sieri devono essere suddivisi in aliquote e conservati a -20° -80°C dopo la raccolta. I campioni possono essere conservati congelati a -20°..-80°C per parecchi mesi. Qualsiasi campione congelato non deve essere congelato/scongelato più di una volta, perché questo potrebbe inficiare il risultato del test.

7. Non usare campioni inattivati con il calore, in quanto potrebbero indurre una falsa reattività.

#### H. PREPARAZIONE DEI REAGENTI E AVVERTENZE

Tutti i reagenti sono **pronti all'uso**.

Prima dell'uso, tutti i componenti del kit devono essere brevemente centrifugati.

#### I. STRUMENTI E ACCESSORI USATI IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. Le **micropipette** devono essere calibrate per fornire il volume corretto richiesto dall'analisi ed essere regolarmente decontaminate (alcol ad uso domestico, 10% soluzione di candeggina domestica, disinfettanti ad uso ospedaliero) nelle parti che possono accidentalmente venire in contatto con il campione. Devono inoltre essere regolarmente controllate per garantire una precisione dell'1% e un'esattezza di +/-5%. Si dovrebbe anche regolarmente provvedere a decontaminazione di eventuali spargimenti o residui dei reagenti del kit.
2. **Dispositivo di estrazione:** Il kit RNART.HDV.CE è destinato all'uso esclusivamente insieme a kit di estrazione. Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.
3. **Termociclatori** Il kit RNART.HDV.CE è da usarsi preferibilmente in combinazione con termociclatori real-time o con termociclatori per PCR solo se correttamente calibrati e manutentuti. Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.

#### L. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE-ANALISI

1. Verificare la data di scadenza stampata sull'etichetta esterna della scatola contenente il kit. Non utilizzare il kit se è scaduto.
2. Verificare che i reagenti liquidi non siano contaminati da particelle visibili ad occhio nudo o aggregati. Accertarsi che il prodotto non si sia danneggiato durante il trasporto e che non sia presente alcuna fuoriuscita di liquidi all'interno della scatola.
3. Avviare i termociclatori, verificare le impostazioni e assicurarsi di utilizzare il protocollo di analisi corretto.
4. Seguire rigorosamente le istruzioni contenute nel manuale dello strumento fornito dai produttori per la corretta impostazione dei termociclatori.
5. Verificare che le micropipette siano impostate sul volume corretto.
6. Controllare che tutto il resto dell'attrezzatura sia disponibile e pronto all'uso.
7. In caso di problemi, sospendere il test ed informare il supervisore.

#### M. PROCEDURA D'ANALISI

Il test deve essere eseguito secondo le istruzioni di seguito riportate.

##### M.1 Estrazione RNA Virale

La fase estrattiva dell'RNA genomico dell'HDV deve essere eseguita esclusivamente in combinazione con il seguente kit:

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Produttore
Siero/Plasma	QIAamp Viral RNA mini kit®	52906	Qiagen™

L'isolamento dell' RNA deve essere realizzato esclusivamente seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

## M.2 Retro-trascrizione dell'RNA Virale (HDV) a c-DNA

- Scongellare la miscela di Retro (REAGENTE B) poco prima dell'uso e lavorare in ghiaccio
- Scongellare il REAGENTE C (ALL/C) poco prima dell'uso e lavorare in ghiaccio
- Prima dell'uso, tutti i componenti del kit devono essere brevemente centrifugati e lavorare in ghiaccio
- Preparare la RETROMIX come segue:

### Preparazione del RETROMIX

Numero di reazioni		1	25
REAGENTE A (RNART.CE)	MMULV	1 µl	25 µl
REAGENTE B (RNART.CE)	Retro mix	9.5 µl	237.5 µl
REAGENTE C (RNART.CE)	MB WATER	8.5 µl	212.5 µl
HDV/REV (*)	Specific Reverse Primer	1 µl	25 µl
<b>Tot vol.</b>		<b>20 µl</b>	<b>500 µl</b>

(\*) **Nota importante:** il reagente Specific Reverse Primer (HDV/REV) è contenuto nel kit DRNA.CE

### Preparazione del test di retro trascrizione

La retrotrascrizione dell' HDV RNA deve essere eseguito come segue:

Numero di reazioni	1
<b>RETROMIX</b>	20 µl
Sample (RNA) or ALL/C	10 µl
<b>Tot. vol.</b>	<b>30 µl</b>

- Preparare il numero richiesto di provette di reazione per i campioni da analizzare (si consiglia di testare i campioni in doppio)
- Prevedere una provetta supplementare per il controllo negativo (ALL/C)
- Aggiungere i **campioni** alle provette di reazione.
- Chiudere bene le provette di reazione.
- Centrifugare brevemente le provette di reazione a 2000 giri/min.
- Caricare le provette nel supporto termoblocco del termociclatore e impostare il profilo termico riportato nella tabella seguente:

Fase	Ciclo	Temp.	Durata
1	1	42°C	60 min
2	1	99°C	10 min

Alla fine della fase di retrotrascrizione i campioni dovrebbero essere conservati in ghiaccio oppure conservati a -20°C.

Se non si usa immediatamente il cDNA, conservarlo per 24 ore a una temperatura compresa tra 2°C e +8°C, mentre per conservazioni prolungate (1 o 2 settimane) il cDNA deve essere conservato a -15°C/-35°C.

## N. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Il controllo della qualità della reazione può essere effettuato solo dopo la fase di amplificazione. Sono possibili i seguenti risultati:

### Tabella di risoluzione dei problemi

	<b>non valido</b>	<b>Cause possibili</b>	<b>CONTROLLO</b>
CAMPIONE sconosciuto	<b>FALSO POSITIVO</b>	<i>Errore durante il pipettaggio dell'RNA</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aprire una provetta per volta, evitando di versarne il contenuto</li> <li>• che i puntali siano stati cambiati ogni volta</li> </ul>
		<i>Contaminazione dei reagenti preparati nella sessione</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• che la dispensazione dei reagenti sia stata monitorata</li> <li>• che i puntali siano stati cambiati ogni volta</li> </ul>
		<i>Contaminazione dell'AREA designata per l'estrazione/la preparazione delle reazioni di amplificazione.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• che le superfici e gli strumenti siano stati puliti in base a quanto descritto nel paragrafo F.</li> </ul>
		<i>Eccesso dell'RNA estratto nella reazione</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• che la concentrazione dell'RNA estratto aggiunto alla provetta di reazione sia stata quantificata correttamente</li> <li>• Non superare la concentrazione di 40 ng/µl (un totale di 1 ug di RNA) nella trascrizione inversa.</li> </ul>
CAMPIONE sconosciuto	<b>FALSO NEGATIVO</b>	<i>Eccesso di cDNA o di reagenti per la trascrizione inversa nell'amplificazione</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• che l'aggiunta di una quantità eccessiva di prodotto di reazione per la trascrizione inversa nella reazione di amplificazione sia stata evitata</li> </ul>
		<i>Errore durante la dispensazione</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• che la dispensazione sia stata eseguita con attenzione</li> </ul>
		<i>Perdita di attività degli enzimi</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conservare le provette su ghiaccio</li> </ul>
		<i>Errore nell'impostazione del profilo termico</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• che il profilo termico impostato sul termociclatore sia stato controllato prima di iniziare l'esperimento</li> </ul>
		<i>Degradazione dell'acido nucleico estratto</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• che sia stata usata plastica DNase- e RNase-free</li> <li>• che tutte le procedure di buona pratica di laboratorio per la manipolazione dell'RNA siano state rigorosamente rispettate</li> </ul>
		<i>Scarsa qualità dell'estrazione dell'RNA</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ripetere la fase di estrazione con un nuovo campione</li> </ul>

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti **RISULTATO CORRETTO** precedentemente definiti, procedere alla fase di amplificazione seguendo il disegno specifico del protocollo DRNA.CE (Dia.Pro srl).

Se si presentano uno o più problemi tra quelli precedentemente descritti, dopo il controllo informate il supervisore di qualsiasi problema residuo per l'eventuale adozione di ulteriori misure.

## O. PERFORMANCE

La valutazione delle performance è stata eseguita in conformità a quanto indicato nelle specifiche tecniche interne o ITS.

## P. BIBLIOGRAFIA

**Perez-Novo, C.A. et al.** Impact of RNA quality on reference gene expression stability. *Biotechniques* 39, 52,54,,56 (2005)

## 5. Simboli

LEGENDA			
	Codice del prodotto		Temperatura di conservazione
	Dispositivo diagnostico in vitro		Vedere le istruzioni per l'uso
	Numero di lotto		Produttore
	Data di scadenza		Numero di test
	Marchio di conformità CE		Data di produzione

Tutti i Prodotti IVD sono fabbricati dall'Azienda nell'ambito e sotto il controllo di un Sistema di Qualità certificato conforme alla Norma ISO 13485. Ogni lotto è sottoposto ad una procedura di Controllo di Qualità e rilasciato alle vendite solo se conforme alle specifiche tecniche comuni Europee e ai criteri di accettabilità definiti.





## CONTATTI DISTRIBUTORE

### 4BShop Lab Srls

-  [info@4BShopLab.com](mailto:info@4BShopLab.com)
-  [www.4BShopLab.com](http://www.4BShopLab.com)
-  +39.0371.18.56.643

## FABBRICANTE

**Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl**

 **MADE IN ITALY**

**EN ISO 13485:2013 Certified**

