



# HBV DNA QUANTITATION (QT)

---

Real-Time PCR per la quantificazione del genoma di HBV



4BShopLab

# HBV DNA

## A. DESTINAZIONE D'USO

Il kit codificato **HBVDNAQT.CE** è destinato alla rilevazione quantitativa del DNA del virus dell'epatite B in Real Time PCR nel plasma umano con simultaneo controllo della reazione di Estrazione/Amplificazione attraverso l'utilizzo di un **Controllo Interno (IC)** eterologo.

Il kit deve essere usato in combinazione con osservazioni cliniche e con altri marcatori di laboratorio quale indicatore prognostico dell'evoluzione della malattia e come ausilio nella valutazione della risposta al trattamento terapeutico.

Il kit è stato adattato per l'utilizzo su strumenti di Real-Time PCR quali ABI 7500 Sequence Detection System® (Applied Biosystems™\*) software SDS 1.3.1 or MX3000P® software MxPro 4.01(Stratagene™\*\*\*).

\* Applied Biosystems è un marchio registrato e ABI PRISM® è un marchio registrato di Applied Biosystems Corporation o delle sue consociate negli USA e/o in altri paesi  
\*\*\*Stratagene è un marchio registrato

## B. INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite B è un virus appartenente alla famiglia degli Hepadnavirus. Il suo genoma è un piccolo ds DNA circolare, incompleto che diviene un genoma completo (cccDNA) e super-avvolto quando il virus penetra negli epatociti dell'ospite. Recentemente sono stati identificati otto genotipi (da A a H). Il virus ha un'alta velocità di replicazione ed un'elevata frequenza di mutazione. Queste mutazioni causano l'accumulo in ogni individuo infettato di numerose varianti genetiche chiamate "quasi specie". Numerose prove dimostrano che la storia naturale e la risposta al trattamento terapeutico può cambiare in relazione al genotipo di HBV infettante. Tuttavia la reale correlazione tra il genotipo e il decorso clinico non sono completamente compresi. L'infezione virale da epatite B è un problema di salute pubblica globale coinvolgente 350 milioni di persone nel mondo. Essa può progredire in una forma cronica (CHB) o può essere causa di malattia epatica o di carcinoma epatocellulare (HCC). Attualmente numerose osservazioni cliniche dimostrano che la gravità del danno epatico è modulata dalla forza della risposta immunitaria. In base a ciò è possibile riconoscere due tipi di infezione: acuta e cronica.

Nell'infezione acuta da HBV l'antigene di *superficie* dell'epatite B (HBsAg), l'antigene *core* IgM (HBcIgM), l'antigene *e* (HBeAg) sono individuabili nel siero ma ALT non aumenterà fino a che l'infezione sarà conclamata. Le concentrazioni di HBV DNA sono generalmente molto alte estendendosi da 200 milioni di UI/ml fino a 200 bilioni di UI/ml.

L'infezione cronica da HBV può presentare 5 fasi: 1) immuno tolleranza (alti livelli di HBeAg, HBsAg e HBV DNA - alta velocità di replicazione virale); 2) Reazione immune (HBeAg/HBsAg positivi, concentrazioni alte o basse di HBV DNA in relazione allo stadio di infezione perinatale o adulta, ALT fluttuante); 3) Stato di carrier inattivo (siero conversione HBeAg vs HBeAb, HBsAg positive, ALT normale, concentrazioni di HBV DNA molto basse o non dosabili <3log); 4) Epatite cronica HBeAg-negativo (HBeAg negativo/HBeAb positivo o reversione a HBeAg positivo, concentrazioni di HBV DNA fluttuanti, aumenti o fluttuazioni di ALT. La mancanza di HBeAg in qualche paziente, in questa fase, è legata a mutazioni nel genoma dell'HBV); 5) passate infezioni (HBsAb positive, HBsAg negative, ALT normale, concentrazione di HBV DNA negativa o molto bassa <2.3log).

La diagnosi ed il monitoraggio dell'infezione di HBV si basa sulla ricerca di marcatori immunologici e sierologici e sul genoma virale circolante (HBV DNA), come indicato sopra. Le concentrazioni di HBV DNA nel siero o plasma riflettono i livelli di replicazione virale e la potenziale infettività, perciò la quantificazione della carica virale per HBV è importante nella valutazione e nella gestione dei pazienti con infezione cronica da HBV. Le nuove linee guida EASL raccomandano di considerare la carica virale per HBV per individuare quali pazienti cronici devono essere trattati e quale terapia adottare (interferone o NUC-analoghi nucleosidici).

Lo scopo primario di tutte le terapie è la riduzione di HBV DNA al di sotto dei 2.3log in modo tale che la progressione verso la cirrosi epatica o HCC sia neutralizzata

## C. PRINCIPIO DEL TEST

Il kit HBVDNAQT.CE si basa sulla tecnologia Real Time PCR per individuare e quantificare l'HBV DNA nei campioni di plasma.

La specificità del test è in primo luogo garantita dalla selezione di specifici primers e sonde così come dalla scelta di stringenti condizioni di reazione.

L'**HBV DNA**, proveniente dal campione di plasma è estratto e amplificato insieme con la sequenza non correlata (**IC**) introdotta in ogni campione biologico all'inizio della preparazione del campione. Attraverso l'utilizzo del Controllo Interno (IC) è possibile monitorare che l'intero processo di estrazione/amplificazione si realizzi adeguatamente per ogni campione analizzato.

Il prodotto di amplificazione è individuato e quantificato, rispetto alla curva standard, usando una sonda con sequenza specifica per l'HBV recante un reporter dye fluorescente. La costruzione della curva standard permette la determinazione della carica virale.

Il sistema è calibrato sul World Health organization (WHO) 2<sup>nd</sup> International Standard for Hepatitis B virus (NIBSC Code 97/750).

I risultati sono riportati in Unità per millilitro (UI/ml) o copie/ml.

Il sistema non può essere usato per lo screening di HBV o come test diagnostico per confermare la presenza dell' infezione da HBV.

## D. COMPONENTI

Il formato standard del prodotto codificato HBVDNAQT.CE contiene reagenti per 50 reazioni

Componenti	Etichette e Contenuto	HBVDNAQT.CE 50 Reazioni
<b>A</b> CODICE: ALL/MM Codice colore: blue	Master mix	N° 2 / 0.40 ml
<b>B</b> CODICE: HBV/CB Codice colore: giallo	Primers/Probes Liofilo	N° 2 (Sciogliere con ALL/IC indicato sull'etichetta delle provette)
<b>C</b> CODICE: ALL/C Codice colore: rosso	MG Water	N° 3 vials/1.5 ml
<b>NTC</b> CODICE: ALL/NTC Codice colore: bianco	Controllo negativo	N° 1 vials /1.5 ml
<b>STD</b> CODICE: HBV/STD Codice colore: rosso	Calibratore Standard Liofilo (2.0E+05 UI/μl)	N° 4 (Sciogliere con ALL/IC indicato sull'etichetta del tubo)
<b>I.C.</b> CODICE: ALL/IC Codice colore: verde	Controllo interno liofilo	N° 2 (Sciogliere con ALL/IC indicato sull'etichetta delle provette)
<b>Metodica</b>	Istruzioni d'uso	N° 1

**Note importanti:** su richiesta, Dia.Pro può fornire reagenti per 25, 100, 150 reazioni, come riportato qui di seguito :

Componente A	n°1 provette/0.4 ml	n°4 provette/0.4 ml	n°6 provette/0.4 ml
Componente B	n°1 provette	n°4 provette	n°6 provette
Componente C	n°2 provette/1.5 ml	n°3 provette/1.5 ml	n°5 provette/1.5 ml
NTC	n°1 provette/1.5ml	n°1 provette/1.5ml	n°1 provette/1.5ml
IC	n°1 provette	n°4 provette	n°6 provette
STD	n°2 provette	n°4 provette	n°6 provette
Metodica	n° 1	n° 1	n° 1
<b>Numero di reazioni</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>150</b>
<b>Codice</b>	<b>HBVDNAQT.CE.25</b>	<b>HBVDNAQT.CE.100</b>	<b>HBVDNAQT.CE.150</b>

## E. STABILITA' DI CONSERVAZIONE

Il kit HBVDNAQT.CE deve essere conservato a +2.....+8°C.

Una volta dissolti i Componenti B (codice HBV/CB) ed il Componente I.C. (codice ALL/IC) sono stabili a -20°C per 30 giorni. Invece il Componente STD (codice HBV/STD) è stabile per 15 giorni a -20°C. Scongela solo una volta i componenti già risospesi con il Componente C (MG Water) aliquotati e congelati.

## F. MATERIALI RISCHIESTI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate (0,5 µl <volume<1000 µl)
2. Kit di estrazione DNA
3. MG EtOH
4. Termo blocco
5. Termo-shaker
6. Microcentrifuga
7. Tubi e contenitori da 2 ml
8. Puntali sterili con filtro
9. Microtubi da 0.2 ml raccomandati dai produttori di strumenti di Rela-Time PCR
10. Guanti monouso privi di talco
11. Termociclatori per Real-Time PCR (\*)
12. Fogli di carta assorbente.
13. Vortex o strumenti di miscelazione simili.

(\*) **Attenzione:** Una valida calibrazione dei dyes (Pure Spectra Component File) e del background (Background Component File) è necessaria per ogni strumento utilizzato.

## G. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere utilizzato solo da personale tecnico esperto e adeguatamente istruito, sotto la supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Il personale tecnico deve essere perfettamente istruito nell'uso dei termociclatori di Real-Time, nella manipolazione di reagenti di Biologia Molecolare ed esperto nei protocolli di amplificazione di Real-Time PCR.
3. Il kit deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato da un'autorità nazionale specifica per il settore (Ministero della sanità o istituzioni simili) per eseguire questo tipo di analisi.
4. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del saggio deve indossare il camice da laboratorio, guanti privi di talco e occhiali. L'uso di strumenti acuminati (aghi) o taglienti (bisturi) dovrebbe essere evitato. Tutto il personale coinvolto dovrebbe essere istruito nelle procedure di sicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, U.S. e riportato nella pubblicazione su National Institute of Health's publication "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Tutto il personale coinvolto nella manipolazione dei campioni dovrebbe essere vaccinato per HBV e HAV, per i quali sono disponibili sicuri ed efficaci vaccini.
6. L'ambiente di laboratorio dovrebbe essere controllato in modo che siano evitati i contaminanti come polvere o agenti microbici aerobi, quando i tubi e i componenti dei kit vengono aperti per realizzare il saggio.
7. I Componenti A e B sono sensibili alla luce. Proteggerli dalla forte esposizione alla luce.
8. Prestare **particolare attenzione** durante la dissoluzione dei tubi liofilizzati osservando che la polvere presente sulle pareti del tubo, nel caso in cui la centrifugazione non fosse sufficiente, sia inclusa nel volume di acqua utilizzata per la dissoluzione.
9. Il non corretto scioglimento dei tubi liofilizzati potrebbe compromettere il risultato.
10. Evitare vibrazioni del banco di lavoro sul quale il saggio è preparato.
11. Una volta ricevuto, conservare il kit a 2...8°C in un frigorifero o cella frigorifera a temperatura controllata.
12. Non utilizzare componenti provenienti da differenti lotti di kits. Si raccomanda che i componenti tra due kit dello stesso lotto non dovrebbero essere interscambiati.
13. Controllare che i reagenti siano chiari e non contengano particelle o aggregati pesanti visibili. In caso contrario avvertire il supervisore del laboratorio affinché avvii le procedure necessarie alla sostituzione del kit.
14. Il passaggio dell'estrazione è molto importante per ottenere un risultato corretto. Seguire attentamente le istruzioni indicate nel manuale d'uso.
15. Durante l'estrazione alcuni passaggi sono cruciali. Un passaggio chiave nella procedura di purificazione è la centrifugazione. E' importante ottenere un pellet e il surnatante dovrebbe essere chiaro. La successiva completa risospensione del pellet è vitale per assicurare il massimo recupero dell'acido nucleico.

16. La non corretta velocità di centrifugazione può causare la formazione di pellet che risulterà difficile da risospendere. La non corretta risospensione del pellet può causare un errore nella quantificazione. In questi casi fare riferimento a "ottimizzazione della centrifugazione" indicato nel manuale d'uso..

17. Prestare attenzione per evitare le contaminazioni crociate tra i campioni attraverso l'uso di puntali monouso e cambiandoli dopo ogni campione..

18. Prevenire le contaminazioni crociate tra i reagenti del kit usando puntali monouso e cambiandoli ogni volta..

19. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza indicata all'esterno del contenitore e sulle etichette interne (tubi)

20. Manipolare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni di plasma umano dovrebbero essere manipolati al livello 2 di Sicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, U.S in accordo con quanto riportato dall' Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984

21. Conservare ed estrarre materiali positivi (campioni, controlli e ampliconi) separatamente dagli altri reagenti e utilizzare una stanza separata per la loro manipolazione.

22. Sciogliere i reagenti liofilizzati con la corretta quantità, indicata sull'etichetta, di acqua per biologia molecolare (componente C codice:ALL/C) fornita nel kit

23. Realizzare tutte le operazioni più velocemente sia possibile.

24. Il flusso di lavoro nel laboratorio deve procedere in modo unidirezionale, partendo dall'area di estrazione e spostandosi verso quella di amplificazione ed elaborazione dati. Non riportare campioni, strumenti e reagenti nell'area dove sono stati realizzati i precedenti passaggi.

25. Si raccomanda l'uso di plastica monouso nella preparazione dei componenti liquidi o nel trasferire i componenti nelle postazioni di lavoro, con la finalità di evitare contaminazioni crociate.

26. I rifiuti prodotti durante l'uso del kit devono essere smaltiti in accordo con le direttive nazionali e le leggi concernenti i rifiuti di sostanze chimiche e biologiche di laboratorio. In particolare, rifiuti liquidi generati dalle procedure di smaltimento, dai residui di controlli e dai campioni devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo e precedentemente inattivato. Non mettere in contatto i rifiuti provenienti dall'estrazione con la candeggina..

27. Schizzi accidentali provenienti dai campioni e dalle operazioni devono essere assorbiti con fogli di carta imbevuta con candeggina e quindi con acqua. I fogli di carta dovranno essere smaltiti in appositi contenitori destinati ai rifiuti di laboratorio/ospedalieri.

28. Altri materiali di rifiuto derivanti dall'uso del kit (esempio: puntali usati per i campioni) dovrebbero essere maneggiati come potenzialmente infettivi e smaltiti secondo le direttive nazionali e le leggi concernenti i rifiuti di laboratorio.

29. Monitorare il laboratorio per la presenza di prodotto di amplificazione. Si raccomanda di controllare la superficie del laboratorio e la strumentazione per la contaminazione.

## H. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue è asetticamente raccolto attraverso il prelievo e il plasma è preparato utilizzando le tecniche standard per la preparazione dei campioni per le analisi cliniche di laboratorio.

2. I campioni di sangue intero periferico per l'estrazione del DNA devono essere raccolti in EDTA in accordo alle procedure di laboratorio, trasportati e conservati a +2/+8°C per un periodo massimo di 3 giorni. Non congelare i campioni di sangue intero periferico al fine di evitare la lisi cellulare e la perdita della carica virale..

3. Nessuna interferenza è stata osservata nella preparazione dei campioni con citrato, EDTA.

Attenzione: l'eparina ( $\geq 10$  IU/ml) interferisce con le reazioni di PCR.

I campioni, che sono stati raccolti nei tubi contenenti l'eparina come anticoagulante, non dovrebbero essere usati. Quindi i campioni di pazienti eparinizzati non devono essere usati.

4. Evitare qualunque aggiunta di conservanti ai campioni.

5. I campioni devono essere chiaramente identificati con codice o nome con la finalità di evitare la non corretta interpretazione dei risultati.

6. Campioni emolizzati (rossi) e iperlipemici ("lattescenti") devono essere eliminati, poiché possono generare risultati errati. I campioni contenenti residui di fibrina o particelle pesanti o filamenti microbici e corpuscoli dovrebbero essere eliminati poiché potrebbero causare risultati errati.

7. I campioni di plasma con elevate quantità di lipidi possono causare scarso o nessun recupero di acido nucleico. In questo caso il pellet sarà piccolo o non presente del tutto. Usare campioni freschi e seguire la guida alla risoluzione dei problemi presente nel manuale d'uso.

8. Il plasma, se non usato immediatamente, deve essere aliquotato e conservato a -20°...-80°C dopo la raccolta. I campioni possono essere congelati a -20°...-80°C dopo la raccolta. I campioni non dovrebbero essere congelati/scongelati più di una volta poiché questo può influire sul risultato.

9. I campioni di plasma per l'estrazione del DNA devono essere raccolti in accordo alle comuni procedure di laboratorio, trasportati e conservati a +2/+8°C per un periodo massimo di 4 ore. I campioni di plasma possono essere conservati congelati a -20°C per un periodo di 30 giorni o -70°C per un periodo più lungo. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento

10. Si raccomanda, per un'ottimale conservazione dei campioni, di suddividerli in diverse aliquote (volume minimo 500 µl, quello necessario per una singola sessione di estrazione) e conservarli congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni o -70°C per un tempo più lungo.

11. **Ricordare che esiste un trattamento pre-analitico del campione di plasma. Tutti i campioni devono essere diluiti 1:2 in tampone fosfato (500 µl campione + 500 µl PBS) prima dell'estrazione**

12. La mancanza del passaggio sopra indicato causa un errore di quantificazione

13. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione con lo scopo di evitare possibili cause di degradazione dell'acido nucleico.

## I. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

### Master Mix:

Componente A. Pronto all'uso. Miscelare bene sul vortex prima dell'uso.

**AVVERTENZE:** il Componente A è sensibile alla luce. Proteggerlo dalla esposizione alla luce.

### Primers/Probes:

#### Componente B.

- Centrifugare il tubo per 1 min a 12000 rpm
- Aprire attentamente il tappo del tubo evitando la dispersione della polvere.
- Sciogliere omogeneamente il Componente B liofilizzato con il volume di acqua (Componente C codice ALL/C) indicato sull'etichetta del tubo.
- Mantenerlo disciolto sul banco per almeno 15 min a temperature ambiente (15°C<RT<25°C).
- Miscelarlo brevemente evitando la formazione di schiuma.

**AVVERTENZE:** Componente B è sensibile alla luce. Proteggerlo dalla forte esposizione alla luce.

### ACQUA MG:

Componente C. Pronto all'uso

### NTC o Controllo Negativo:

ALL/NTC. Pronto all'uso.

### Curva Standard:

#### Componente STD.

- Centrifugare il tubo per 1 min a 12000 rpm.
- Aprire attentamente il tappo del tubo evitando la dispersione della polvere.
- Sciogliere il Componente HBV/STD liofilizzato con il corretto volume di acqua (Component C coded: ALL/C) come indicato sull'etichetta del tubo.
- Mantenerlo disciolto sul banco per almeno 15 min a temperatura ambiente (15°C<RT<25°C).
- Miscelare brevemente evitando la formazione di schiuma.
- Allestire 5 tubi privi di nucleasi per la preparazione della curva standard.
- Realizzare diluizioni 1:10 nel **Componente C** (acqua MG) per ottenere la curva standard come nella tabella sotto:

Preparazione curva Standard		
STD	Calibratore 200000 (UI/µl)	Volume di Componente C (acqua MG) come indicato sull'etichetta delle provette
STD 1	20000 (UI/µl)	10 µl (STD) + 90 µl Componente C (acqua MG)
STD 2	2000 (UI/µl)	10 µl (STD) + 90 µl Componente C (acqua MG)
STD 3	200 (UI/µl)	10 µl (STD) + 90 µl Componente C (acqua MG)
STD 4	20 (UI/µl)	10 µl (STD) + 90 µl Componente C (acqua MG)
STD 5	2 UI/µl	10 µl (STD) + 90 µl Componente C (acqua MG)

### Controllo Interno:

#### Componente I.C.

- Centrifugare il tubo 1m in a 12000 rpm
- Aprire attentamente il tappo del tubo evitando la dispersione della polvere.
- Sciogliere omogeneamente il Componente IC liofilizzato con il volume di acqua (Componente C codice: ALL/IC) indicato sull'etichetta del tubo.
- Mantenerlo disciolto sul banco per almeno 15 min a temperatura ambiente (15°C<RT<25°C).
- Miscelarlo brevemente evitando la formazione di schiuma.

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

1. Le **micropipette** devono essere calibrate per garantire il corretto volume richiesto dal saggio e devono essere sottoposte a regolare decontaminazione (comune alcool, soluzione al 10% di candeggina, disinfettanti ospedalieri) di quelle parti che potrebbero accidentalmente venire in contatto con il campione. Esse inoltre dovrebbero essere regolarmente mantenute con lo scopo di avere una precisione dell'1% e una precisione del +/-5%. La decontaminazione degli schizzi o residui dei componenti del kit dovrebbe essere effettuata regolarmente.
2. **Dispositivo di estrazione:** il kit HBVDNAQT.CE va usato in combinazione con il kit QIAamp UltraSense virus Codice: 53706 (QIAGEN). L'utilizzatore finale deve seguire strettamente le istruzioni d'uso fornite dal produttore.
3. **Termociclatori Real-Time:** Il kit va usato in combinazione con i termociclatori Real Time ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) software SDS versione 1.3.1, MX3000P® software MxPro version 4.01 (Stratagene™). Gli utilizzatori finali devono strettamente seguire le istruzioni d'uso degli strumenti forniti dal produttore.

### M. OPERAZIONI E CONTROLLI PRE- ANALITICI

1. Controllare la data di scadenza del kit stampata sull'etichetta esterna del contenitore. Non usare se scaduto.
2. Controllare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle visibili o aggregati. Verificare che i tubi dei componenti liofilizzati sia presente un aggregato ben formato. Controllare che nessuna rottura avvenuta nel trasporto e nessuna fuoriuscita di liquido sia presente all'interno della scatola.



- Sciogliere i componenti liofilizzati con la corretta quantità di Componente C (acqua per Biologia Molecolare) come indicato sull'etichetta del tubo.
- Accendere il termociclatore, controllare le impostazioni e assicurarsi di utilizzare il protocollo corretto.
- Seguire rigorosamente i manuali degli strumenti forniti dai produttori per la corretta impostazione dei Termociclatori Real-Time
- Controllare che le micro pipette siano impostate al volume richiesto.
- Controllare che la restante strumentazione sia disponibile e pronta all'uso.
- In caso di problemi non proseguire con il test e avvisare il supervisore.

## N. PROCEDURA D' ANALISI

Il test deve essere condotto in accordo a quanto riportato qui di seguito.

### N.1 Estrazione DNA virale

L'estrazione del DNA genomico di HBV deve essere realizzato esclusivamente in associazione con il seguente kit:

Materiale	Descrizione	codice Kit	Produttore
Plasma	QIAamp UltraSense virus®	53706	Qiagen™

- Prima di iniziare, preparare un numero di provette corrispondente al numero di campioni che devono essere estratti.
- Aggiungere 500 µl di tampone fosfato sterile (PBS) in ciascuna provetta.
- Aggiungere 500 µl di campione in modo che il volume finale sia 1 ml.
- Aggiungere 10 µl di ALL/IC. Il Controllo Interno (IC) viene aggiunto in questa fase per verificare che l'estrazione sia avvenuta correttamente.
- Procedere con l'estrazione come indicato nel manuale d'uso.
- Il volume di eluizione raccomandato è 70 µl.
- L'isolamento del DNA deve essere eseguito secondo le istruzioni del produttore e seguendo le nostre raccomandazioni (si veda la Sezione H). La seguente tabella riassume il processo pre-analitico.

Trattamento pre-analitico				
Codice campione	Volume PBS	Volume campione	volume ALL/IC	Volume totale
Codice assegnato	500 µl	500 µl	10 µl	1010 µl

Il DNA estratto dal campione e non utilizzato nella corsa deve essere congelato (-20°C...-80°C).

### N.2 Impostazione della reazione

Il kit **HBVDNAQT.CE** deve essere usato esclusivamente in combinazione con ABI PRISM 7500 standard (Applied Biosystem) software SDS versione 1.3.1, MX3000P® software MxPro version 4.01 (Stratagene™).

#### N.2.1 Preparazione della reazione di PCR

**Importante:** Un esempio di schema di dispensazione è riportato nella sezione O. Per favore riferirsi ad essa prima di iniziare a leggere le istruzioni qui sotto.

- Preparare i componenti come descritto nella Sezione I;
- Preparare il numero richiesto di tubi di reazione o piastra da 96-pozzetti per i campioni in valutazione e la curva Standard (preparata come descritto nella sezione I);

**Nota Importante:** Utilizzare soltanto tubi ottici o micropiastre consigliate dai produttori di termociclatori Real-Time PCR.

- Considerare che i campioni, quando possibile, dovrebbero essere testati in duplicato o triplicato

- Includere almeno 1 tubo per l' NTC ( controllo negativo);
- Preparare la **Mix di amplificazione** per **Campioni, NTC e curva standard** come indicato di seguito:

Tab 1- Controllo Interno (IC) come controllo di Amplificazione

Preparazione della Mix di amplificazione			
Numero di Reazioni		1 rxn	10 rxn
<b>A</b>	Master mix	12,5 µl	125 µl
<b>B</b>	Primers/probes	2 µl	20 µl
<b>I.C.</b>	Controllo Interno	0,5 µl	5 µl
<b>Tot vol.</b>		<b>15 µl</b>	<b>150 µl</b>

Tab 2- Controllo Interno (IC) come controllo di Estrazione e controllo di Amplificazione

Preparazione della Mix di amplificazione			
Numero di Reazioni		1 rxn	10 rxn
<b>A</b>	Master mix	12,5 µl	125 µl
<b>B</b>	Primers/probes	2 µl	20 µl
<b>ALL/C</b>	Acqua MG	0,5 µl	5 µl
<b>Tot vol.</b>		<b>15 µl</b>	<b>150 µl</b>

In questo caso (Tab 2) il controllo interno (IC) è già incluso nel campione prima dell'estrazione.

#### N.2.2 Procedura di amplificazione

- Dispensare 15 µl di mix di amplificazione in ogni tubo di reazione o piastra
- Aggiungere 10 µl di **Campione, NTC e curva Standard** ai tubi di reazione
- Centrifugare brevemente i tubi di reazione a 2000rpm
- Non lasciare i tubi di reazione a temperatura ambiente (RT) per più di 30 minuti ed esposti alla luce.
- Coprire adeguatamente i tubi
- Caricare i tubi nel termoblocco del termociclatore Real-Time
- Dopo avere effettuato le impostazioni descritte nella sezione N3 (Programmazione dello strumento) iniziare la corsa.

**Note importanti:** i componenti liofilizzati dopo lo scioglimento nel componente C (acqua MG) sono stabili per non più di 3 ore a 2°C...8°C.

Alla fine della giornata di lavoro smaltire adeguatamente il materiale residuo dei Punti di diluizione STD.

Il volume non utilizzato di Componente B, STD e IC può essere aliquotato e congelato a -20°C. Le aliquote devono essere scongelate soltanto una volta e utilizzate secondo quanto indicato nella **Sezione E**

### N.3 Programmazione degli strumenti

Per programmare gli strumenti riferirsi ai Manuali di Istruzioni (Absolute Quantitation Guidelines) forniti dai produttori.

**Note importanti:** Per Mx3000P (Stratagene) porre attenzione all'impostazione del set "filter set gain" come indicato sotto;

$$ROX = x1; FAM = x8; JOE = x1$$

#### N.3.1 Profilo termico

Il profilo termico della reazione è riportato nella tabella qui sotto:

Fase	Ciclo	Temp.	Durata
1	1	50°C	2 min
1	1	95°C	15 min
2	45	95°C	15 sec
		60°C(*)	1 min

**NOTA IMPORTANTE** :(\*) step per la raccolta dei dati

**Avvertenza:** Prestare attenzione nell'impostare il termociclatore Real-Time con il corretto Profilo Termico seguendo il manuale degli strumenti forniti dai produttori.

### N.3.2 Selezione dei rilevatori

Seguendo i manuali d' istruzioni dei termociclatori Real-Time (ABI 7500, and MX3000P®) selezionare i rilevatori (detectors) riportati nella tabella sotto:

Determinazione	Reporter	Quencher
HBV	FAM	Non Presente
Controllo Interno (I.C.)	JOE	Non Presente
Passive Reference	ROX	Non Presente

### O. SCHEMA DEL TEST

Un esempio di schema di dispensazione per l'Analisi Quantitativa è riportato di seguito:

	Piastra/Tubi			
	1	2	3	.
A	STD 1			
B	STD 2			
C	STD 3			
D	STD 4			
E	STD 5			
F	NTC			
G	Campione 1			
H	Campione2			

Legenda: NTC = Controllo Negativo, STD 1,2,3,4,5 = HBV DNA Curva Standard, campione 1,2, = Campioni in valutazione

### P. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

#### P.1 Impostazioni Pre-analisi

Prima di iniziare l'interpretazione dei dati:

- Impostare il "Baseline" (il livello di fondo della fluorescenza) come riportato nella tabella sotto:

"Baseline"	
ABI™ PRISM 7500SDS	<b>Baseline Manuale:</b> Start cyler=3 End cyler=10
MX3000P® (Stratagene™)	<b>Adaptive baseline</b> Nota importante: Non usare Mx4000 v1.00 to v3.00 algorithm

- Impostare manualmente il "Threshold" di FAM/JOE

"Threshold"	FAM	JOE/VIC
ABI™ PRISM 7500SDS	0.15	0.1
MX3000P® (Stratagene™)	0.15	0.03

#### P.2 Analisi dei dati

Realizzare un controllo sul calibratore STD 1 ogni volta che viene usato il kit con lo scopo di verificare se il suo valore di Ct è quello atteso e riportato nella tabella sotto.

Controllo FAM	ABI7500SDS; Mx3000P
STD1 (20000 UI/μl)	19≤C(Threshold Cycle)≤22

Inoltre i valori di Slope e R<sup>2</sup> vanno controllati con lo scopo di verificare la qualità della corsa. I seguenti requisiti devono essere soddisfatti.

Controllo FAM	Requisiti
Slope	-3.1 < Slope < -3.9

Controllo FAM	Requisiti
Efficienza	R <sup>2</sup> > 0.98

### Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Per ogni campione sono considerati validi per il rilevamento di HBV i valori di fluorescenza di FAM (valore Ct positivo/negativo) e di JOE (Controllo Interno) descritti nella tabella sottostante:

FAM HBV	Controllo Interno JOE	Risultato del test
CAMPIONE POSITIVO	+	CORRETTO
	-	CORRETTO**
CAMPIONE NEGATIVO	Ct<42	CORRETTO
	Ct>42 o indeterminato	NON VALIDO***

#### Nota importante

(\*\*) Un'iniziale concentrazione di HBV DNA alta in un campione (FAM positivo) può determinare una RIDUZIONE o ASSENZA del segnale fluorescente del Controllo Interno IC dovuto ad una competizione tra i reagenti.

(\*\*\*) In questo caso si sono verificati problemi durante lo step di amplificazione (amplificazione inefficiente o assente) o durante lo step di estrazione (presenza di inibitori) che possono portare ad un risultato incorretto o falso negativo. Perciò è necessario ripetere l'estrazione con un nuovo campione fresco.

Per ogni campione positivo sottoposto ad estrazione e rilevamento con il kit codice HBVDNAQT.CE una corretta quantificazione della carica virale per HBV può essere applicata come riportato nella tabella sotto:

ABI™ PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P®	
Campione HBV risultati (UI/ml)	HBV carica virale (UI/ml)
Quantità > 2.0E+07	HBV carica virale >2.0E+07
5.0E+01 < Quantità ≤ 2.0E+07	<b>QUANTIFICAZIONE</b>
Quantità < 5.0E+01	HBV carica virale < 5.0E+01

**Nota importante:** Per la quantificazione dei campioni riferirsi alla sezione R

Il risultato ottenuto con questo prodotto deve essere interpretato considerando le osservazioni cliniche e altri marcatori di laboratorio inerenti il paziente.

Sono possibili i seguenti risultati:

#### Tabella per la risoluzione problemi

	FAM	JOE	Risultato	CONTROLLO
CAMPIONI ignoti	+	+/-	RISULTATO CORRETTO <u>Positivo</u>	<b>IMPORTANTE:</b> Un'iniziale concentrazione di HBV DNA (segnale FAM Positivo) può portare ad una RIDUZIONE o ASSENZA del Segnale Fluorescente del Controllo Interno dovuto alla competizione tra i reagenti .
CAMPIONI ignoti	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Inibizione, errore	1. che i componenti siano stati preparati correttamente 2. che nessun errore sia stato fatto nell'esecuzione

			nella procedura o non funzionamento degli strumenti	del test 3. che la selezione dei rilevatori FAM per la rilevazione di HBV e JOE per la rilevazione di IC siano corretti 4. che l'analisi sia stata realizzata con le corrette impostazioni per lo strumento 5. che il kit sia stato conservato correttamente 6. che il tubo non sia stato contaminato con nessun potenziale inibitore della PCR 7. che le procedure di estrazione sia state eseguite correttamente come indicato nella <b>Sezione N</b>
CAMPIONI ignoti	-	+	RISULTATO CORRETTO <i>Negativo</i>	
STD	+	+/-	RISULTATO CORRETTO	<b>IMPORTANTE:</b> Un'iniziale concentrazione di HBV DNA (segnale FAM Positivo) può portare ad una RIDUZIONE o ASSENZA del Segnale Fluorescente del Controllo Interno dovuto alla competizione tra i reagenti .
STD	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Errore di pipettamento o nella procedura	1. che i componenti siano stati preparati correttamente 2. che nessun errore sia stato fatto nella procedura del test 3. che la selezione dei rilevatori sia corretta. FAM per la rilevazione di HBV e JOE per la rilevazione di IC 4. che l'analisi della corsa sia stata realizzata con le corrette impostazioni per lo strumento 5. che il kit sia stato conservato correttamente 6. che il tubo non sia stato contaminato con nessun potenziale inibitore della PCR
STD	-	+	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Errore di pipettamento o nella procedura	1. che i componenti siano stati preparati correttamente 2. che nessun errore sia stato fatto nell'esecuzione del test 3. che la selezione dei rilevatori sia corretta FAM per la rilevazione di HBV e JOE per la rilevazione di IC 4. che l'analisi sia stata realizzata con le corrette impostazioni per lo strumento 5. che il kit sia stato conservato correttamente
NTC	-	+	RISULTATO CORRETTO	

NTC	+	+	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Contaminazione	1. che i componenti siano stati preparati correttamente 2. che nessun errore sia stato fatto nell'esecuzione del test 3. che l'ambiente di lavoro e gli strumenti siano decontaminati ad intervalli regolari 4. che il kit sia stato conservato correttamente
NTC	+	-	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Contaminazione	1. che i componenti siano stati preparati correttamente 2. che nessun errore sia stato fatto nell'esecuzione del test 3. che l'ambiente di lavoro e gli strumenti siano decontaminati a intervalli regolari 4. che il kit sia stato conservato correttamente

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti RISULTATO CORRETTO di cui sopra, procedere con la sezione successiva.  
Se uno o più dei problemi descritti nella tabella sopra è accaduto, dopo il controllo, segnalare eventuali problemi al supervisore per ulteriori azioni

## R. QUANTIFICAZIONE

I calibratori STD sono trattati come campioni già estratti e usati nello stesso volume di 10 µl.  
Per costruire la curva standard, tutti e cinque i calibratori standard devono essere usati con la specifica concentrazione.  
Tutti i calibratori STD sono espresso in UI/µl.  
La seguente equazione deve essere applicata per calcolare la **concentrazione iniziale** dei campioni sottoposti ad indagine:

$$\text{Risultato (UI/ml)} = \frac{\text{Risultato ottenuto (UI/}\mu\text{l)} \times \text{volume eluizione}(\mu\text{l})}{\text{Volume campione (ml)}}$$

**Nota importante:** \*come indicato nelle Sezioni H e N il volume iniziale di campione è di 0.5 ml .

\*\* I campioni quantificati possono essere espresso sia in UI/ml sia in copie/ml. Il fattore di conversione è 2.5 (1UI/ml=2.5 copie/ml).

### Esempio:

Volume di campione usato per l'estrazione = 0.5 ml  
Risultato ottenuto (UI/µl)= 20  
Volume di eluizione=70 µl

$$\text{Risultato (UI/ml)} = \frac{20 \text{ (UI/}\mu\text{l)} \times 70 \text{ (}\mu\text{l)}}{0.5 \text{ (ml)}}$$

Risultato (UI/ml)= 2800

Risultato (copie/ml) = Risultato (UI/ml) x 2.5 = 2800 x 2.5 = 7000

**Note importanti :**

1. L'interpretazione dei risultati dovrebbe essere fatta sotto la supervisione del responsabile del laboratorio per ridurre il rischio di errori di giudizio o interpretazioni non corrette.
2. Quando i risultati del test sono trasmessi dal laboratorio ad un centro informatico, deve essere posta attenzione per evitare trasferimenti di dati errati.

**S. PRESTAZIONI**

La valutazione della validità del sistema è stata condotta in accordo a quanto riportato nelle Specifiche Tecniche Comuni o CTS (art. 5, Capitolo 3 della Direttiva IVD 98/79/EC).

La valutazione della validità del sistema è stata realizzata presso i laboratori della DiaPro su materiali forniti dalla Fondazione Irccs Cà Granda-Ospedale Ospedale Maggiore Policlinico Milano, Italia.

**S.1 SENSIBILITA' ANALITICA**

La sensibilità analitica di un test molecolare quantitativo si riferisce alla più piccola quantità di marcatore bersaglio che può essere correttamente rilevato

Nel contesto delle CTS CE IVD essa può essere espressa come : **limite di rilevazione** o **limite di quantificazione:**

**Limite di rilevazione (LOD):** è la più piccola concentrazione di bersaglio che può essere rilevata con il 95% di probabilità.

Nel kit codice HBVDNAQT.CE il **LOD** è stato determinato testando diluizioni seriali della curva standard a concentrazioni limitanti che furono preparate in plasma negativo per HBV.

Ogni diluizione è stata estratta e amplificata. Un totale di 24 replicati, per ognuno, è stata testata in tre differenti corse. I risultati furono analizzati con il programma PriProbit vers. 1.63 per ottenere la concentrazione di HBV DNA rilevata con il **95%** di probabilità. Poiché HBVDNAQT.CE può essere usato in combinazione con differenti strumenti, abbiamo definito il LOD per ognuno di essi. I risultati sono riportati qui di seguito.

Limite di rilevazione (LOD)	
ABI™PRISM® 7500 SDS	10 UI/ml
(Stratagene™ ) MX3000P®	30 UI/ml

**S.1.1 Range dinamico e Linearità**

Il **limite di quantificazione** è determinato attraverso la **Linearità** o il **Range dinamico**.

La **Linearità** è la misura del livello a cui la curva standard si approssima ad una linea retta ed è rappresentata dal valore della **Slope**.

Il **Range dinamico** è l'estensione delle concentrazioni dei punti standard per i quali il valore finale ottenuto (Ct ciclo soglia) dal sistema è direttamente proporzionale alla concentrazione per ognuno di loro. Le estremità del range di misura sono il più basso ed il più alto limite di quantificazione (**limite di quantificazione**).

Nel kit codice HBVDNAQT.CE la linearità (misura analitica) è stata determinata testando in tre replicati differenti concentrazioni di curva standard partendo da 2.0E+08 UI/μl fino a 6.24E-0.2 UI/μl.

Le diluizioni seriali sono state calibrate verso il the 2<sup>nd</sup> WHO International Standard per l'epatite B virus (codice:97/750). I risultati per ognuna di loro sono riportati nella tabella 1.

**Tabella 1**

Limite di quantificazione (misura analitica)		
strumento	Limite superiore	Limite inferiore
ABI™PRISM® 7500 SDS	2.0+08 UI/ μl	2.5E-0.1 UI/ μl
(Stratagene™ ) MX3000P®	2.0+08 UI/ μl	2.5E-0.1 UI/ μl

Inoltre i limiti superiore ed inferiore di quantificazione sono stati determinati considerando la fase di estrazione usando il QIAamp Ultrasense virus Kit.

In un primo momento sono state preparate diluizioni seriali dei punti della curva standard in un pool di plasma negativo partendo da 2.0E+07 UI/ml to 5.0E+01 UI/ml, ogni diluizione è stata analizzata con

due lotti. Secondariamente abbiamo analizzato il pannello di quantificazione HBV DNA (Acrometrix) seguendo la stessa procedura.

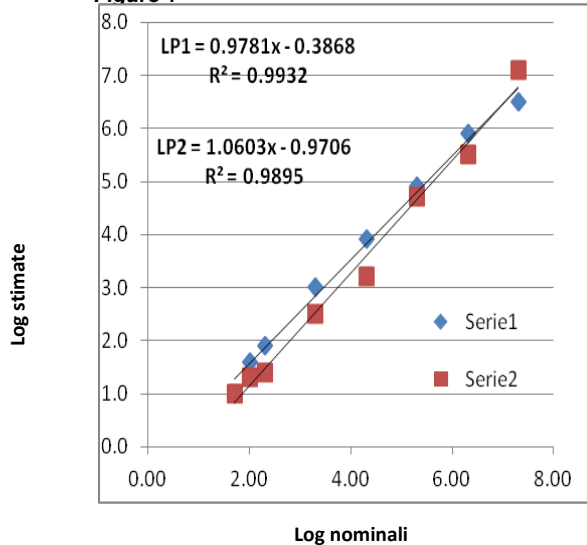
I Limiti di quantificazione sono riportati nella tabella 2:

**Tabella 2**

Limite di quantificazione		
strumento	Limite superiore	Limite inferiore
ABI™PRISM® 7500 SDS (Stratagene™ ) MX3000P®	2.0+07 UI/ ml	5.0E+01 UI/ml

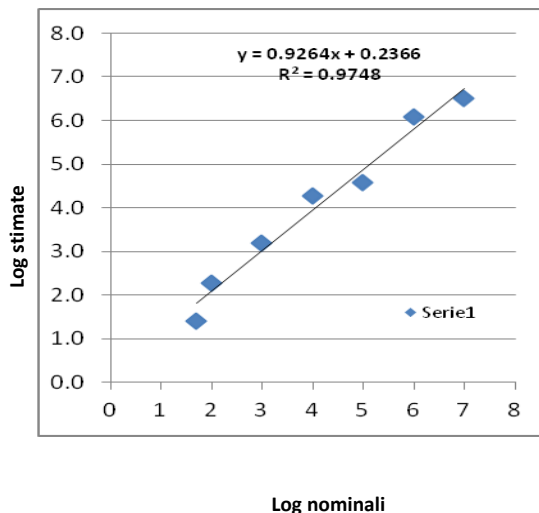
La figura sotto riportata si riferisce ad ABI 7500SDS e alla **curva standard in plasma negativo**

**Figure 1**



La figura 2 riportata sotto si riferisce a Mx3000P e a **HBV DNA Quantification panel (Acrometrix)**.

**Figure 2**



Il coefficiente R<sup>2</sup> mostra una buona correlazione. Risultati simili sono stati ottenuti sugli altri strumenti utilizzati..

Il limite di quantificazione superiore per i campioni positivi è 7.3log (2.0+07 UI/ml) e il limite inferiore di quantificazione è 1.69log (5.0+01 UI/ml).

**S.2 SPECIFICITA' ANALITICA**

La specificità analitica è la capacità di un metodo diagnostico di rilevare e quantificare solo il marcatore bersaglio.

La specificità analitica del kit HBV DNA è stata studiata come segue:



1. Il Set primer/probe è stato scelto analizzando le sequenze genomiche bersaglio con un appropriato software (Primer Express v.3.0" fornito da Applied Biosystem Inc.).
2. Il Set primer/probe e la sequenza genomica bersaglio sono state controllate con il software "BLAST", con lo scopo di controllare se qualcuna delle sequenze nucleotidiche depositate nella banca genomica mondiale ha qualche omologia con HBV, e attraverso il software "ClustalX" con lo scopo di confrontare le sequenze del genoma bersaglio di differenti genotipi di HBV.
3. La specificità è stata ottimizzata attraverso la selezione di stringenti condizioni di reazione.
4. Plasmidi provenienti da pazienti con infezioni dovute ad organismi potenzialmente interferenti sono stati ottenuti da un Laboratorio di Riferimento e testati.

## T. RILEVAZIONE E QUANTIFICAZIONE DEI GENOTIPI PRINCIPALI DI HBV

In accordo alle CTS il kit codice HBVDNAQT.CE fu valutato per la ricerca dei genotipi e l'efficienza di quantificazione. Per l'analisi furono testati i genotipi inclusi nel pannello QCMD Genotyping 2010 (HBVGT10) e 2011 (HBVGT11).

Il kit codice HBVDNAQT.CE è capace di rilevare tutti i genotipi inclusi nei pannelli eccetto il Genotipo H (rilevato con minore efficienza dell'atteso)

Il kit codice HBVDNAQT.CE fu anche valutato per la diluizione dei genotipi principali (A,B,C,a D) partendo da 10000 copie/ml (4000 UI/ml) fino a 100 copie/ml (40 UI/ml).

Nel grafico è mostrata l'analisi di regressione lineare con i risultati.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Numero di campioni	Organismo	Risultato
12	HIV	negativo
10	HCV	negativo
7	CMV	negativo
1	Enterovirus	negativo
1	VZV	negativo
1	HH6	negativo
1	HSV1	negativo
1	HSV2	negativo
1	EBV	negativo

### S.3 SENSIBILITA' E SPECIFICITA' DIAGNOSTICA

#### S.3.1 Specificità Diagnostica:

La specificità diagnostica è la probabilità che il dispositivo dia un risultato negativo in assenza di un marcatore bersaglio. Quindi il vero campione negativo è un campione noto per essere negativo per il marcatore bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo.

VERO NEGATIVO	100
FALSO POSITIVO	0
TOTALE CAMPIONI	100
<b>SPECIFICITA' %</b>	<b>100</b>

Sulla base dei risultati ottenuti la Specificità Diagnostica per il kit HBVDNAQT.CE è del 100%, per tale motivo il sistema soddisfa i criteri di accettabilità ( $\geq 99.5\%$ ).

#### S.3.2 Sensibilità Diagnostica

La **Sensibilità Diagnostica** è la probabilità che il dispositivo dia un risultato positivo in presenza di un marcatore bersaglio. Quindi un campione vero positivo è un campione noto per essere positivo per il marcatore bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo.

Nel kit codice HBVDNAQT.CE questo parametro è stato studiato analizzando campioni di plasma positivi HBV DNA forniti da un Laboratorio di riferimento e quindi è stata calcolata la percentuale (%) di campioni positivi, i campioni positivi sono stati testati positivi con il kit in uso, **Abbott Real Time HBV**, nel laboratorio che li ha forniti.

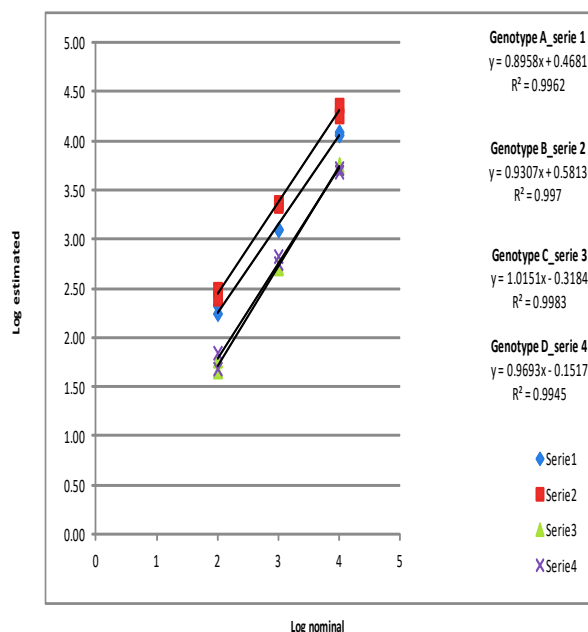
#### Campioni positivi per HBV DNA

VERO POSITIVO	100
FALSO NEGATIVO	0
TOTALE CAMPIONI	100
<b>SENSIBILITA' %</b>	<b>100</b>

Inoltre la Sensibilità Diagnostica del sistema fu testata usando QCMD Panel (HBVDNA08, HBVDNA10A, HBVDNA11A) in duplicato in differenti corse. I risultati ottenuti furono coerenti con i risultati attesi.

Sulla base dei risultati ottenuti la Sensibilità Diagnostica del sistema è stata calcolata del 100%

<b>Sensibilità Diagnostica</b>	100 %
<b>Specificità Diagnostic</b>	$\geq 99.5\%$



Come mostrato li coefficiente di correlazione si estende da 0.994 a 0.998.

## U. PRECISIONE

La precisione dimostra il livello di affidabilità del sistema. Ogni procedura di misura ha una variazione intrinseca random detta "random error". L'errore casuale non ha un valore ma è determinato dalla dispersione della misura espressa come deviazione standard (DevST) e come coefficiente di variazione (CV%). In genere la precisione di un sistema si riferisce alla concordanza tra misurazioni ripetute dello stesso materiale.

Nel kit codice HBVDNAQT.CE, la **precisione** fu espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay. Furono testati nella stessa corsa (intra-assay) ed in tre corse diverse (inter-assay) tutti e 5 i punti della curva standard in 8 replicati per ognuno.

La variabilità intra e inter-assay venne quindi calcolata.

In assenza di parametri stabiliti nella Direttiva Europea per gli IVD CTS abbiamo identificato i seguenti valori di accettabilità per HBV DNA:

- Intra-Assay Coefficiente di Variazione (CV%)  $\leq 10\%$ .**
- Inter-Assay Coefficiente di Variazione (CV%)  $\leq 10\%$ .**

## V. LIMITI DEL TEST

1. Solo per uso diagnostico "in vitro".
2. Prima di utilizzare il kit si raccomanda di leggere attentamente e comprendere l'inserito.
3. Attenersi strettamente al protocollo è necessario al fine di ottenere risultati del test affidabili.

4. Il funzionamento ottimale per questo test richiede un' adeguata raccolta, conservazione, trasporto e manipolazione dei campioni e dei reagenti
5. Il kit va usato solo in combinazione con campioni di plasma coerentemente ai nostri consigli.
6. L'ambiente del laboratorio, l'attrezzatura, la strumentazione ed i reagenti devono essere controllati attraverso la buona pratica di laboratorio evitando contaminazioni durante tutti i passaggi partendo dall'estrazione fino all'amplificazione. Risultati bassi positivi possono ottenersi da contaminazioni crociate durante la manipolazione dei campioni con alte copie di DNA. In ogni caso, secondo le linee guida di trattamento è necessario un incremento di 1 log per avere un impatto sulla gestione del paziente.
7. Inoltre le linee guida di trattamento richiedono che ci siano due elevate misurazioni consecutive prima di modificare il trattamento terapeutico.
8. Seguire un flusso di lavoro sia attraverso un accurato pipettamento dei campioni/reagenti sia un' adeguata impostazione degli strumenti termociclatori.
9. Porre attenzione quando si inseriscono le concentrazioni degli standard durante la preparazione del test. Si consiglia di esprimere le concentrazioni degli standard in UI/ul come indicato nella **Sezione I**
10. Un risultato positivo ha ampie implicazioni mediche, sociali, psicologiche ed economiche
11. Si raccomanda che la riservatezza, la consulenza e la valutazione medica appropriata deve essere considerata come un aspetto essenziale della sequenza del test











Weinberger, Elisabeth Wiedenmann, Stephan Bohm, Wolfgang Jilg. Journal of Virological Methods 2000;85:75-82

14. Real-Time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus Genotype A to G. Tania M. Wezel, Wendell J. Miley, Thomas L. Parks, James J. Goedert, Denise Whitby, Betty A. Ortiz-Conde. Journal of Clinical Microbiology 2006;44:3325-3333

## Z.BIBLIOGRAFIA

1. The new EASL guidelines for the management of chronic hepatitis B infection adapted for Swiss physicians. Florian Bihl, Mahnaz Alaei, Francesco Negro. Swiss med wky 2010 ;140(11-12):154-159
2. DNA-guided hepatitis B treatment, viral load is essential, but not sufficient. Rafael Bárcena Marugán, Silvia Garcia Garzon. World J Gastroenterology 2009;28:15(4):423-430
3. Ruolo degli acidi nucleici e marcatori immunologici nella diagnosi e gestione del portatore cronico di virus epatitici maggiori (B,C,D). Ferruccio Bonino, Maurizia Rossana. Ligand assay 11 (4) 2006:319-32M
4. Real time-PCR HBV-DNA Analysis: Significance and first experience in armed forces. Col GS Chopra, sm\*, Lt Col PK Gupta+, Col AC Anand, vsm#, Col PP Varma, vsm\*\*, Col V Nair, vsm++Lt Gen Ramji rai, avsm, vsm, phs#. MJAFI 2005;65:234-237
5. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real time fluorescence PCR assay. R.Jardi, F.Rodriguez, M.Buti, X. Costa, M.Cotrina, A.valdes, R.Galimany, R.Esteban and J.Guardia. Journal of Viral hepatitis 2001,8,465-471
6. Treatment of chronic hepatitis B: recommendations from an Italian workshop. Carosi G., Rizzetto M. Gig Liver Dis. 2008;40:603-317
7. Efficacy of lamivudine in patient with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B Lamivudine Precore Mutant Study Group. Tassopoulos NC, Volpes R., Pastore G., Heathcote J., Buti M., Goldin RD, Hawley S., Barber J., Condreay L., Gray DF. Hepatology 1999;29:889-896
8. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. Ganem D, Prince AM, N Engl J Med 2004;350-1118-1129
9. Viral determinas and host immune response in pathogenesis of HBV infection. Rapicetta M, Ferrari C, Levrero M. J Med Virol 2002;67:454-457
10. World-wide epidemiology of HbeAg negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variant. Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS. J Viral Hepat. 2002;9:52-61
11. Hepatitis B virus concentrations in serum determined by sensitive quantitative assays in patients with established chronic hepatitis delta virus infection. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Yamashiro T, Maeshiro T, Kinjo F, Saito A, Zukeran H. J Med Virol. 2001 Nov;65(3):478-84.
12. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. Keith R. Loeb, Keith R. Jerome, James Goddard, Meei-Li Huang, Anne Cent, Lawrence Corey. Hepatology:2000;32:3:626-629
13. Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). Klaus M.

## Z.1 SIMBOLI

LEGENDA			
	Codice prodotto		Temperature di conservazione
	Dispositivo diagnostic in vitro		Vedi istruzioni d'uso
	Numero 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 e approvato da un Organismo Notificato Europeo. 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.

  
0318



## 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**



 **100% MADE IN ITALY**

**EN ISO 13485:2013 Certified**

