



# HDV RNA QUANTITATION (QT)

---

Real-Time PCR per la quantificazione del genoma del Virus dell'Epatite Delta (HDV)



4BShopLab

## HDV RNA

### A. DESTINAZIONE D'USO

Il kit Real Time PCR **HDV Quantitation**, identificato con il codice **DRNA.CE**, è inteso per la determinazione quantitativa in campioni umani (plasma, siero) dell'RNA del virus dell'epatite D con controllo simultaneo della reazione di amplificazione, mediante un Controllo Interno (**IC**).

Il dosaggio DRNA.CE è stato titolato mediante Standard Internazionale 1<sup>st</sup> WHO per epatite D (codice PEI 7657/12) al fine di esprimere i valori di concentrazione dei campioni anche in Unità Internazionali (IU/ml).

Il kit è stato adattato per il suo utilizzo sugli strumenti ABI 7500 Sequence Detection System®, Applied Biosystems™\*, MX3000P (Software MxPro version 4.01 Stratagene™\*\*\*) e CFX96 (Software CFX manager versione 1.7, Biorad™\*\*).

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

\*\*Biorad è un marchio registrato.

\*\*\*Stratagene è un marchio registrato.

### B. INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite delta (HDV) è un virus RNA difettivo che può colpire solo pazienti già portanti una infezione dovuta al virus dell'epatite B in fase acuta o cronica. L'assemblaggio e la propagazione dei virioni dipende infatti dal virus dell'epatite B.

Il genoma dell' HDV è una molecola RNA circolare, single strand di circa 1700 bp. Il genoma codifica due diverse ribonucleoproteine, denominate small hepatitis delta antigen (sHDAG) e large hepatitis delta antigen (LHDAG). La produzione differenziale è collegata all'uso di diversi codoni di terminazione. Le due forme proteiche hanno funzioni diverse: l'sHDAG è richiesta per la replicazione dell'HDV, mentre l'LHDAG inibisce la replicazione dell'HDV ed è richiesta per la formazione del virione. L'infezione da HDV può causare gravi malattie al fegato, come le epatiti fulminanti che si presentano più spesso che per il solo HBV e con una più alta frequenza di cronicità in caso di superinfezione.

In molti casi l'epatite delta cronica evolve in cirrosi e carcinoma epatocellulare.

L'efficacia delle terapie farmacologiche attualmente in uso per l'HDV è deludente. La cura è basata sulla somministrazione a lungo termine di alte dosi di  $\alpha$ IFN, ma soltanto il 50% dei pazienti rispondono positivamente alla cura ed il 40% di questi hanno una ricaduta nei 6 mesi successivi alla fine della terapia. La diagnosi di infezione dovuta ad HDV è di solito basata sull'individuazione di anticorpi specifici anti-HDV e la presenza di anticorpi IgM è correlata allo stato replicativo del virus. La replicazione dell'HDV è efficacemente valutata con la quantificazione dell'RNA dell'HDV, nel siero o nel fegato, mediante test di Real-Time PCR. Questa tecnologia fornisce un mezzo aggiuntivo da utilizzare per la diagnosi ed il monitoraggio dell'epatite cronica dovuta all'HDV.

### C. PRINCIPIO DEL TEST

Il Kit DRNA.CE Kit è basato su una chimica Real Time che utilizza sonde e primers specifici.

L'**HDV RNA**, recuperato dal campione biologico in esame attraverso un processo di estrazione, è retrotrascritto a cDNA ed amplificato. Il prodotto amplificato è determinato mediante un Probe fluorescente specifico per una sequenza caratteristica del genoma dell' HDV.

Il controllo interno (IC) serve come controllo di amplificazione per ogni singolo campione con l'obiettivo di identificare la presenza di eventuali inibitori della reazione polimerasica.

Una curva standard è fornita per permettere la quantificazione della carica virale.

### D. COMPONENTI

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

Componente	Etichettatura e contenuto	DRNA.CE 50 Reazioni
<b>A</b> CODIFICATO: ALL/MM Codice colore : blu	Master mix	N° 2 provette/ 0.4ml
<b>B</b> CODIFICATO: HDV/CB Codice colore : giallo	Liofilizzato Primers/Probes	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
<b>REV</b> CODIFICATO: HDV/REV Codice colore : bianco	Liofilizzato Primer per la Retrotrascrizione	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
<b>C</b> CODIFICATO: ALL/C Codice colore : rosso	Acqua MG	N° 3 provette/1.5 ml
<b>NTC</b> CODIFICATO: ALL/NTC Codice colore : bianco	Controllo negativo	N° 1 provetta/1.5 ml
<b>STD</b> Standard di quantificazione (1.0x10 <sup>4</sup> copie/ul) CODIFICATO: HDV/STD Codice colore : rosso	Standard Quantitativo Liofilizzato	N° 4 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
<b>I.C.</b> CODIFICATO: HDV/IC Codice colore: verde	Liofilizzato Controllo interno	N° 2 provette (da dissolvere con il volume di ALL/C indicato sull'etichetta)
Insero della confezione	Istruzioni per l'uso	N° 1

**Nota importante:** Su richiesta Dia.Pro può fornire reagenti per 25, 100, 150 tests, come riportato in tabella:

Componente	n°1 provetta/0.4ml	n°4 provette/0.4ml	n°6 provette/0.4ml
Componente A	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
Componente B	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
REV	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
Componente C	n°2 provette/1.5ml	n°3 provette/1.5 ml	n°5 provette/1.5ml
NTC	n°1 provetta/1.5ml	n°2 provette/1.5 ml	n°3 provette/1.5ml
IC	n°1 provetta	n°4 provette	n°6 provette
STD	n°2 provette	n°4 provette	n°6 provette
Insero	n°1	n°1	n°1
<b>Numero test</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>150</b>
<b>Codice</b>	<b>DRNA.CE.25</b>	<b>DRNA.CE.100</b>	<b>DRNA.CE.150</b>

## E. CONSERVAZIONE E STABILITA'

Il kit codificato DRNA.CE deve essere conservato a +2...8 °C.  
Una volta risospeso il Componente REV (codice HDV/REV) deve essere conservato a -20°C.  
Una volta risospesi il Componente REV (codice HDV/REV), il Componente B (codice HDV/CB) ed il Componente IC (codice HDV/IC) sono stabili 1 mese a -20°C.  
Una volta risospeso il Componente STD (codice HDV/STD) è stabile 2 settimane a -20°C.  
Se i componenti risospesi devono essere usati più volte si raccomanda di aliquotarli e congelarli, ripetuti congelamenti e scongelamenti devono essere evitati. Solo uno scongelamento è ammesso.

## F. MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI NEL KIT

1. Micropipette calibrate (0,5<volume<1000 µl)
2. Kit estrazione RNA
3. MG EtOH
4. Blocco termico
5. Microcentrifuga
6. Portaprovette
7. Puntali Sterili con filtro/barriera per aerosol
8. 0,2 ml Microprovette fornite dai produttori di strumenti di Real-Time PCR
9. Guanti usa e getta, powder-free
10. Termociclatore
11. Termociclatore Real-Time PCR (\*)
12. Fazzoletti di carta assorbente
13. Vortex o miscelatori similari.

(\*) **Attenzione:** La calibrazione dei pure dyes (Pure Spectra Component File) e del background (Background Component File) deve essere effettuata almeno una volta all'anno.

## G. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere usato solo da personale tecnico esperto ed altamente qualificato, con la supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Il personale tecnico deve essere adeguatamente addestrato all'uso dei termociclatori Real-Time, nella manipolazione dei reagenti di Biologia Molecolare ed avere esperienza con protocolli di Real-Time PCR
3. Per effettuare questo tipo di analisi il kit deve essere usato in un laboratorio certificato e qualificato dalle autorità nazionali in quel campo (Ministero della Salute od entità simili) .
4. Tutto il personale impiegato nell'analisi deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti privi di talco ed occhiali. Si dovrebbe evitare di usare oggetti acuminati e taglienti. Tutto il personale dovrebbe essere addestrato alle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, U.S. e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health's: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Tutto il personale impiegato nel trattamento dei campioni dovrebbe essere vaccinato contro HBV e HAV, per i quali sono disponibili vaccini sicuri ed efficaci.
6. L'ambiente del laboratorio dovrebbe essere controllato per evitare contaminanti come polvere o agenti microbici trasportati dall'aria.
7. I componenti A e B sono fotosensibili. E' opportuno proteggerli da esposizione a luce intensa.
8. Prestare **particolare attenzione** durante lo scioglimento dei componenti liofilizzati, controllando che la polvere sulle pareti della fiala del componente originale si sciolga completamente nel volume di acqua utilizzato. La fase di centrifugazione deve essere eseguita e controllata correttamente.
9. Lo scioglimento inadeguato del componente liofilizzato contenuto nel tubetto può compromettere il risultato
10. Evitare vibrazioni sulla superficie del banco dove avviene l'analisi.
11. Al ricevimento dei kit immagazzinarli a +2/+8°C in un frigorifero a temperatura controllata o camera fredda.

12. Non mischiare i componenti dei diversi lotti di kit. Si raccomanda anche che non vengano scambiati componenti tra due kit dello stesso lotto.

13. Controllare che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti visibili o aggregati. Se questo succede informare il supervisore del laboratorio per avviare le procedure necessarie alla sostituzione del kit.

14. Il kit, a causa della fase di retrotrascrizione, è altamente suscettibile alla contaminazione crociata tra reagenti e campioni. Per evitare tale rischio, utilizzare dispositivi monouso in plastica, cambiare spesso i guanti monouso e pulire frequentemente le zone di lavoro.

15. Evitare contaminazione crociata tra campioni utilizzando puntali usa-e-getta, cambiandoli dopo ogni campione.

16. Evitare contaminazione crociata tra reagenti del kit utilizzando puntali usa-e-getta, e cambiandoli dopo averli usati uno alla volta.

17. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza riportata all'esterno del contenitore e sulle etichette interne (vials).

18. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni di siero/plasma 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.

19. Immagazzinare ed estrarre materiali positivi (campioni, controlli ed amplificati) separatamente dagli altri reagenti ed usare un locale separato per il loro trattamento.

20. Sciogliere i reagenti liofilizzati nella corretta proporzione indicata sulle etichette con acqua Molecular Grade (componente C codificato:ALL/C) fornita con il kit.

21. Effettuare tutte le necessarie operazioni nel minor tempo possibile conservando i componenti in bagno di ghiaccio o in un Cooling Block.

22. 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, strumenti e reagenti nell'area dove sono stati compiuti i passaggi operativi precedenti.

23. Si raccomanda l'uso di strumenti in plastica usa-e-getta per la preparazione di componenti liquidi o nel trasferimento dei componenti nelle stazioni di lavoro automatiche per evitare contaminazione crociata.

24. 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. Non mettere in contatto i rifiuti dell'estrazione con Candeggina.

25. Spargimenti accidentali da campioni o da operazioni in corso devono essere assorbiti con carta assorbente imbevuta di candeggina e poi ripuliti con acqua. I fogli di carta utilizzati devono essere gettati in contenitori predisposti per rifiuti speciali di laboratorio od ospedalieri.

26. Altri materiali di rifiuto generati dall'uso del kit (ad esempio i puntali utilizzati per i campioni) dovrebbero essere trattati come potenzialmente infettivi e gettati secondo le direttive nazionali e le leggi che regolano il trattamento dei rifiuti di laboratorio.

## H. CAMPIONI: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

1. Il sangue è raccolto mediante prelievo venoso ed il plasma (o il siero) è 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 ( $\geq 10$  IU/ml) inibisce le reazioni di PCR.**

**Non si devono usare campioni raccolti in provette contenenti eparina come anticoagulante.**

**Inoltre non si devono usare campioni di pazienti eparinizzati.**

3. Evitare aggiunte di conservanti ai campioni.

4. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o nomi per evitare false interpretazioni 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. Campioni emolizzati (rossi) e visibilmente iperlipemici (lattescenti) devono essere scartati in quanto potrebbero generare falsi risultati. Campioni contenenti residui di fibrina, particolati, filamenti o corpuscoli devono essere scartati in quanto potrebbero generare falsi risultati.

6. Se non utilizzati immediatamente i campioni di siero/plasma devono essere aliquotati 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 dovrebbe essere congelato/scongelato più di una volta perché questo potrebbe inficiare il risultato del test.

7. I campioni di plasma per estrazione di RNA devono essere raccolti in EDTA secondo le 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 massimo di 30 giorni oppure a -70°C per periodi più lunghi.

8. Per una conservazione ottimale di campioni si raccomanda di suddividerli in aliquote (volume minimo 300 µl) e conservarli congelati a -20°C per un periodo massimo di 30 giorni oppure a -70°C per periodi più lunghi. Evitare di ripetere cicli di congelamento/scongelamento.

9. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelarli solo ed immediatamente prima dell'estrazione per evitare la degradazione dell'acido nucleico.

10. I campioni di sangue periferico per l'estrazione dell'RNA devono essere raccolti in EDTA secondo le normative del laboratorio, trasportati e conservati a +2°C/+8°C per un periodo massimo di 3 giorni. Non congelare i campioni di sangue intero per evitare lisi delle cellule e perdita del titolo virale.

## I. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI ED AVVERTENZE

### Master Mix

Componente A. Pronto per l'uso. Miscelare bene su vortex prima dell'uso e centrifugare brevemente per recuperare l'intero volume.

**ATTENZIONE:** Il componente A è fotosensibile. Proteggerlo dall'esposizione con luce intensa.

### Primers/Probe:

Componente B.

- Centrifugare la provetta per 1 min a 11000 rpm
- Aprire delicatamente il tappo della provetta evitando la dispersione di polvere
- Sciogliere omogeneizzando il componente liofilizzato B con il volume di Componente C (Codice ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Continuare a scioglierlo sul piano di lavoro per almeno 15 min a temperatura ambiente (15°C<RT<25°C)
- Centrifugarlo brevemente evitando la formazione di schiuma
- Centrifugare brevemente per recuperare l'intero volume.

**ATTENZIONE:** Il componente B è fotosensibile. Proteggerlo da esposizione luce intensa.

### Primer per retrotrascrizione:

Componente REV

- Sciogliere in modo omogeneo il componente REV con il volume di Componente C (Codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.

- Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro over-night a temperatura ambiente (15°C<RT<25°C), prima del primo utilizzo.

- Centrifugarlo brevemente evitando la formazione di schiuma
- Centrifugare la provetta a 11000 rpm per 1 min per recuperare l'intero volume.

### Acqua MG:

Componente C. Pronto per l'uso

### NTC o Controllo Negativo :

Componente D. Pronto per l'uso.

### Curva Standard:

Componente STD.

- Centrifugare la provetta per 1 min a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta evitando dispersione di polvere.
- Sciogliere in modo omogeneo il componente STD con il volume di Componente C Codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
- Continuare a scioglierlo sul piano di lavoro per almeno 15 min a temperatura ambiente (15°C<RT<25°C)
- Vortexare brevemente evitando la formazione di schiuma.
- Centrifugare brevemente per recuperare l'intero volume.
- Preparare 4 provette Nuclease Free per la preparazione della curva standard
- Realizzare diluizioni seriali 1:10 nel Componente C (Codice: ALL/C) per ottenere la curva standard come da tabella qui sotto riportata:

ABI 7500SDS e Stratagene Mx3000P		
Preparazione della curva standard		
HDV/STD	Aggiungere il volume del componente C (codice: ALL/C) come indicato sull'etichetta della provetta	10000 copie/µl o 4240 IU/µl
STD 1	10 µl (HDV/STD) + 90 µl Componente C (codice: ALL/C)	1000 copie/µl o 424 IU/µl
STD 2	10 µl (STD 1) + 90 µl Componente C (codice: ALL/C)	100 copie/µl o 42.4 IU/µl
STD 3	10 µl (STD 2) + 90 µl Componente C (codice: ALL/C)	10 copie/µl o 4.24 IU/µl
STD 4	10 µl (STD 3) + 90 µl Componente C (codice: ALL/C)	1 copia/µl o 0.42 IU/µl

\*calibrato sul 1° WHO Standard Internazionale per HDV (PEI code 7657/12)

**NOTA IMPORTANTE:** per la quantificazione dei campioni in IU/ml riferirsi alla sezione R

## Controllo interno:

### Componente I.C.

- Centrifugare la provetta per 1 min a 11000 rpm.
- Aprire delicatamente il tappo della provetta evitando dispersione di polvere
- Sciogliere in modo omogeneo il Componente IC liofilizzato con il volume di Componente C (Codice: ALL/C) come indicato sull'etichetta della provetta.
- Continuare a scioglierlo sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C<RT<25°C)
- Vortexare brevemente evitando la formazione di schiuma
- Centrifugare brevemente per recuperare l'intero volume

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

1. **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. Le micropipette devono essere anche regolarmente controllate per garantire una precisione dell'1% ed coefficiente di variazione di +/-5%. Si dovrebbe anche regolarmente provvedere alla loro decontaminazione.
2. **Dispositivo di estrazione:** Il kit DRNA.CE è inteso esclusivamente per uso in combinazione con QIAamp Viral RNA Codice.52906 (QIAGEN). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso del kit fornite dal produttore.
3. **Fase di retrotrascrizione:** Il kit DRNA.CE è inteso esclusivamente per uso in combinazione con il kit di retrotrascrizione RNA, codice RNART.HDV.CE (Dia.Pro srl). Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dal produttore.
1. **Termociclatori Real Time:** il kit DRNA.CE è inteso esclusivamente per l'uso in combinazione con i Termociclatori Real Time ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) software SDS 1.3.1 e MX3000P® software MxPro 4.01 (Stratagene™) e CFX96 RTS, software CFX manager versione 1.7 (Biorad).
4. Gli utilizzatori finali devono rigorosamente seguire le istruzioni per l'uso fornite dal produttore.

## M. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE-ANALISI

1. Verificare la data di scadenza stampata sull'etichetta esterna della scatola contenente il kit. Non utilizzare se il kit è scaduto.
2. Verificare che i componenti liquidi non siano contaminati da particelle visibili ad occhio nudo o aggregati. Verificare che sul fondo dei flaconi contenenti i componenti liofilizzati sia presente un aggregato ben formato. Verificare che non si siano prodotti danni nel trasporto e che non ci sia alcuna fuoriuscita di liquidi all'interno della scatola.
3. Dissolvere i componenti liofilizzati con la giusta quantità di Componente C (codice: ALL/C) come descritto nella relativa sezione. Avviare i termociclatori, verificare le impostazioni ed assicurarsi di utilizzare il corretto protocollo di analisi.
4. Seguire rigorosamente le istruzioni contenute nel manuale dello strumento fornito dal produttore per la corretta impostazione dei termociclatori Real-Time.
5. Verificare che le micropipette siano impostate sul volume corretto.
6. Verificare che tutto il resto dell'attrezzatura sia disponibile e pronto all'uso.
7. In caso di problemi, non proseguire oltre con il test ed informare il supervisore.

## N. PROCEDURA D'ANALISI

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

### N.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.

### N.2 Retro-trascrizione dell'RNA Virale a c-DNA

La fase di retro-trascrizione dell'RNA genomico dell'HDV deve essere realizzata esclusivamente in combinazione con il seguente kit:

Materiale	Descrizione	Codice del kit	Prodotto re
RNA	Kit di retro trascrizione dell'HDV RNA	RNART.HDV.CE	Dia.Pro srl

La retrotrascrizione dell'HDV RNA deve essere eseguito 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:** per il corretto utilizzo del Componente REV riferirsi alle sezioni E e I.

### Preparazione del test di retrotrascrizione

- Preparare il numero richiesto di provette di reazione per i campioni da analizzare
- Prevedere una provetta supplementare per il controllo negativo
- Scongellare la miscela di Retro (REAGENTE B) poco prima dell'uso e lavorare in ghiaccio.

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

Il profilo termico è riportato nella tabella seguente:

Fase	Ciclo	Temp.	Durata
1	1	42°C	60 min
2	1	99°C	10 min
3	1	4°C	Inf.

Alla fine della fase di retrotrascrizione i campioni dovrebbero essere conservati a 2°C...8°C per un'ora al massimo o stoccati a -20°C.

### **N.3 Impostazione della reazione**

Il kit **DRNA.CE** è inteso esclusivamente per l'uso in combinazione con ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) software SDS 1.3.1, MX3000P® (Stratagene™) software MxPro 4.01) e CFX96 software CFX manager versione 1.7 (Biorad).

#### **N.3.1 Preparazione del PCR**

**Importante:** Un esempio di schema di dispensazione è riportato nella sezione O, alla quale bisogna far riferimento prima di iniziare a leggere le seguenti istruzioni.

- Preparare i componenti come descritto nella Sezione I;
- Preparare il numero richiesto di provette per la reazione oppure una piastra con 96 pozzetti di reazione per i campioni in esame e per la curva standard (preparata come descritto in sezione I).

**Nota importante:** Usare solo provette ottiche o micropiastre consigliate dai produttori di termociclatori Real-Time.

- Considerare che i campioni dovrebbero essere possibilmente testati in doppio o triplo.
- Includere almeno una provetta per il controllo negativo (NTC)
- Preparare la **Miscela di amplificazione** per **Campioni, NTC e curva standard** come da seguente tabella:

#### **Preparazione della miscela di amplificazione**

Numero di reazioni		1
<b>A</b>	Master mix	12,5 µl
<b>B</b>	Primers/probes	2 µl
<b>I.C.</b>	Controllo Interno	0,5 µl
<b>Tot vol.</b>		<b>15 µl</b>

#### **N.3.2 Procedura di Amplificazione**

- dispensare 15 µl della miscela di amplificazione in ogni provetta di reazione o pozzetto della micropiastre
- aggiungere 10 µl dei **campioni, NTC e Curva Standard** alle provette di reazione
- chiudere bene le provette
- centrifugare brevemente la provetta di reazione a 2000 rpm
- non lasciare la provetta di reazione a temperatura ambiente (RT) per più di 30 min e coprire le provette per evitare l'esposizione alla luce.
- caricare le provette nel termoblocco del termociclatore Real-Time
- dopo le operazioni di settaggio descritte nella sezione N5 (Programmazione dello strumento) dare inizio al test avviando il termociclatore

**Nota Importante:** I componenti liofilizzati dopo lo scioglimento con il componente C (acqua MG) sono stabili per non più di 3 ore se mantenuto su ghiaccio oppure a 2°C...8°C.

Alla fine dei test smaltire in modo appropriato il materiale rimasto dei punti di diluizione STD.

Il volume non utilizzato del Componente B, REV, STD e Controllo interno IC può essere suddiviso in aliquote.

#### **Schema per la preparazione del test PCR**

Numero di reazioni	1
<b>Miscela di amplificazione</b>	15 µl
<b>Campione oppure NTC Curva Standard</b>	10 µl
<b>Volume totale</b>	<b>25 µl</b>

#### **N.5 Programmazione dello strumento**

Per la programmazione dello strumento fare riferimento al manuale d'istruzioni fornito dai produttori.

**Nota importante:** per Mx3000P impostare "Filter set gain settings": ROX = x1, FAM = x8, VIC/JOE = x1. (vedere il manuale d'istruzioni del software MxPro™ QPCR, pag. 41)

#### **N.5.1 Profilo termico**

Il profilo termico è riportato nella seguente tabella:

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** :(\*) fase per la raccolta dei dati in tempo reale

**Attenzione:** prestare attenzione nell'impostare il termociclatore Real-Time con un corretto profilo termico seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

#### **N.5.2 Selezione dei rivelatori**

Seguendo le istruzioni contenute nei manuali forniti dai produttori dei termociclatori Real-Time (ABI 7500 e MX3000P® Stratagene™ e CFX96) selezionare i fluorofori segnalati nella seguente tabella:

Rivelazione	Reporter	Quencher
HDV	FAM	Non Fluorescent
Internal Control (I.C.)	VIC/JOE	Non Fluorescent
Passive Reference	ROX	Non Fluorescent

#### **Note importanti**

**Mx3000P (Stratagene):** il segnale di fluorescenza del reporter VIC è rilevato dal filtro/canale di JOE.

## O. SCHEMA DEL TEST

Esempi di schema di dispensazione per analisi quantitative sono riportate di seguito

Controllo	Requisiti
NTC	Undetermined
STD 1	24 < Ct (Threshold Cycle) < 28
STD 2	27 < Ct (Threshold Cycle) < 31
STD 3	30 < Ct (Threshold Cycle) < 34
STD 4	34 < Ct (Threshold Cycle) < 38

### Micropiastra/ provette

	1	2	3	.	.
A	STD 1				
B	STD 2				
C	STD 3				
D	STD 4				
E	NTC				
F	Sample 1				
G	Sample 2				
H	Sample 3				

Legenda: NTC = Controllo Negativo STD 1,2,3,4 = HDV RNA Curva Standard , Campione 1,2,3 = <campioni in esame.

### Micropiastra/ provette

	1	2	3	.	.
A	STD 1	STD 1	STD 1		
B	STD 2	STD 2	STD 2		
C	STD 3	STD 3	STD 3		
D	STD 4	STD 4	STD 4		
E	NTC	NTC	NTC		
F	Sample 1	Sample 1	Sample 1		
G	Sample 2	Sample 2	Sample 2		
H	Sample 3	Sample 3	Sample 3		

Legenda: NTC = Controllo Negativo STD 1,2,3,4 = HDV RNA Curva Standard , Campione 1,2,3 = campioni in esame.

## P. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

### P.1 impostazioni pre-analisi

Prima di dare inizio all'analisi:

- impostare il "Baseline" (il livello di fluorescenza di base) come riportato nella tabella sotto:

"Baseline"	
ABI™ PRISM 7500SDS	Auto baseline
MX3000P® (Stratagene™)	Adaptive baseline Important note: non usare Mx4000 v1.00 to v3.00 algorithm
CFX96® RTS (Bio-Rad™)	Auto calculated Baseline

- Impostare manualmente il Threshold per FAM/JOE/VIC

"Threshold"	FAM	VIC/JOE
ABI™ PRISM 7500SDS	0.055	0.055
MX3000P® (Stratagene™)	0.055	0.045
CFX96® RTS (Bio-Rad™)	230	150

### P.2 Analisi dei dati

Si effettua un controllo sui calibratori STD ogni volta che il kit viene usato per verificare se i valori dei corrispondenti Ct siano quelli previsti e i Threshold impostati siano quelli riportati nella tabella seguente.

ABI™ PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P®	
Controllo	Requisiti
NTC	Undetermined
STD 1	24 < Ct (Threshold Cycle) < 28
STD 2	27 < Ct (Threshold Cycle) < 31
STD 3	30 < Ct (Threshold Cycle) < 34
STD 4	34 < Ct (Threshold Cycle) < 38

BIORAD™ CFX96®	
Controllo	Requisiti
NTC	Undetermined
STD 1	25 < Ct (Threshold Cycle) < 29
STD 2	28 < Ct (Threshold Cycle) < 32
STD 3	31 < Ct (Threshold Cycle) < 35
STD 4	35 < Ct (Threshold Cycle) < 39

Inoltre controllare i valori della Slope e R<sup>2</sup> per verificare la qualità della corsa. I risultati di ogni campione sono riassunti nella tabella seguente:

Controllo	Requisiti
FAM Slope	-3,1 < slope < -3,9

Controllo	Requisiti
Efficiency	R <sup>2</sup> > 0.98

## Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Per ogni campione sono considerati i valori della fluorescenza di FAM (valori Ct positivi/negativi) e della fluorescenza del Controllo Interno JOE/VIC per individuare HDV come descritto nella tabella sotto:

HDV FAM	Controllo Interno VIC	Risultato del test
CAMPIONE POSITIVO	25 < Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o non determinato	CORRETTO*
CAMPIONE NEGATIVO	25 < Ct < 40	CORRETTO
	Ct > 40 o non determinato	NON VALIDO**

(\*) Un'alta concentrazione iniziale di cDNA di HDV nel campione (FAM positivo) può portare a RIDURRE o ANNULLARE il Segnale di Fluorescenza del Controllo Interno IC a causa della competizione con il reagente specifico.

(\*\*) Si è in presenza di potenziali problemi durante la fase di amplificazione (amplificazione inefficace o assente) oppure durante la fase di estrazione (presenza di inibitori) che possono portare a risultati non corretti o a falsi negativi. Il test deve essere ripetuto partendo dallo step di estrazione utilizzando un nuovo campione.

Per ogni campione positivo individuato dal kit DRNA.CE una corretta quantificazione della carica virale di HDV può essere applicata come riportato nella tabella sotto

ABI™PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P®	
Risultati HDV (copies/μl)	Carica virale HDV (copies/μl)
Quantità > 1E+09	Carica virale HDV > 1E+09
1E+00 ≤ Quantità ≤ 1.0E+09	<b>QUANTIFICAZIONE</b>
Quantity < 1E+00	HDV viral load < 1E+00

**NOTA IMPORTANTE:** Per la quantificazione dei campioni fare riferimento alla Sezione R.

Sulla base dei risultati ottenuti con la calibrazione del kit DRNA.CE sul 1° WHO Standard Internazionale per HDV è possibile effettuare una corretta quantificazione della carica virale come riportato nella seguente tabella:

ABI™ PRISM® 7500SDS - BIORAD™ CFX96®	
Risultati HDV (IU/ml)	Carica virale HDV (IU/ml)
Quantità > 5.75E+05	Carica virale HDV > 5.75E+05
5.00E+01 ≤ Quantità ≤ 5.75E+05	<b>QUANTIFICAZIONE</b>
Quantità < 5.00E+01	Carica virale HDV < 5.00E+01

STRATAGENE™ MX3000P®	
Risultati HDV (IU/ml)	Carica virale HDV (IU/ml)
Quantità > 5.75E+05	Carica virale HDV > 5.75E+05
2.50E+02 < Quantità < 5.75E+05	<b>QUANTIFICAZIONE</b>
Quantità < 2.50E+02	Carica virale HDV < 2.50E+02

**NOTA IMPORTANTE:** Per la quantificazione del campione in copie/ml fare riferimento alla Sezione R.

Il risultato ottenuto con questo prodotto deve essere interpretato tenendo in considerazione la condizione clinica e le informazioni provenienti da altri analisi di laboratorio inerenti il paziente.

Sono possibili i seguenti risultati:

### Risoluzione dei problemi

	FAM	VIC	Risultato	CONTROLLO
CAMPIONE sconosciuto	+	+/-	RISULTATO CORRETTO <u>Positivo</u>	<b>IMPORTANTE:</b> Un'iniziale alta concentrazione dell'RNA di HDV (Segnale Positivo FAM) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del Controllo Interno I.C. per competizione tra reagenti.
CAMPIONE sconosciuto	-	-	ATTENZIONE ! POSSIBILITA' DI: Inibizione, errore nella procedura o non funzionamento degli strumenti	1. che i componenti siano stati correttamente preparati 2. che non siano stati fatti errori nella preparazione del test; 3. che i fluorofori selezionati siano corretti: FAM per la rivelazione HDV e VIC/JOE per la rivelazione I.C.; 4. che l'analisi sia stata condotta con la corretta impostazione degli strumenti; 5. che il kit sia stato conservato correttamente; 6. che nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta 7. che le procedure di estrazione e di retrotrascrizione siano state effettuate correttamente;
CAMPIONE sconosciuto	-	+	RISULTATO CORRETTO <u>Negativo</u>	
STD	+	+/-	RISULTATO CORRETTO	<b>IMPORTANTE:</b> Un'iniziale alta concentrazione dell'RNA di HDV (Segnale Positivo FAM) può portare ad un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del

				Controllo Interno I.C. per competizione tra reagenti.
STD	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Errore nell'uso delle pipette oppure nella procedura	1. che i componenti siano stati correttamente preparati 2. che non siano stati fatti errori nella preparazione del test; 3. che i fluoro fori selezionati siano corretti: FAM per la rivelazione HDV e VIC/JOE per la rivelazione I.C.; 4. che l'analisi sia stata condotta con la corretta impostazione degli strumenti; 5. che il kit sia stato conservato correttamente; 6. che nessun inibitore potenziale della PCR abbia contaminato la provetta 7. che le procedure di estrazione e di retrotrascrizione siano state effettuate correttamente;
STD	-	+	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Errore nell'uso delle pipette oppure nella procedura	1. che i componenti siano stati correttamente preparati 2. che non siano stati fatti errori nella preparazione del test; 3. che i fluorofori selezionati siano corretti: FAM per la rivelazione HDV e VIC per la rivelazione I.C.; 4. che l'analisi sia stata condotta con la corretta impostazione degli strumenti; 5. che il kit sia stato conservato correttamente;
NTC	-	+	RISULTATO CORRETTO	
NTC	+	+	ATTENZIONE ! POSSIBILITA' DI: Contaminazione	1. che i componenti siano stati correttamente preparati 2. che non siano stati fatti errori nella preparazione del test; 3. che lo spazio 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 correttamente preparati 2. che non siano stati fatti errori nella preparazione del test; 3. che lo spazio di lavoro e gli strumenti siano decontaminati ad intervalli regolari 4. che il kit sia stato conservato correttamente;

Se i risultati del test corrispondono ai requisiti definiti **RISULTATO CORRETTO** precedentemente definiti, procedere alla sezione seguente.

Se si presentano uno o più problemi tra quelli precedentemente descritti, procedere al controllo e riferire al supervisore ogni residuo problema per ulteriori azioni.

### R. QUANTIFICAZIONE

I calibratori STD vengono trattati come campioni purificati e si utilizza lo stesso volume, 10μl.

La concentrazione dei calibratori STD viene espressa in copie/μl.

La **concentrazione del genoma virale per ml** del campione di ogni paziente si calcola applicando la formula seguente:

$$\text{Risultati (copie/ml)} =$$

$$\text{copie/μl (dati sessione di analisi)} \times B \times C \times D \times 1000$$

Di seguito si riporta una breve spiegazione dei coefficienti:

**B** = valore che esprime la diluizione del campione in seguito alla fase di retrotrascrizione.

10μl di campione estratto in 30μl del volume di reazione totale = **(30/10 = 3)**

**C** = valore che esprime il rapporto tra il volume del campione estratto e il volume di eluizione in seguito alla fase di estrazione =  $(60\mu\text{l}/140\mu\text{l} = 0.43)$

**D** = un fattore di correzione calcolato durante lo sviluppo del saggio = **0.23**.

“**1000**” = per ottenere la concentrazione del genoma HDV RNA virale in 1 ml (copie/ml = copie/ $\mu\text{l}$  x 1000).

$$\text{Risultati (copie/ml)} = \text{copie}/\mu\text{l} \times 3 \times 0.43 \times 0.23 \times 1000$$

$$\text{Risultati (copie/ml)} = \text{copie}/\mu\text{l} \times 300$$

Per **ABI™ PRISM® 7500SDS** (Software SDS version 1.3.1, Applied Biosystem) e **STRATAGENE™ MX3000P®** (Software MxPro version 4.01, Stratagene) per convertire l'espressione della concentrazione virale da copie/ml a IU/ml il fattore di conversione è 2.36.

**1 IU/ml = 2.36 copie/ml**

**Esempio:**

$$\text{Risultati (copie/ml)} = 250 \text{ (dati sessione di analisi)} \times 300$$

$$\text{Risultati (copie/ml)} = 75000 \text{ (7.5 E+04)}$$

$$\text{Risultati (IU/ml)} = 75000/2.36 = 31780 \text{ (3.2E+04)}$$

Per **BIORAD CFX96® RTS** per convertire l'espressione della concentrazione virale da copie/ml a IU/ml il fattore di conversione è **3.91**

**1 IU/ml = 3.91 copie/ml**

**Esempio:**

$$\text{Risultati (copies/ml)} = 414 \text{ (run data)} \times 300$$

$$\text{Risultati (copies/ml)} = 124200 \text{ (1.2E+05)}$$

$$\text{Resultati (IU/ml)} = 124200/3.91 = 31765 \text{ (3.2E+04)}$$

**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 e di errate interpretazioni.*
2. *Quando i risultati del test sono trasmessi dal laboratorio ad un centro informatico porre la massima attenzione per evitare trasferimenti di dati erronei.*

## S. PRESTAZIONI

La valutazione delle prestazioni è stata effettuata in accordo con quanto riportato nelle specifiche tecniche generali o CTS (art. 5, Capitolo 3 della Direttiva IVD 98/79/EC).

La valutazione delle prestazioni è stata condotta nei laboratori Dia.Pro su materiale fornito dalla Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano, Italia.

### S.1 SENSIBILITA' ANALITICA

La sensibilità analitica di un metodo quantitativo molecolare fa riferimento alla più piccola quantità del marker bersaglio che possa essere rilevata con precisione.

Nel contesto delle CTS può essere espressa come: **limite di rivelazione** oppure **limite quantitativo**:

**Limite di rivelazione (Limit of detection-LOD):** è la più alta diluizione dell'analita che possa essere rilevata in maniera costante, e la più bassa **concentrazione** dell'analita che possa essere rilevata in maniera costante.

**Limite quantitativo:** è il limite più basso ed il più alto rilevato nel test molecolare quantitativo per una determinazione quantitativa precisa ed accurata dell'analita.

In un test molecolare quantitativo il limite di rivelazione (LOD) è determinato testando la diluizione seriale di un plasmide contenente un frammento del marker bersaglio. L'analisi, denominata **Probit**, basata su 8 repliche di diluizioni di tre punti standard testati in tre diverse analisi, dovrebbe dare un risultato positivo nel 95% di queste.

Il **limite quantitativo** è stato determinato misurando la linearità o range dinamico. La **linearità** (per test quantitativi) o **range dinamico** (per test qualitativi) è stato determinato misurando diverse concentrazioni della curva standard in un esperimento di linearità. Confrontando i valori ottenuti con le concentrazioni dei punti standard questi dovrebbero risultare in una curva lineare. Questo significa che esiste una proporzione diretta tra una concentrazione nota per singola diluizione standard e la determinazione quantitativa di ciascuna di esse.

Nel kit codice DRNA.CE il **limite quantitativo LOD** è stato determinato mediante analisi **Probit**, di 24 repliche (8 replicati in 3 run diversi), delle tre diluizioni della curva standard che risultano positive nel 100% dei casi.

Il LOD ottenuto è stato  $0\log_{10}$  (1 copie/ $\mu\text{l}$ ).

**I risultati sono i seguenti:**

Limite di determinazione	
ABI™PRISM® 7500 SDS	1 copia/ $\mu\text{l}$
(Stratagene™ ) MX3000P®	1 copia/ $\mu\text{l}$

Ciò significa che con gli strumenti elencati nella tabella sopra riportata esiste il 95% di probabilità che sia rivelata 1 copia/  $\mu\text{l}$ .

### S1.1 Range dinamico e linearità

La linearità è la misura del grado al quale una curva standard si avvicina ad una linea retta. La **linearità** o **range dinamico** è l'intervallo delle concentrazioni dei punti standard per cui il valore finale in uscita (Ct o ciclo di soglia) del sistema è direttamente proporzionale alla concentrazione di ciascuno.

I limiti del Range dinamico sono i limiti inferiore e superiore dell'analisi quantitativa (**Limite di quantificazione**).

Per il kit DRNA.CE diluizioni seriali di un plasmide a DNA, la cui concentrazione è stata determinata mediante spettrofotometro, sono state preparate a concentrazione nota (copie/ $\mu\text{l}$ ) con una soluzione tamponata appropriata e quindi liofilizzate al fine di produrre dopo risospensione in acqua MG una curva di diluizioni limite.

Queste diluizioni sono state testate nel sistema analitico ed è stato determinato il loro Ct (ciclo di soglia).

Il limite superiore di quantificazione è  $9.00\log_{10}$  ( $10^9$  copie/ $\mu\text{l}$ ) e il limite inferiore di quantificazione è  $0.00\log_{10}$  (1 copia/ $\mu\text{l}$ ).

Il range dinamico è stato inoltre determinato con diluizioni seriali del 1° WHO Standard Internazionale per HDV (PEI code 7657/12).

Per il kit DRNA.CE eseguito su ABI 7500 and su BioRad CFX96 il **limite superiore di quantificazione** è  $5.76\log_{10}$  ( $5.75E+05$  IU/ml) e il **limite inferiore di quantificazione** è  $1.70\log_{10}$  ( $5.00E+01$  IU/ml).

Per il kit DRNA.CE eseguito su Mx3000P il **limite superiore di quantificazione** è  $5.76\log_{10}$  ( $5.75E+05$  IU/ml) e il **limite inferiore di quantificazione** è  $2.40\log_{10}$  ( $2.50E+02$  IU/ml).

### S.2 SPECIFICITA' ANALITICA

La specificità analitica è l'abilità di un metodo di rivelare e quantificare solo il marker bersaglio.

La specificità analitica del test HDV RNA è stata studiata come segue:

1. Il set primer/probe è stato scelto analizzando la sequenza bersaglio del genoma con un software appropriato (Primer Express v.3.0" fornito da Applied Biosystem Inc.).
2. il set primer/probe Set e la sequenza bersaglio del genoma sono stati controllati con il software "BLAST", per verificare se qualcuna delle sequenze di nucleotidi depositati nelle banche dei genomi in tutto il mondo presentino qualche omologia con HDV, e con il software "ClustalX", per confrontare le sequenze bersaglio del genoma dei diversi genotipi di HDV.
3. La specificità è stata ottimizzata mediante la scelta di rigorose condizioni di reazione.
4. I sieri provenienti da pazienti affetti da infezioni causate da organismi potenzialmente interferenti sono stati forniti dalla Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena Milano – Italia e successivamente analizzati.

I risultati sono riportati nella seguente tabella:

Numero di campioni	Organismo	Risultato
10	HBV (HDV Negativo)	negativo
10	HCV	negativo
10	HIV	negativo

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

#### R.3.1 Specificità Diagnostica:

La specificità diagnostica è la probabilità che il dispositivo dia un risultato negativo in assenza di un marker bersaglio. Così il vero **campione negativo** è un campione sicuramente negativo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

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

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata una **Specificità Diagnostica  $\geq 99\%$** .

#### S.3.2 Sensibilità Diagnostica

La **sensibilità diagnostica** è la probabilità che il dispositivo dia un risultato positivo in presenza del marker bersaglio. Così il vero **risultato positivo** è un campione sicuramente positivo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.

Nel kit codice DRNA.CE questo parametro è stato studiato esaminando campioni positivi per HDV RNA in duplicato in una stessa analisi.

La percentuale (%) dei campioni positivi è stata quindi calcolata. I campioni utilizzati sono stati determinati positivi con il kit in uso nel laboratorio che ha fornito tali campioni (Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano – Italia).

#### HDV RNA Campioni positivi

<b>VERI POSITIVI</b>	25
<b>FALSI NEGATIVI</b>	0
<b>CAMPIONI TOTALI</b>	25
<b>SENSIBILITA' %</b>	<b>100</b>

Inoltre la sensibilità diagnostica del test è stata verificata utilizzando un pannello di sieri provenienti da pazienti affetti da infezioni dovute a diversi sottotipi di HDV cortesemente forniti

dalla Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano –Italia.

I risultato sono riportati qui di seguito:

Campione	Sottotipo HDV	Risultato dell'analisi
HDV001	1	Positivo
HDV002	2	Positivo
HDV003	3	Positivo

**Sulla base dei risultati ottenuti la Sensibilità Diagnostica è stata calcolata come 100%.**

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

### S.4 PRECISIONE

La precisione mostra il grado di affidabilità del sistema. Ogni procedura di misurazione ha un'intrinseca variazione casuale chiamata "errore casuale". L'errore casuale non ha un valore numerico ma è determinato dalla dispersione della misura espressa come deviazione standard (DevST) e dal coefficiente di variazione (CV%). La precisione di un test si valuta in base alla concordanza dei risultati ottenuti dall'analisi di uno stesso materiale in più replicati.

Nel kit codice DRNA.CE, la **precisione** è stata espressa come variabilità intra-assay e variabilità inter-assay.

La precisione è stata verificata durante la stessa corsa analitica (intra-assay) ed in tre diverse corse analitiche (inter-assay) con una curva a 4 punti standard in duplicato.

In assenza di parametri stabiliti nella Direttiva Europea IVD CTS abbiamo identificato il seguente valore di accettabilità per HDV RNA:

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

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

### T. LIMITAZIONI

Si consiglia all'utilizzatore di questo kit di leggere attentamente e comprendere l'insero allegato alla confezione. E' necessaria la massima adesione dell'operatore al protocollo qui descritto per ottenere risultati affidabili. In particolare è essenziale un'accurata operazione di pipettaggio del campione e del reagente, l'applicazione di un corretto flusso di lavoro ed un'attenta programmazione della fase 2 del thermocycling per una rivelazione ed analisi quantitativa accurata e riproducibile dell'HDV RNA.

La determinazione che il campione di una persona contiene HDV RNA ha pesanti implicazioni mediche, sociali, psicologiche ed economiche.

Si raccomanda quindi che la discrezione, un supporto psicologico e un'appropriata terapia e valutazione medica siano considerati come aspetti essenziali della sequenza analitica.

## U. BIBLIOGRAFIA

1. Hepatocellular carcinoma and infections with multiple hepatitis viruses. Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, Bonino F. Princess Takamatsu Symp. 1995;25:61-6.
2. Hepatitis delta virus pathogenicity. Gowans EJ, Bonino F. Prog Clin Biol Res. 1993;382:125-30. Review.
3. A polymerase-chain reaction-based assay for serum HDV RNA. Negro F, Emerson SU, McRill C, Bonino F, Craxi A, Gerin JL, Miller RH, Purcell RH. Prog Clin Biol Res. 1991;364:179-84. No abstract available.
4. Quantitation of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients. Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, Hanslik T, Alloui C, Dény P, Gault E. J Clin Microbiol. 2005 May;43(5):2363-9.
5. Quantitation of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. Yamashiro T, Nagayama K, Enomoto N, Watanabe H, Miyagi T, Nakasone H, Sakugawa H, Watanabe M. J Infect Dis. 2004 Apr 1;189(7):1151-7. Epub 2004 Mar 12.
6. 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.

## V. SIMBOLI

LEGENDA			
<b>REF</b>	Codice del prodotto		Temperatura di conservazione
<b>IVD</b>	Dispositivo in Vitro		Vedere ed utilizzare le istruzioni
<b>LOT</b>	Numero del lotto		Fabbricante
	Data di scadenza		Numero dei test
<b>CE</b>	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.

**CE**  
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**

