

Istruzioni per l'uso

Ver.3 del 01/07/2020

Biologia Molecolare

Estrazione non compresa

HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0

REF

AA206/48

REF

GA030/2



48 TEST

CND

W0105020216

CE

0459

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

SEDE LEGALE: Via Cascina Conighetto - UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALIA
Tel.: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

Organizzazione con Sistema di gestione qualità certificata ISO 9001 e Sistema di gestione qualità settore medicale certificato ISO 13485
(organismo di certificazione IMQ - Certificazione CSQ).

➔ UTILIZZO

HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 fornisce i reagenti pronto-uso necessari per la determinazione quantitativa del virus dell'Epatite B (HBV) in campioni di plasma umano, mediante Real Time PCR della regione HBsAg virale. Il Controllo Interno è endogeno (Fattore V della coagulazione) e viene estratto ed amplificato in ogni campione, al fine di monitorare l'intera procedura.

Il kit comprende quattro pannelli di quattro calibratori per la quantificazione (12 test x 4 sedute) della carica virale.

Nel caso fosse necessario un numero maggiore di calibratori, è possibile utilizzare il kit accessorio "HBV Curva Standard" (NLM cod. GA030/2, da ordinare separatamente), che fornisce due pannelli supplementari.

Questo prodotto va utilizzato in abbinamento ai kit di estrazione automatica "QIASymphony® DSP Virus/Pathogen midi kit" (Qiagen/937055, cod. NLM AA1440/96) e semiautomatica "MagCore® Viral nucleic acid Large Volume extraction kit" (RBCBioscience/ MVN1200, cod. NLM AA1507/96) (da ordinare separatamente).

Il DNA estratto è amplificato tramite real time PCR, utilizzando lo strumento CFX (BioRad).

Alla mix pronto uso è stato aggiunto l'enzima Uracil-DNA Glicosilasi (UNG) per prevenire la possibile contaminazione dovuta a prodotti di amplificazione.

HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 è indicato, insieme agli altri parametri di laboratorio ed al quadro clinico dei pazienti, per la gestione clinica dei pazienti affetti da HBV. Il dispositivo non va utilizzato come test di screening per la presenza di DNA di HBV nei donatori di sangue. Il kit è da ritenersi per il solo uso professionale.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite B (HBV) è il responsabile di uno dei più comuni e gravi problemi di salute pubblica al mondo. Si calcola infatti che centinaia di milioni di persone al mondo siano affette da un'infezione da HBV che, in fase cronica, è in grado di causare considerevoli danni al fegato in seguito a sviluppo di cirrosi epatica e carcinoma epatocellulare (HCC)^{1,2}. Il miglioramento delle condizioni socioeconomiche, gli estesi programmi di vaccinazione e i trattamenti antivirali utilizzati hanno portato ad un abbassamento dell'incidenza in aree in cui la malattia era considerata endemica^{3,4}; per contro, gli spostamenti più frequenti e i flussi migratori hanno determinato un incremento della malattia in paesi in cui HBV era meno diffuso⁵.

HBV è trasmesso attraverso l'esposizione di cute o mucose a fluidi corporei infetti, in seguito a contatto sessuale, trasfusioni o a causa della trasmissione perinatale da una madre infetta al suo bambino⁶.

HBV è un membro della famiglia degli *Hepadnaviridae* ed è caratterizzato da un DNA circolare parzialmente a doppia elica di circa 3200 nucleotidi che si replica attraverso la trascrizione inversa di un intermedio a RNA. Il genoma è organizzato in quattro Open Reading Frame (ORF) parzialmente o totalmente sovrapposte (ORF S, C, X e P) che codificano per: HBsAg (ORF S), proteine di superficie coinvolte nell'ingresso del virus nella cellula ospite; HBcAg (ORF C), proteina core che forma il nucleocapside; proteina X (ORF X), essenziale per la replicazione virale e con attività transattivante; polimerasi (ORF P) che funziona come trascrittasi inversa, DNA polimerasi e possiede anche attività di RNasi H⁷.

La quantificazione di HBV circolante nel sangue svolge un ruolo importante nel monitoraggio di HBV e nella valutazione della risposta alla terapia virale⁸.

Nel mondo sono stati identificati dieci diversi genotipi di HBV (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J), che hanno una caratteristica distribuzione geografica e che differiscono tra loro per una percentuale superiore al 7.5%^{9,10}. Sono state inoltre identificate forme ricombinanti del virus che coinvolgono diversi genotipi. Il genotipo del virus e la presenza di mutazioni influiscono sul decorso della malattia e influenzano la scelta del trattamento antivirale da utilizzare^{11,12,13}

La presenza di antigeni o anticorpi in pazienti con infezione da HBV ha portato allo sviluppo di test immunosierologici specifici che hanno ridotto, ma non completamente eliminato, l'incidenza di infezione post-trasfusionale da epatite B^{14,15}. La ricerca del DNA virale mediante PCR ha permesso invece di monitorare la presenza del virus anche in casi in cui HBV potrebbe non essere rilevato dai test immunologici^{16,17}. Test molecolari sempre più sensibili possono quindi fungere da "aiuto diagnostico" non solo per la terapia convenzionale ma anche per lo sviluppo e l'applicazione della nuova generazione di farmaci¹⁸.

BIBLIOGRAFIA

1. Lanini S, Ustianowski A, Pisapia R, Zumla A, Ippolito G. Viral Hepatitis: Etiology, Epidemiology, Transmission, Diagnostics, Treatment, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am.* 2019; 33(4):1045-1062
2. Leoni MC, Ustianowski A, Hamzah Farooq H and Arends JE. HIV, HCV and HBV: a review of parallels and differences. *Infect Dis Ther* 2018; 7:407-419
3. Bitton Alaluf M and Shlomai A. New therapies for chronic hepatitis B. *Liver International* 2016; 36: 775 -782
4. Chen CL, Yang JY, Lin SF, Sun CA, Bai CH, You SL, Chen CJ, Kao JH, Chen PJ. Slow decline of hepatitis B burden in general population: Results from a population-based survey and longitudinal follow-up study in Taiwan. *J Hepatol* 2015; 63: 354-636
5. Coppola N, Alessio L, Gualdieri L, Pisaturo M, Sagnelli C, Caprio N, Maffei R, Strace M, Angelillo IF, Pasquale G, Sagnelli E. Hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infection in undocumented migrants and refugees in southern Italy, January 2012 to June 2013. *Euro Surveill* 2015;20:30009
6. Kao J and Chen D. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:395-403
7. Nguyen DH, Ludgate L and Hu J. Hepatitis B Virus-Cell Interactions and Pathogenesis. *J Cell Physiol.* 2008; 216(2): 289–294
8. Liaw YF. Clinical utility of HBV surface antigen quantification in HBV e antigen-negative chronic HBV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(10):631-641
9. Lin CL and Kao JH. Hepatitis B Virus Genotypes and Variants. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5
10. Bell TG, Yousif M and Kramvis A. Bioinformatic curation and alignment of genotyped hepatitis B virus (HBV) sequence data from the GenBank public database. *SpringerPlus* 2016; 5:1896
11. Sanbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol* 2014; 20(18): 5427-5434
12. Lin CL and Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2011;26 Suppl. 1; 123–130

13. Lin CL and Kao JH. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31(3): 249-255
14. Saraswat S, Banerjee K, Chaudhury N, Mahant T, khandekar P, Gupta RK, and Naik S. Post-transfusion hepatitis type B following multiple transfusion of HBsAg-negative blood. *J of Hepatol* 1996; 25:639-643
15. Wang T, Cui D, Chen S, Xu X, Sun C, Dai Y, Cheng J. Analysis of clinical characteristics and S gene sequences in chronic asymptomatic HBV carriers with low-level HBsAg. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2019; 43(2): 179-189
16. Hayer J, Jadeau F, Deleage G, Kay A, Zoulim F and Combet C. HBVdb: a knowledge database for Hepatitis B Virus. *Nucleic Acids Research*, 2013, Vol. 41
17. Stramer SL, Wend U, Candotti D, Foster GA, B.A., F B Hollinger, Dodd RY, Allain JP and Gerlich W. Nucleic Acid Testing to Detect HBV Infection in Blood Donors. *M.DN Engl J Med* 2011;364:236-47
18. EASL 2017 Clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 2017 vol. 67: 370–398

⇒ PRINCIPIO DEL TEST

HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 si basa su due processi:

1. estrazione del DNA virale
2. amplificazione e rivelazione delle sequenze bersaglio mediante Real Time PCR

Il Controllo Interno (Fattore V della coagulazione) è endogeno e viene estratto assieme al campione, permettendo di monitorare l'andamento di tutto il saggio (compresa l'integrità del campione di partenza).

Vengono inoltre forniti quattro pannelli di quattro calibratori ciascuno per determinare la quantità di DNA di HBV presente nei campioni clinici.

1. Estrazione del DNA virale

Per l'estrazione del DNA di HBV e del Controllo Interno (CI) a partire da campioni di plasma umano utilizzare i kit QIASymphony "DSP Virus/Pathogen midi kit" (cod. NLM AA1440/96) o MagCore "Viral nucleic acid extraction kit Large Volume" (cod. NLM AA1507/96).

2. PCR e Rivelazione

Target selezionato per l'amplificazione

La regione HBsAg è stata scelta come target per l'identificazione del virus in campioni di plasma umano poiché si tratta di una regione altamente conservata fra i diversi genotipi di HBV.

Il CI ha una sequenza interna di lunghezza e composizione simile a quella di HBV e primers e sonda unici che differenziano il CI da HBV.

I calibratori sono stati ottenuti da diluizioni seriali di un DNA sintetico clonato dalla regione HBsAg di HBV, pertanto necessitano degli stessi primers e della stessa sonda di HBV target per la Real Time PCR.

Amplificazione

Successivamente alla fase di estrazione, il DNA HBV e CI sono amplificati in Real time PCR, utilizzando enzimi e reagenti opportunamente selezionati.

Rivelazione

Il test si basa sulla Real-time PCR, tecnica che permette di monitorare in tempo reale l'amplificazione dei campioni d'interesse, utilizzando sonde doppiamente marcate con un fluoroforo donatore e un quencher (chimica "dual labeled probe"). La PCR avviene in presenza di due sonde specifiche rispettivamente per il controllo interno e per la regione HBsAg del virus. A ciascuna sonda è legato un diverso fluoroforo donatore, FAM per HBV e JOE per il controllo interno. In presenza di una fonte luminosa, quando le sonde sono intatte e donatore e quencher su ciascuna sonda sono vicini, la fluorescenza emessa dal fluoroforo donatore è assorbita dal fluoroforo quencher. Durante l'amplificazione le sonde si appaiano ciascuna al proprio target specifico e sono quindi soggette all'attività nucleasica 5'→3' della DNA polimerasi. I fluorofori donatore ed accettore si separano e la fluorescenza del donatore può così essere rilevata alla sua lunghezza d'onda specifica. In questo modo l'amplificazione del DNA virale e del CI può essere monitorata nel corso della reazione.

Lo strumento CFX (BioRad) comprende in un singolo strumento un termociclatore per l'amplificazione del target ed un dispositivo per la rilevazione della fluorescenza durante i cicli di PCR. Un computer collegato al sistema raccoglie i dati di fluorescenza che vengono visualizzati in un grafico mediante un apposito software (*Figura 1*).

Dopo la raccolta dei dati viene effettuata l'analisi. Il dato grezzo è normalizzato per correggere il segnale di fondo, successivamente viene impostato il livello di soglia in corrispondenza del quale viene analizzato il segnale di fluorescenza (*Figura 2*).

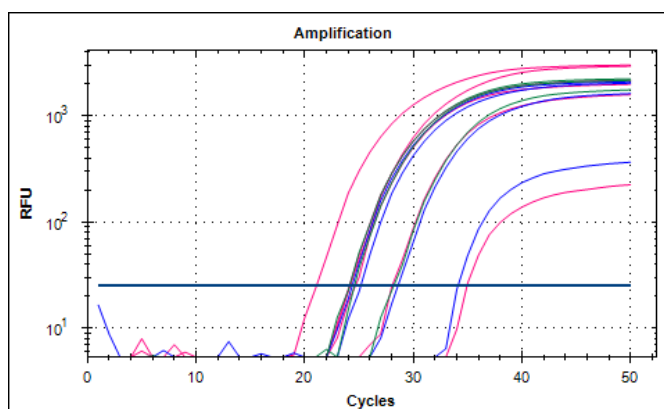
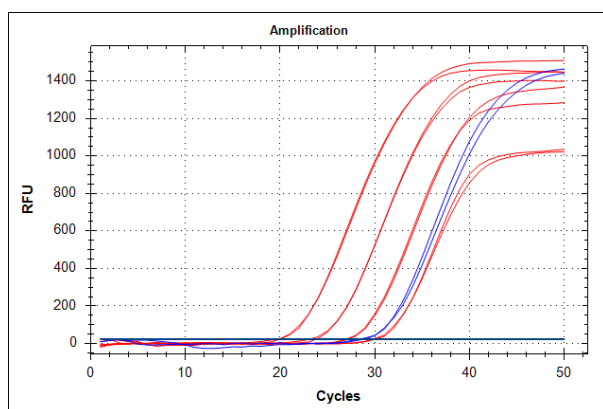


Figura 1: il dato grezzo è riportato in un grafico come valori di fluorescenza rispetto al numero di cicli.

Figura 2: il dato normalizzato è riportato in un grafico in scala logaritmica come fluorescenza rispetto al numero di cicli.

Il numero di cicli necessari ad un campione per raggiungere la linea di soglia è chiamato Ct (ciclo soglia) ed è in relazione alla quantità iniziale di DNA target: più alto è il titolo iniziale del target più precocemente si ha l'innalzamento del segnale di fluorescenza.

Se nella seduta vengono aggiunti degli standard con la rispettiva concentrazione, l'analisi della regressione lineare produce una curva standard in base alla quale si può determinare la concentrazione dei campioni incogniti.

La curva standard viene generata automaticamente mediante un grafico che riporta il ciclo soglia (Ct) in funzione della concentrazione iniziale degli standard (UI/ml) e la retta di interpolazione dei punti che rappresentano gli standard (*Figura 3*).

Il titolo di ogni campione viene determinato posizionando il suo Ct sulla curva standard.

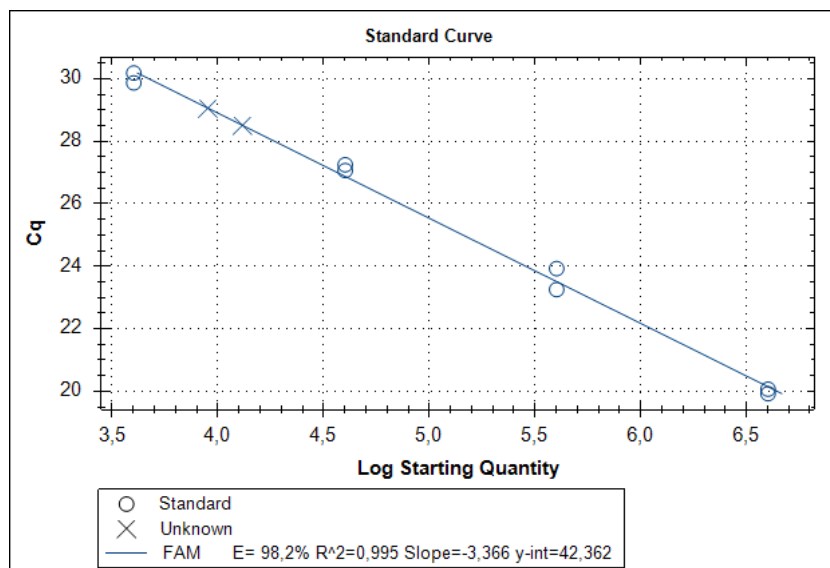


Figura 3: la curva standard è ottenuta mediante regressione lineare dei punti ottenuti riportando in grafico il Ct dei calibratori in funzione delle rispettive concentrazioni iniziali

Controllo della contaminazione dei prodotti di PCR

L'amplificazione viene eseguita in presenza di deossiridintrifosfato (dUTP) per generare prodotti di amplificazione selettivamente degradabili mediante utilizzo di uracil-N-glicosilasi (UNG) e calore. L'UNG scinde il legame glicosilico tra la base uracile e l'anello di deossiribosio, creando un sito abasico termosensibile. Un periodo di incubazione a +50°C prima della fase di amplificazione rimuove le basi di uracile da eventuali prodotti contaminanti presenti nella miscela di reazione. L'enzima UNG termolabile viene inattivato completamente e irreversibilmente dall'aumento della temperatura durante i successivi cicli di amplificazione, impedendo la rimozione dell'uracile dal DNA appena sintetizzato

➔ **COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO** (Conservare a -25/-15°C)

Componenti	Quantità
HBV MIX mix pronta all'uso comprensiva di primer, sonde, enzima di amplificazione ed UNG	2x 1000 µl
No Template Control (NTC) Acqua da utilizzare come NTC, a partire dallo step di purificazione	4 x 1300 µl
Acqua RNasi, DNasi e Proteasi free Acqua per ricostituire i calibratori	2 x 400 µl
Set di calibratori 1, 2, 3, 4 Templato di DNA di HBV liofilo	4 set

I volumi dei componenti indicati in tabella sono riferiti alla pezzatura standard del kit. Confezionamenti ridotti sono disponibili su richiesta per valutazione e/o dimostrazione del prodotto.

⇒ STABILITA' E CONSERVAZIONE

- Tutti i reagenti, aperti o chiusi, sono stabili sino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati a -15/-25°C.
- Scongellare i reagenti in ghiaccio o a +2/+8°C.
- La **HBV Mix** risulta stabile per un massimo di 5 cicli di gelo-scongelo. In caso si preveda un numero maggiore di scongelamenti si consiglia di aliquotare.
- La **HBV Mix** contiene i fluorofori FAM e JOE che sono fotosensibili: evitare prolungate esposizioni alla luce.
- La **HBV Mix** è pronta all'uso; dopo dispensazione nelle provette/piastra da PCR, evitare prolungate esposizioni alla luce.
- I Calibratori sono da risospendere in acqua RNasi, DNasi e Proteasi free (fornita) poco prima dell'uso; si raccomanda di dispensarli nelle provette/piastra di amplificazione solo dopo aver dispensato i campioni nelle rispettive provette, onde evitare contaminazioni.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

Il DNA virale viene isolato e purificato partendo da campioni di **plasma** preparati entro 6 ore dal momento del prelievo.

- Raccogliere i campioni di sangue secondo le comuni precauzioni per i prelievi di sangue.
- Utilizzare provette sterili. Usare solo EDTA come anticoagulante; altre tipologie di anticoagulanti potrebbero interferire con la corretta esecuzione del test. Centrifugare a 1000-1500 x g per 10-15 minuti per separare il plasma.
- ⇒ - Prelevare il quantitativo di plasma necessario per l'estrazione del DNA (1200 µl per cod. NLM AA1507/96, 700 µl per cod. NLM AA1440/96) sotto cappa a flusso laminare verticale operando in modo da evitare la degradazione del DNA.
- Conservare i campioni a +2/+8°C fino al momento dell'estrazione. Se non si procede immediatamente, si consiglia di conservare i campioni congelati a -25/-15°C fino a 72 ore oppure a ≤ -70°C per periodi più lunghi.
- Nel caso i campioni siano stati congelati, si consiglia di scongelarli a +2/+8°C e di centrifugarli a 1000-1500 x g per 10-15 minuti per evitare l'interferenza delle crioglobuline.
- Evitare ripetuti congelamenti/scongelamenti dei campioni di plasma.
- I campioni vanno manipolati seguendo le buone pratiche di laboratorio e devono essere considerati come pericolosi in quanto potenziale fonte di infezione.

⇒ PRECAUZIONI

- La procedura va eseguita da personale competente utilizzando le buone pratiche di laboratorio ed i comuni dispositivi di protezione individuale.
 - L'utilizzo delle seguenti precauzioni, insieme alla presenza dell'UNG, permette di ridurre al minimo il rischio di contaminazione incrociata:
 - ✓ Separare fisicamente le due aree di lavoro:
 - Zona 1: pre-PCR (manipolazione dei campioni, estrazione e dispensazione della HBV Mix)
Prestare attenzione a non contaminare la mix durante la dispensazione
 - Zona 2: post PCR (Real Time PCR)
- Ogni area deve essere rifornita di attrezzatura e consumabili dedicati (camici da laboratorio, centrifughe, pipette, provette, etc).
- ✓ L'ambiente di lavoro deve essere organizzato in modo che il flusso proceda in modo unidirezionale, dalla zona di pre-PCR all'area post-PCR.

- ✓ Al termine della procedura si raccomanda di pulire le aree di lavoro (banconi e cappe) con candeggina diluita al 5-10%, preparata al momento (la concentrazione finale di ipoclorito di sodio deve essere 0,5% w/v). Per la pulizia degli strumenti fare riferimento alle raccomandazioni fornite dal fabbricante.
 - ✓ Tutti i consumabili (puntali e provette) devono essere privi di DNAsi ed RNAsi. I puntali devono avere il filtro per evitare la contaminazione delle pipette. Sostituire i puntali dopo ogni trasferimento di liquido.
 - ✓ Utilizzo di cappe a flusso laminare dotate di UV
 - ✓ Cambiare i guanti frequentemente
 - ✓ L'assenza di contaminazioni viene garantita dall'analisi in ogni seduta di un NTC, che permette di monitorare l'intera procedura a partire dalla fase di estrazione.
- Smaltire il materiale utilizzato secondo i regolamenti locali e nazionali vigenti
 - Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree preposte all'esecuzione del test.
 - Se vi è esposizione di occhi, cute o mucose alle sostanze utilizzate, lavare abbondantemente con acqua e contattare al più presto un medico.
 - Non utilizzare reagenti scaduti.
 - Non mischiare **HBV mix** di lotti diversi.
 - Non utilizzare il kit se la confezione è danneggiata. Contattare il fornitore.
 - E' opportuno assicurare una temperatura il più possibile costante ed uniforme in laboratorio ed evitare di posizionare gli strumenti in prossimità di fonti di calore/raffreddamento che possano comprometterne il corretto funzionamento.

⇒ MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

ZONA 1

Estrattore di acidi nucleici e relativi consumabili

Kit di estrazione del DNA

Cappa a flusso laminare verticale dotata di lampada UV

Set dedicato di micropipette a volume variabile

Puntali con filtro e provette monouso da 2 e da 1,5ml DNAsi ed RNAsi free

Vortex

Centrifuga

Strip o piastre per Real Time PCR DNAsi e RNAsi free

ZONA 2

CFX (BioRad) e software

PROCEDIMENTO

ESTRAZIONE DEL DNA VIRALE

⇒ Kit di estrazione da utilizzare:

- ESTRAZIONE AUTOMATICA QIASymphony **cod. NLM AA1440/96.**
- ESTRAZIONE SEMI-AUTOMATICA MagCore **cod. NLM AA1507/96**

Per la preparazione, l'utilizzo e lo smaltimento dei reagenti fare riferimento alle istruzioni d'uso specifiche del sistema di estrazione utilizzato.

Per la preparazione dei campioni di plasma è necessario attenersi al protocollo relativo alla metodica specifica.

Utilizzare i volumi indicati in tabella

sistema di estrazione	Volume di partenza	Volume di eluizione
estrazione semi-automatica MagCore (cod. NLM AA1507/96).	1200 µl	60 µl
estrazione automatica con QIASymphony (cod. NLM AA1440/96 – protocollo Cell free 500)	700 µl	60 µl

Il DNA purificato può essere conservato a +2/+8°C se utilizzato entro breve, altrimenti conservarlo a -25/-15°C o preferibilmente a ≤-70°C per periodi più lunghi. Si raccomanda di scongelare a +2/+8°C.

⇒ REAL TIME PCR

- Impostare il profilo termico prima di dispensare la HBV Mix
- **Miscelare bene la HBV Mix prima dell'utilizzo**
- Miscelare delicatamente e dispensare nelle piastre/strip **25 µl** di HBV Mix per ogni campione + 1 NTC + 4 calibratori
- Aggiungere in ciascuna provetta **25 µl** del rispettivo DNA estratto o di NTC e **miscelare pipettando su e giù.**
- Aggiungere ai calibratori **30 µl** di acqua RNasi, DNasi e Proteasi free, risospendere bene, prelevare **25 µl** e trasferirli nella piastra o strip.

ATTENZIONE: dispensare e miscelare la mix e i campioni molto attentamente, evitando la formazione di bolle. Centrifugare brevemente la piastra/strip prima di posizionarla nello strumento.

SETUP DELLA CORSA

Accendere PC e Strumento Real Time

Aprire il Software Bio-Rad CFX Manager e selezionare *Create new run*; nella finestra selezionare il modello di strumento utilizzato e cliccare *OK*; si apre il *Run Setup*

Si può creare un nuovo protocollo, selezionarne/modificarne uno pre-esistente o ripetere una corsa. (Per fare ciò, aprire la corsa desiderata e cliccare su *File - Repeat Run.*)

Creare un protocollo nuovo

- Protocol → create New (Figura 4)
- Protocol Editor – new
- Mettere il volume di reazione (**50 µl**) nel *Sample Volume* box.
- Selezionare *Insert Step* sulla sinistra della finestra ed inserire il seguente profilo termico (è possibile modificare le temperature e i tempi direttamente sul grafico o nel testo in basso con un doppio click):

1. 37°C for 10 min
2. 50°C for 15 min
3. 95° for 20 sec
4. 95°C for 15 sec
5. 60°C for 1 min; aggiungere **plate read** a questo step
6. Inserire **GOTO 4, 44 more times**

- Cliccare OK. Salvare il nuovo protocollo

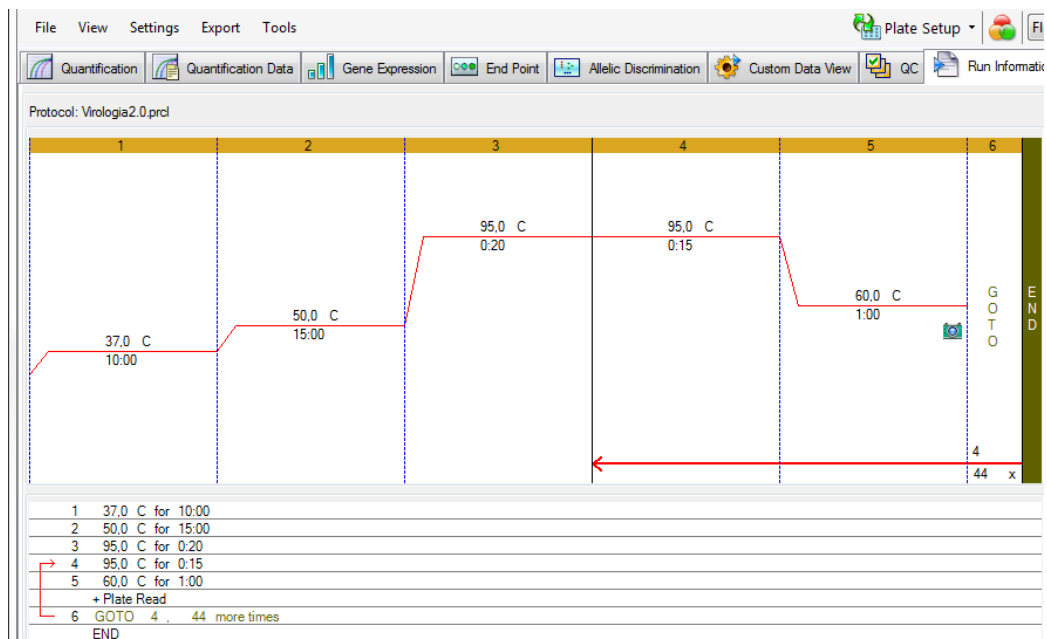


Figura 4

➔ SETUP DELLA PIASTRA

Selezionare *plate* nella finestra *Run setup*: è possibile creare una piastra nuova o selezionarne/modificarne una pre-esistente.

Creare una nuova piastra

- *Plate* → *create New*
- Si apre una nuova finestra *Plate Editor – new* (figura 5)
- Selezionare il tipo di plastica utilizzata: *Setting* → *Plate Type* → *BR clear*
- In *Scan Mode* selezionare *All channels*
- Cliccare *Select Fluorophores* e selezionare FAM e JOE/HEX
- Selezionare un pozzetto della piastra.
- Selezionare in *Sample Type* → *Unknown, Standard* o *NTC* a seconda della tipologia del campione
- Selezionare *Target Name*: *HBV* per FAM e *IC* per JOE/HEX e spuntare la casella *Load* per inserire i fluorofori (FAM e JOE/HEX per tutti i campioni tranne i calibratori, dove deve essere selezionato solo FAM).
- Selezionare *Sample Name*, scrivere il nome del campione e quindi spuntare la casella *Load* per inserirlo.
- Per i calibratori, inserire i corrispondenti valori di concentrazione riportati nell'etichetta interna alla scatola del lotto di appartenenza. Spuntare la casella *Load* per inserirli.
- Cliccare *OK*. Salvare la nuova piastra.

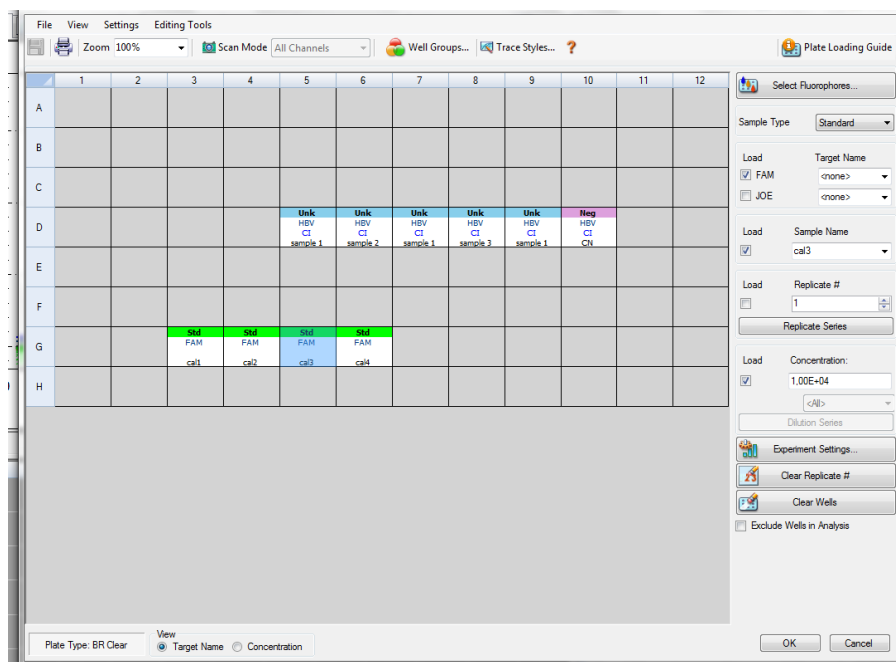


Figura 5

Selezionare/modificare protocollo o piastra esistente

- Se si desidera importare un profilo termico o una piastra precedentemente salvati (*.prcl) nel PC: selezionare *Select Existing* nella pagina del protocollo o della piastra.
- Se si vuole modificare un protocollo o una piastra esistenti, selezionare *Select Existing* e poi *Edit Select*.
- Procedere poi come spiegato sopra.



AVVIO DELLA SEDUTA

- Preparare la piastra/strip con campioni e mix.
- Nella finestra Run Setup, selezionare *Start Run seguito da Open Lid*, in seguito posizionare la piastra/strip nello strumento ed infine selezionare *Close Lid*
- Selezionare *Start Run* per iniziare.
- Si apre la finestra *Run Details*. Nella sottofinestra *Real Time Status* si può monitorare l'andamento del dato grezzo durante la corsa.

ANALISI DEI DATI

Alla fine della corsa si aprirà automaticamente la finestra *Data Analysis* → *Quantification*.

Per escludere un campione/calibratore dall'analisi, andare in *plate setup-view / edit plate*, selezionare il pozzetto corrispondente e spuntare la casella *Exclude well in analysis*.

Analizzare i dati di FAM e JOE/HEX separatamente.

a) **FAM** (Figura 6): deselezionare JOE/HEX nella finestra di amplificazione.

In alto a sinistra selezionare *Settings* e impostare:

- *Cq determination mode: single threshold*
- *Analysis mode: Baseline subtracted curve fit*
- *Baseline threshold: Single Threshold-User defined*-introdurre il valore **200**. Cliccare *OK*

Il grafico sulla sinistra mostra il dato di amplificazione (scala lineare o log), il grafico a destra mostra la curva standard. Il valore R^2 deve approssimare il più possibile il valore 1. Se la retta di interpolazione non si adatta bene ad uno dei quattro calibratori (ad es. in presenza di un Ct al di fuori del corrispondente RANGE di accettabilità riportato all'interno della confezione), quel calibratore può essere escluso dall'analisi in modo da ottenere una migliore approssimazione della retta stessa ai punti rimanenti; questo permette una quantificazione più precisa dei campioni, senza alterare il significato clinico del risultato.

Se la retta di interpolazione non si adatta a più di un calibratore, la curva standard non può essere accettata e la seduta va ripetuta.

Considerare il risultato di FAM per i campioni validi: la concentrazione (UI/ml) calcolata per ogni campione viene riportata nella tabella dei risultati.

- Se la concentrazione calcolata è inferiore al limite di rilevazione, riportare il risultato come *HBV DNA < LOD*; in questo caso la riproducibilità del risultato positivo non è garantita.
- Se il campione presenta segnale positivo in JOE/HEX, ma non in FAM, interpretare il risultato come *HBV DNA non rilevato*
- I valori di concentrazione che ricadono all'esterno dell'intervallo lineare del saggio non possono essere considerati accurati, pertanto devono essere interpretati con cautela.
- Se la concentrazione calcolata è al di sopra del limite superiore di rilevazione, riportare il risultato come *HBV DNA >1,00E+08 UI/ml*. Se si vuole ottenere un risultato più accurato, il test va ripetuto utilizzando il campione di plasma di partenza diluito con plasma negativo. La concentrazione calcolata dovrà essere moltiplicata per il fattore di diluizione per ottenere la concentrazione iniziale di quel campione.

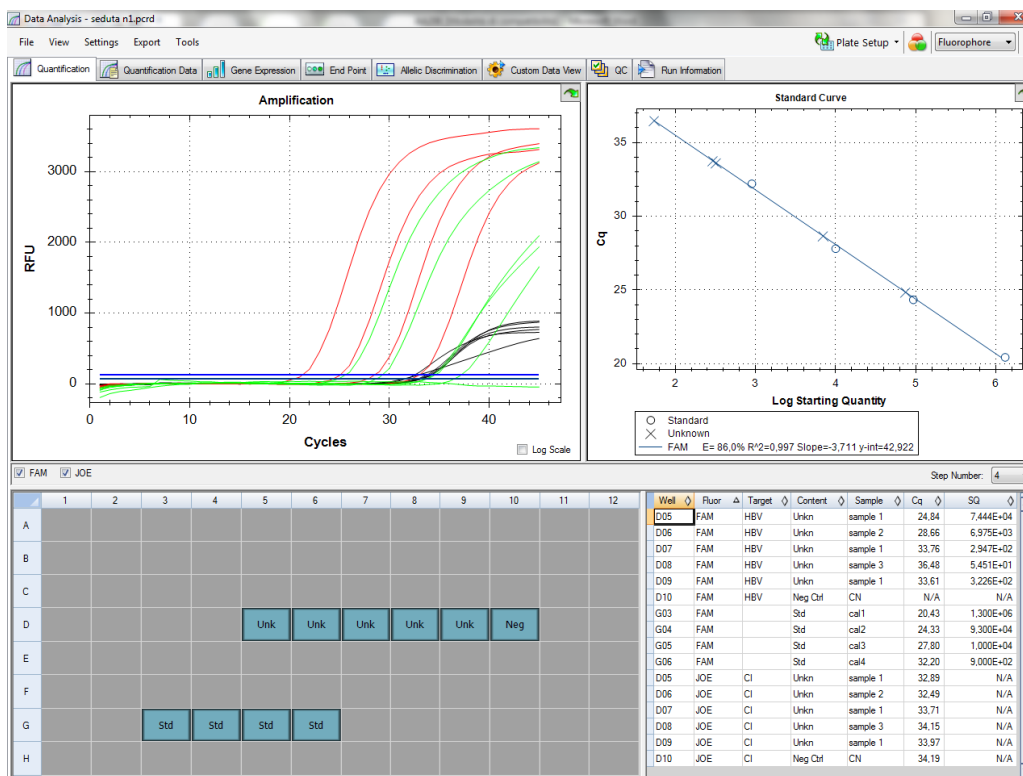


Figura 6:

b) **JOE/HEX:** deselezionare FAM nella finestra di quantificazione. In alto a sinistra selezionare *Settings* e impostare:

- *Cq determination mode: single threshold*
- *Analysis mode: Baseline subtracted curve fit*
- *Baseline threshold: Single Threshold-User defined*-introdurre il valore **100**. Cliccare **OK**

Considerare il Ct di JOE/HEX per i campioni ed interpretare il risultato come segue:

	JOE/HEX Ct	Interpretazione
Campione	Presente	Valido
	Assente	Non Valido*

(*) In assenza del segnale del C.I. nei campioni il risultato non può essere confermato, quindi la seduta deve essere ripetuta a partire dall'estrazione. Tuttavia in presenza di HBV DNA ad alto titolo ($> 10^8$ IU/ml) l'assenza di segnale del CI potrebbe essere dovuta alla competizione tra il target specifico di HBV ed il CI; in questo caso il risultato positivo per HBV può essere ritenuto valido.

Se nella seduta viene analizzato anche il NTC, interpretare i risultati come segue:

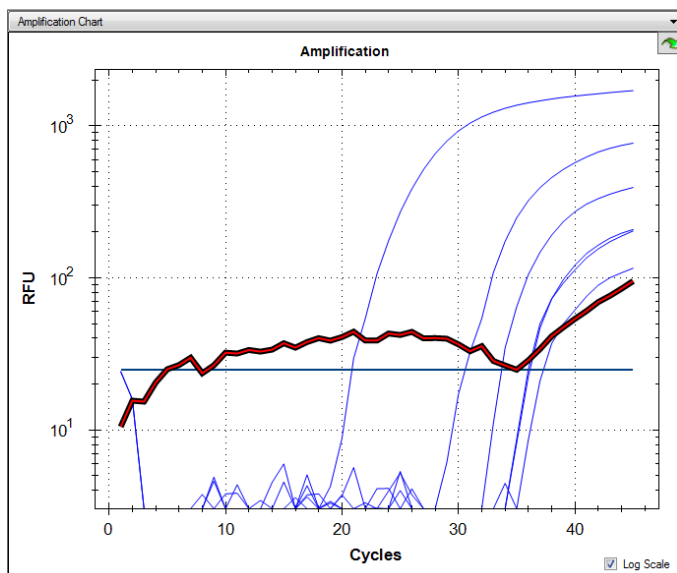
	FAM Ct	JOE/HEX Ct	Interpretazione
No Template Control	Assente	Assente	Valido
	Presente	Assente	Non Valido *
	Assente	Presente	
	Presente	Presente	

(*) Possibile contaminazione.

Per creare un report finale digitare *Tools* → *Reports* e selezionare/deselezionare le informazioni di interesse.

ATTENZIONE: per una corretta interpretazione dei risultati, prestare sempre attenzione al grafico della seduta.

Esempio1 (*Figura 7a*): il campione evidenziato in rosso nel grafico sembra mostrare un Ct positivo (35), ma dal grafico si evidenzia un artefatto strumentale. Il valore trovato di Ct non deve essere preso in considerazione e il campione deve essere ripetuto.



Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	SQ
C03	FAM		Unkn		35,03	5,971E+01
C06	FAM		Unkn		36,00	3,097E+01
C07	FAM		Unkn		37,25	1,332E+01
C08	FAM		Std-1		36,10	8,000E+01
C09	FAM		Std-1		33,59	8,000E+01
C10	FAM		Std		30,51	8,000E+02
E03	FAM		Unkn		N/A	N/A
E04	FAM		Std		20,78	1,000E+06

Figura 7°

Esempio 2 (*Figura 7b I e 7b II*): se il rumore di fondo della fluorescenza all'inizio della curva risulta troppo disomogeneo o compaiono degli artefatti, è possibile migliorare l'andamento delle curve selezionando Settings ed impostando:

- *Apply Fluorescence Drift Correction* oppure, in alternativa, *Baseline cycles*; in questo caso selezionare *User defined* ed impostare i valori da **10** a **20**
- Al termine delle operazioni sopra descritte verificare se il Ct dei calibratori ricade nel range assegnato

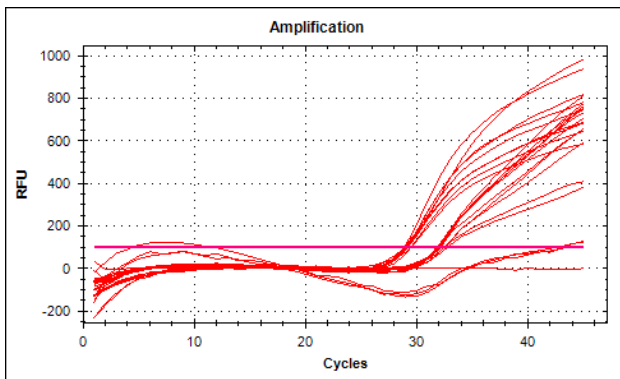


Figura 7b I

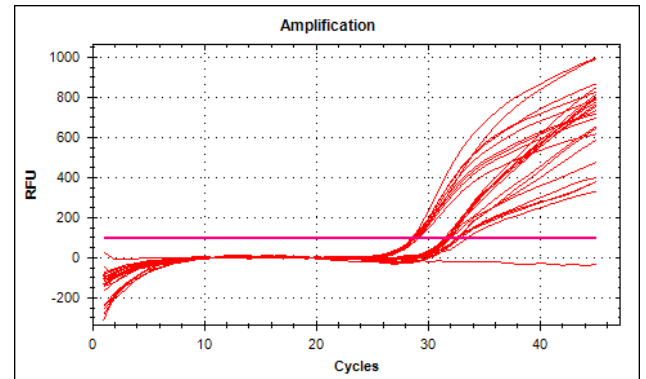


Figura 7b II

AVVERTENZE

- In caso di assenza del segnale atteso di JOE/HEX è consigliabile ripetere la seduta.
- I calibratori non hanno il C.I., quindi non ci si deve attendere il segnale di JOE/HEX.
- In caso di contaminazione è importante risalire all'origine (fase di estrazione e/o PCR). L'utilizzo dei controlli forniti può essere d'aiuto per assicurare le corrette prestazioni del test e per l'identificazione dell'origine di tale problema.

➔ CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Specificità

La specificità del kit HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 è stata determinata analizzando 104 campioni di plasma negativo per HBV. Non sono stati ottenuti risultati falsi positivi. In accordo con tali dati la specificità del kit è pari al 100%.

Sensibilità analitica

La sensibilità è stata determinata analizzando quattro diluizioni scalari del IV Standard Internazionale HBV WHO (NIBSC codice 10/266). Per le diluizioni è stato utilizzato un plasma negativo per HBV DNA ed anticorpi anti-HBV. L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, estrazione compresa. Come indicato nella tabella sottostante, il limite di rilevazione per HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 è **<8 UI/ml** (Probit analysis al 95%, eseguita con il programma XLSTAT 2014.).

QIASymphony cod. NLM AA1440/96:

Diluizioni	N tot. repliche	N tot. positivi	% positivi
A (31 UI/ml)	28	28	100%
B (10 UI/ml)	28	28	100%
C (5 UI/ml)	28	23	82,14%
D (2,5 UI/ml)	28	20	71,43%
LOD= 7,04 UI/ml			

*L'analisi Probit è stata eseguita con il programma XLSTAT 2014.

MagCore cod. NLM AA1507/96:

Diluizioni	N tot. repliche	N tot. positivi	% positivi
A (31 UI/ml)	28	28	100%
B (10 UI/ml)	28	28	100%
C (5 UI/ml)	28	22	78,57%
D (2,5 UI/ml)	28	18	64,28%
LOD= 7,84 UI/ml			

*L'analisi Probit è stata eseguita con il programma XLSTAT 2014.

Intervallo di linearità

Per valutare l'intervallo di linearità di quantificazione del dispositivo sono stati preparati 14 punti di diluizioni seriali partendo da campioni reali HBV positivi ad alto titolo diluiti in plasma umano HBV negativo. L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, con entrambe le estrazioni, utilizzando due differenti lotti di reagenti. Per ciascun punto di diluizione sono state testate almeno 16 repliche.

Diluizione	Titolo (UI/ml)
A	1×10^8
B	$3,3 \times 10^7$
C	1×10^7
D	$3,3 \times 10^6$
E	1×10^6
F	$3,3 \times 10^5$

G	1×10^5
H	$3,3 \times 10^4$
I	1×10^4
L	$3,3 \times 10^3$
M	1×10^3
N	$3,3 \times 10^2$
O	1×10^2
P	$3,3 \times 10^1$

Come mostrato nelle figure sottostanti (*Figura 8.1 e Figura 8.2*), il kit HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 ha fornito una risposta lineare da $3,30 \times 10^1$ UI/ml fino ad almeno $1,00 \times 10^8$ UI/ml, utilizzando come criterio di accettazione il valore $\pm 0,3 \log_{10}$.

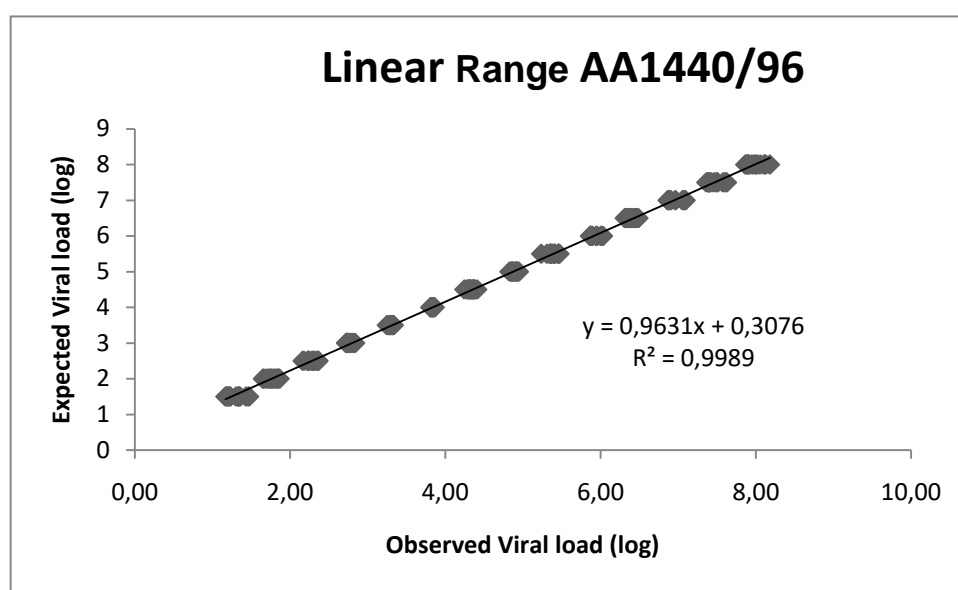


Figura 8.1 Intervallo di linearità con QIASymphony cod. NLM AA1440/96

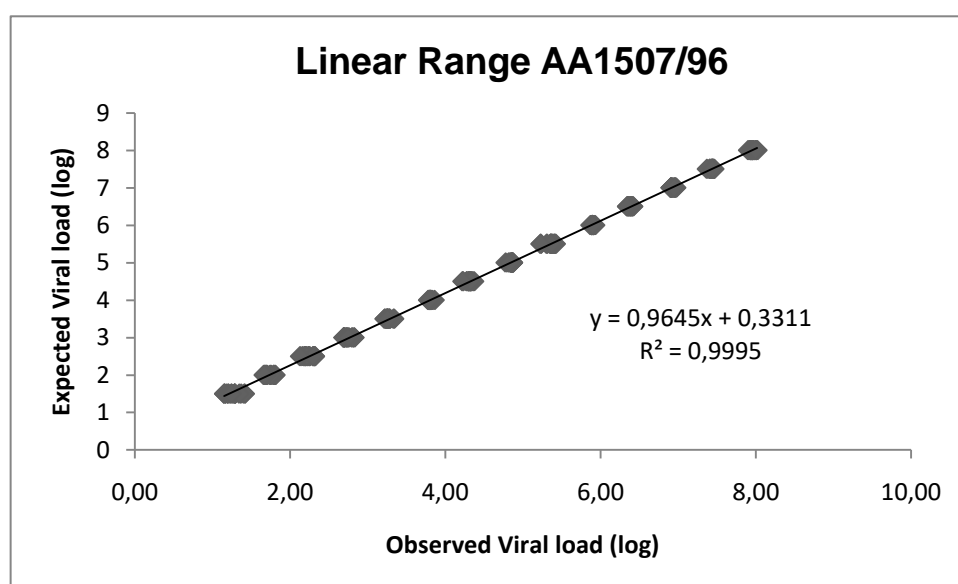


Figura 8.2 Intervallo di linearità con MagCore cod. NLM AA1507/96

Precisione

Precisione intra-saggio

La precisione intra-saggio è stata valutata utilizzando 6 campioni positivi con titoli differenti. Due differenti operatori hanno testato tre replicati per ogni punto di diluizione utilizzando lo stesso lotto di reagenti. I risultati delle prove di precisione intra-saggio sono riportati nella tabella sottostante.

Titolo (UI/ml)	3,5x10 ⁷	3,2x10 ⁶	2,8x10 ⁵	2,2x10 ⁴	1,8x10 ³	1,03x10 ²
CV%	9,12	4,12	11,31	4,80	7,45	10,66

Precisione inter-saggio

La precisione inter-saggio è stata valutata utilizzando gli stessi campioni usati per la precisione intra-saggio.

Due differenti operatori hanno testato tre repliche per ogni punto di diluizione in differenti sedute eseguite in diversi giorni, utilizzando tre differenti lotti di reagenti.

L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, usando indifferentemente entrambe le estrazioni; in questo modo la precisione è stata valutata per tutti i passaggi della procedura.

I risultati delle prove di precisione inter-saggio sono riportati nella tabella sottostante.

Titolo (UI/ml)	3,5x10 ⁷	3,2x10 ⁶	2,8x10 ⁵	2,2x10 ⁴	1,8x10 ³	1,03x10 ²
CV%	9,86	6,65	11,30	3,74	10,47	11,24

Genotipi

Le prestazioni del kit HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 rispetto ai diversi genotipi di HBV sono state valutate analizzando diluizioni seriali di campioni HBV positivi per i genotipi più rilevanti (A-H).

Sono stati utilizzati campioni inclusi in pannelli commerciali.

Punti di diluizione analizzati:

- Gen A:** from 1,26 x 10⁶ to 1,26 x 10¹ UI/ml
- Gen B:** from 8,32 x 10⁵ to 8,32 x 10¹ UI/ml
- Gen C:** from 1,23 x 10⁶ to 1,23 x 10¹ UI/ml
- Gen D:** from 1,07 x 10⁶ to 1,07 x 10¹ UI/ml
- Gen E:** from 7,24 x 10⁵ to 7,24 x 10¹ UI/ml
- Gen F:** from 5,75 x 10⁴ to 5,74 x 10¹ UI/ml
- Gen G:** from 6,03 x 10³ to 6,03 x 10¹ UI/ml
- Gen H:** from 2,63 x 10³ to 2,63 x 10¹ UI/ml

Come mostrato nella figura sottostante (*Figura 9*) la quantificazione dei diversi genotipi è confrontabile. L'efficienza di rilevazione del dispositivo HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0

è pertanto indipendente dai genotipi analizzati (criterio di accettazione: differenza massima tra concentrazione ottenuta e concentrazione attesa $\pm 0,5$ Log IU/ml).

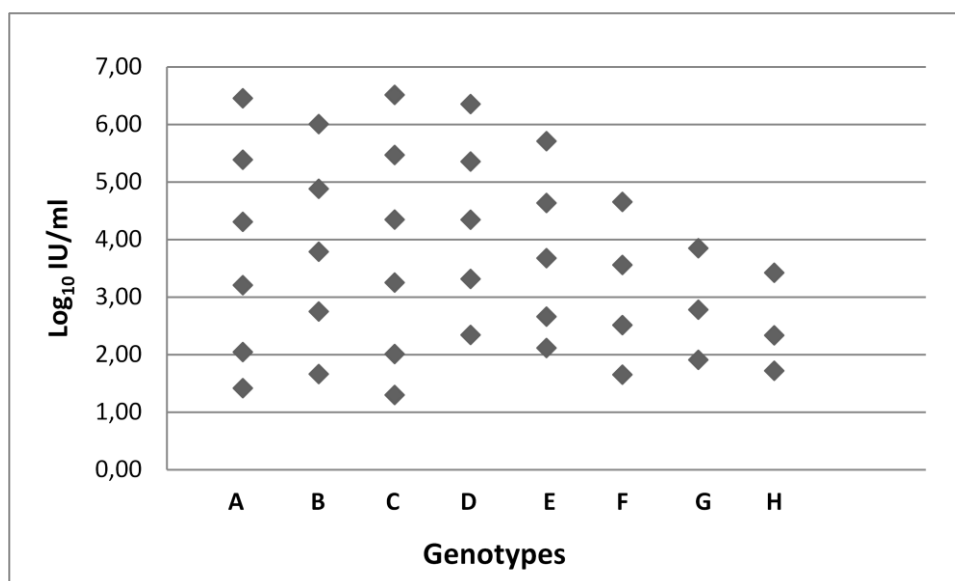


Figura 9

Marcatori potenzialmente cross reattivi

Per valutare la potenziale cross reattività di HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 con altri patogeni sono stati analizzati i seguenti campioni (provenienti da pazienti infetti):

Altri patogeni	N°campioni testati
HHV6	2
HCMV	2
EBV	2
VZV	2
BKV	2
Chlamydia trachomatis	3
Neisseria gonorrhoeae	3
HPV	3

Tutti i campioni HBV negativi testati hanno dato un risultato negativo. Pertanto il test HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 non ha evidenziato una cross reattività con altri patogeni.

Sostanze potenzialmente interferenti

Dati non disponibili.

Tasso globale di errore del sistema che porta a risultati falso-negativi

Per valutare la possibilità della presenza di falsi negativi, sono stati analizzati 110 campioni di plasma bassi positivi per HBV (circa 21 UI/ml, 3 volte superiore al valore della soglia di sensibilità). Il plasma di partenza è stato ottenuto diluendo campioni HBV positivi calibrati contro il IV Standard Internazionale HBV WHO (codice NIBSC 10/266) in plasma umano negativo.

Tutti i campioni positivi per HBV testati hanno dato un risultato positivo, quindi il dispositivo HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 non ha riportato falsi negativi.

Risultati Positivi	110
Risultati Negativi per Campioni Positivi	0

Assenza di cross-contaminazione

L'assenza di cross-contaminazione fra i campioni per l'intero flusso di lavoro è stata dimostrata alternando campioni ad alta carica virale e campioni negativi in 5 sedute; l'estrazione è stata effettuata con entrambe le metodiche, codd. NLM AA1440/96 e AA1507/96.

Tutti i campioni negativi testati hanno dato il risultato atteso negativo.

Il test HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO non ha evidenziato alcuna cross-contaminazione fra i campioni

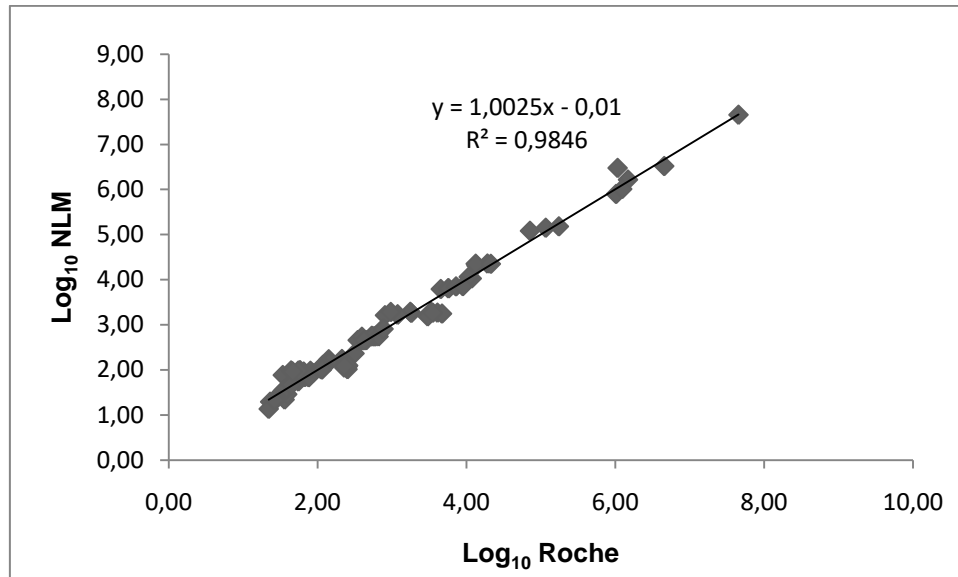
Robustezza











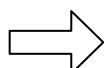
La robustezza del kit HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 è stata valutata aggiungendo diversi volumi di mix e di campione ($\pm 10\%$): 10 campioni di plasma bassi positivi per HBV (21IU/ml) sono stati testati con +10% di mix e campione e -10% di mix e campione.

Tutti i campioni hanno dato un risultato positivo, perciò il kit HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 è affidabile durante l'utilizzo di routine anche quando è sottoposto a piccole variazioni di volume.

Confronto con il sistema Roche Cobas TaqMan® HBV test in campioni di routine

Le prestazioni del dispositivo HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVO 2.0 sono state confrontate con quelle del sistema Roche Cobas TaqMan® HBV test mediante l'analisi di 103 campioni. L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, estrazioni incluse. I campioni provenivano dalla routine di un ospedale. I risultati ottenuti mostrano una buona correlazione tra i due dispositivi (figura 10).



					
Numero di lotto	Codice	Limiti di temperatura	Usare entro	Consultare le istruzioni per l'uso	
					
Conformità europea	Prodotto da	Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	Contenuto sufficiente per <x> tests	No Template Control	Testo modificato rispetto alla precedente versione

Instruction for use

Ver. 3 - 01/07/2020


Molecular Biology

Extraction not included

HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0

REF AA206/48

REF GA030/2

 48 TESTS

GMDN 63157

CE

0459

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

HEADQUARTER: Via Cascina Conighetto – BUSINESS OFFICES: Viale delle Industrie, 3 - 20049 SETTALA (MI), ITALY

Phone: (+39) 02/95.24.51 - Fax (+39) 02/95.24.52.37 - (+39) 02/95.24.52.38 WEB: www.nlm.it - E-MAIL: segreteria@nlm.it

ISO 9001 Quality Management System Organization certified and ISO 13485 Medical Sector Quality Management System certified (IMQ certification body - CSQ certification).

⇒ INTENDED USE

HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 provides ready to use master mix for quantitative determination of Hepatitis B Virus (HBV) in human plasma samples by Real Time PCR of the viral HBsAg DNA.

The endogenous Internal Control (Coagulation Factor V) is co-extracted and co-amplified in order to monitor all the procedure.

Four panels of four calibrators are included in the device for quantification (12 test X 4 runs).

If more calibrators are necessary, it is possible to use the accessory device "HBV Standard Curve" (NLM code GA030/2 to be ordered separately), that provides other two set.

The device has to be used in association with "QIASymphony® DSP Virus/Pathogen midi kit" (Qiagen/937055, NLM code AA1440/96) and "MagCore® Viral Nucleic Acid Large Volume Extraction Kit" (RBCBioscience/ MVN1200, NLM code AA1507/96) (sold separately).

Extracted DNA is amplified by Real Time PCR, using CFX (BioRad).

Uracil-DNA Glycosylase (UNG) has been introduced in the ready-to-use mix to prevent possible carry-over contamination.

HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 is intended for use in association with clinical presentation and other laboratory markers of HBV infection for the clinical management of patients. The test can be used to assess viral response to antiviral treatment as measured by changes in plasma HBV DNA levels.

The device is not intended for use as a screening test for the presence of HBV DNA in blood products or as a diagnostic test to confirm the presence of HBV infection.

The device is for professional use only.

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) is one of the most common and severe chronic viral infection in the world. Hundred million people worldwide are infected with HBV, that during the chronic phase, can cause a significant hepatic injury due to cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) ^{1,2}.

The improvement of socio-economical conditions, the extended vaccination programs and the antiviral treatments used, led to the reduction of disease incidence in areas where the infection was considered as endemic^{3,4}; quite the opposite, the more frequent transfers and the migratory flow caused the disease increment in countries where HBV was less common.⁵

HBV is transmitted by percutaneous or mucosal exposure to infectious body fluids, by sexual contact with an infected person, by blood transfusions, and perinatally from an infected mother to her infant⁶.

HBV is a member of the *Hepadnaviridae* family and it is characterized by circular, partially double-stranded DNA of approximately 3200 nucleotides, that replicates through the reverse transcription of an intermediate RNA. The genome is organized in 4 partially or totally overlapping open reading frames (ORFs, S, C, X and P) which encode for: HBsAg (ORF S), surface proteins involved in the host cell entry; the HBcAg (ORF C), the core protein of the nucleocapsid; the X protein (ORF X) which is essential for viral replication and has also transactivating potential; the polymerase (ORF P) that functions as a reverse transcriptase, DNA polymerase and RNase H activity.⁷

The quantification of blood circulating HBV has an important role in HBV-monitoring and in the therapy response evaluation⁸.

Ten genotypes of HBV have been identified worldwide (A, B, C, D, E, F, H, I and J); they have a characteristic geographical distribution and differ from each other by more than 7,5%^{9,10}.

Moreover some viral recombinant forms between different genotypes have been identified. The genotype and the presence of mutations affect the disease progression and the choice of the anti-viral treatment to be used.^{11,12,13}

The presence of HBV antigens or antibodies in patients infected with HBV has led to the development of specific immunoserological tests that reduced, but not completely eliminated, the incidence of post-transfusion hepatitis B infection.^{14,15}

The detection of viral DNA with PCR allows to monitor the virus presence even in cases that may not be detectable by the immunological tests^{16,17}.

New more sensitive molecular tests may act as “companion diagnostic” not only for the conventional treatment, but also for development and application of new generation therapy.¹⁸

REFERENCES

1. Lanini S, Ustianowski A, Pisapia R, Zumla A, Ippolito G. Viral Hepatitis: Etiology, Epidemiology, Transmission, Diagnostics, Treatment, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am.* 2019; 33(4):1045-1062
2. Leoni MC, Ustianowski A, Hamzah Farooq H and Arends JE. HIV, HCV and HBV: a review of parallels and differences. *Infect Dis Ther* 2018; 7:407-419
3. Bitton Alaluf M and Shlomai A. New therapies for chronic hepatitis B. *Liver International* 2016; 36: 775 -782
4. Chen CL, Yang JY, Lin SF, Sun CA, Bai CH, You SL, Chen CJ, Kao JH, Chen PJ. Slow decline of hepatitis B burden in general population: Results from a population-based survey and longitudinal follow-up study in Taiwan. *J Hepatol* 2015; 63: 354-636
5. Coppola N, Alessio L, Gualdieri L, Pisaturo M, Sagnelli C, Caprio N, Maffei R, Strace M, Angelillo IF, Pasquale G, Sagnelli E. Hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infection in undocumented migrants and refugees in southern Italy, January 2012 to June 2013. *Euro Surveill* 2015;20:30009
6. Kao J and Chen D. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:395-403
7. Nguyen DH, Ludgate L and Hu J. Hepatitis B Virus-Cell Interactions and Pathogenesis. *J Cell Physiol.* 2008; 216(2): 289–294
8. Liaw YF. Clinical utility of HBV surface antigen quantification in HBV e antigen-negative chronic HBV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(10):631-641
9. Lin CL and Kao JH. Hepatitis B Virus Genotypes and Variants. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5
10. Bell TG, Yousif M and Kramvis A. Bioinformatic curation and alignment of genotyped hepatitis B virus (HBV) sequence data from the GenBank public database. *SpringerPlus* 2016; 5:1896
11. Sanbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol* 2014; 20(18): 5427-5434
12. Lin CL and Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2011;26 Suppl. 1; 123–130
13. Lin CL and Kao JH. Natural history of acute and chronic hepatitis B: The role of HBV genotypes and mutants. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017;31(3): 249-255

14. Saraswat S, Banerjee K, Chaudhury N, Mahant T, khandekar P, Gupta RK, and Naik S. Post-transfusion hepatitis type B following multiple transfusion of HBsAg-negative blood. J of Hepatol 1996; 25:639-643
15. Wang T, Cui D, Chen S, Xu X, Sun C, Dai Y, Cheng J. Analysis of clinical characteristics and S gene sequences in chronic asymptomatic HBV carriers with low-level HBsAg. Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2019; 43(2): 179-189
16. Hayer J, Jadeau F, Deleage G, Kay A, Zoulim F and Combet C. HBVdb: a knowledge database for Hepatitis B Virus. Nucleic Acids Research, 2013, Vol. 41
17. Stramer SL, Wend U, Candotti D, Foster GA, B.A., F B Hollinger, Dodd RY, Allain JP and Gerlich W. Nucleic Acid Testing to Detect HBV Infection in Blood Donors. M.DN Engl J Med 2011;364:236-47
18. EASL 2017 Clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology 2017 vol. 67: 370–398

⇒ PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 is based on two processes:

1. Viral DNA extraction
2. Amplification and detection of target sequence using Real Time PCR

The Internal Control (Coagulation Factor V) is endogenous and therefore is extracted together with the sample in order to monitor the entire procedure (including the integrity of the plasma sample). Four Panels with four calibrators each are included in order to quantify the amount of HBV DNA in clinical specimens.

1. Viral DNA extraction

HBV and IC DNA extraction from human plasma samples has to be performed using QIASymphony DSP Virus/Pathogen midi kit (NLM code AA1440/96) or MagCore Viral nucleic acid extraction kit Large Volume (NLM code AA1507/96).

2. PCR and Detection

Amplification target

HBsAg region has been chosen as target to detect the HBV presence in human plasma samples because it is highly conserved among HBV genotypes.

The Internal Control has an internal sequence similar for length and base composition to HBV target sequence and specific primers and probe to distinguish between IC and HBV.

Calibrators are obtained by serial dilutions of a synthetic DNA of cloned HBsAg HBV region, therefore they need the same primers and probe as HBV DNA target for Real Time PCR.

Amplification

Following extraction step, DNA (HBV and IC) is amplified by Real Time PCR, using appropriate enzymes and buffer conditions.

Detection

The test is based on the Real-Time PCR, a technique that allows to monitor in real time the amplification of the samples of interest, using probes doubly labeled with a donor fluorophore and a quencher ("dual-labeled probe"). The PCR is carried out in the presence of two specific probes respectively for the internal control and for the HBsAg DNA viral region. The donor fluorophore is different for the two probes: FAM for HBV and JOE for IC. In presence of a light source, when the

probes are intact and donor and quencher are close to each other, the fluorescence emitted by the donor fluorophore is absorbed by the proximal quencher. During the amplification each probe matches to its specific sequence and it is targeted of 5' to 3' nuclease activity of the DNA polymerase. When the donor and quencher fluorophores are separated, the donor fluorescence can be detected at its specific wavelength: in this way, the amplification of the viral DNA and the IC can be monitored as the reaction proceeds.

CFX (BioRad) comprises in a single instrument a thermal cycler for target amplification and a fluorometer for the detection of fluorescence during the cycling process. The computer connected with the Real Time instrument collects fluorescent data that are displayed in a graph through a specific software (*Figure 1*).

Following raw data collection, analysis is carried out. Raw data is normalized to correct the background signal, then a threshold level can be set: this is the level at which fluorescence data are analyzed (*Figure 2*).

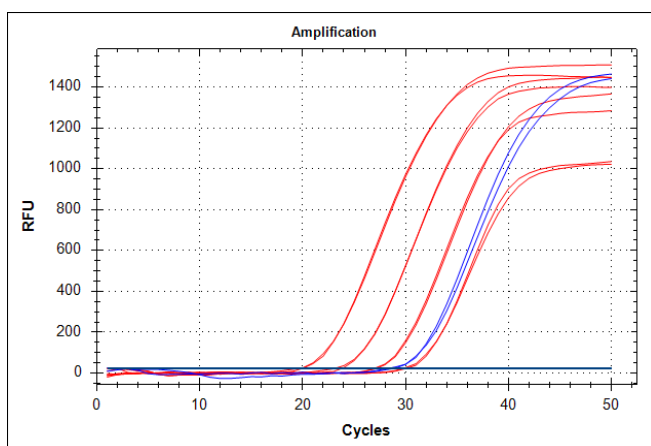


Figure 1: raw data is plotted on a graph of fluorescence versus cycle number.

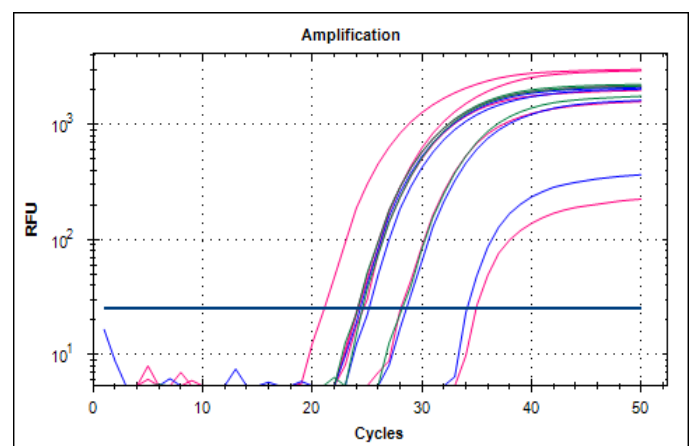


Figure 2: the normalized data is plotted on a log scale graph of fluorescence versus cycle number.

The number of cycles it takes for a sample to reach the threshold level is named Ct-value (threshold cycle) and it is related to the initial amount of target DNA: the higher is the target titer, the earlier the fluorescent signal reaches the threshold level.

If standards with known concentrations are processed, the linear regression analysis produces a standard curve from which the concentration of unknown samples can be determined. The standard curve is automatically generated by plotting the threshold cycle versus standard initial concentration (IU/ml) and calculating the best-fit line; the HBV DNA titre of each sample is determined by locating its Ct on the standard curve (*Figure 3*).

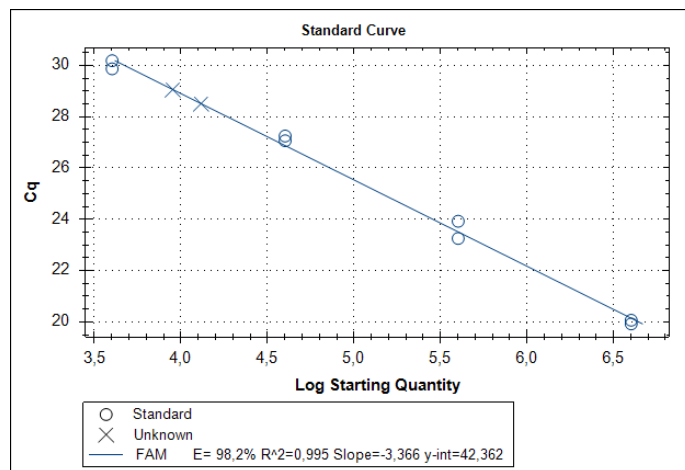


Figure 3: standard curve obtained by linear regression analysis of calibrators Ct plotted versus the respective initial concentration.

PCR product contamination Control

PCR amplification is performed in the presence of deoxyuridine triphosphate (dUTP) to generate amplification products that can be selectively degraded by treatment with uracil-N-glycosylase (UNG) and heat.

UNG cleaves the glycosidic bond between the uracil base and the deoxyribose ring, creating an abasic site that is susceptible to heat. An incubation step at +50°C before the amplification removes uracil bases from any contaminating amplification products present in the reaction mixture. The heat-labile UNG enzyme is completely and irreversibly inactivated when the temperature is increased during the next amplification steps, preventing removal of uracil from the newly synthesized DNA.

➔ REAGENTS COMPOSITION (Store at -25/-15°C)

Components	
HBV MIX mix ready-to-use with primers, probes, amplification enzyme and UNG	2x 1000 µl
No Template Control (NTC) Water to be used as NTC starting from purification step	4 x 1300 µl
RNase, DNase and Protease free water Water for the reconstitution of calibrators	2 x 400 µl
Set of calibrators 1, 2, 3, 4 Freeze-dried HBV DNA template	4 set

The amount of reagents indicated in the table is referred to the standard size of the kit. Reduced packaging is available on request for evaluation and/or demonstration of the product.

⇒ STABILITY AND STORAGE

- All the opened and closed reagents are stable up to the expiry date indicated on the label when stored at -15/-25°C.
- Thaw all the reagents on ice or at +2/+8°C.
- **HBV Mix** is stable up to 5 freeze/thaw cycles. Prepare aliquots if more freeze/thawing cycles are expected.
- **HBV Mix** contains FAM and JOE fluorophores that are photosensitive: avoid prolonged exposure to light.
- **HBV Mix** is ready to use; once dispensed in PCR tubes/plate, avoid prolonged exposure to light.
- **Calibrators** have to be resuspended with DNase, RNase and Protease free water (provided with the device) just before use; it is recommended to dispense them into the PCR tubes/plate after DNA samples to avoid cross contamination.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Viral DNA is isolated and purified from human **plasma** specimens prepared within 6 hours from blood collection.

- Collect blood observing universal precautions for venipuncture.
- Collect blood in sterile tubes with EDTA as anticoagulant and centrifuge at 1000-1500g for 10-15 minutes to separate plasma. Use only EDTA as an anticoagulant, other types of anticoagulants may interfere with the performance of the test.
- ⇒ - Aliquot 1200 µl (NLM code AA1507/96) or 700 µl (NLM code AA1440/96) of plasma using vertical down-flow airbox and operating to avoid DNA degradation.
- Store samples at +2/+8°C until extraction step. If they are not processed immediately, store them at -25/-15°C frozen for up to 72 hours or at ≤ -70°C for longer period
- If samples are freezed, thaw at +2/+8°C and centrifuge at 1000-1500 x g for 10-15 minutes to avoid cryoglobuline interference.
- Avoid repeated freeze-thaw cycles of plasma samples.
- Samples must be handled following good laboratory practices.
- Perform the procedure following good laboratory practices and handle samples as biohazardous and capable of transmitting infection.

⇒ PRECAUTIONS

- Only professional and opportunely trained personnel should use this kit. Handle this product according to established good laboratory practices and universal precautions throughout the assay procedure.
 - The use of the following solutions allows to minimize the risk of cross-contamination:
 - ✓ It is recommended to perform the assay in two different areas:
 - Area 1: pre-PCR (samples handling, extraction and **HBV mix** dispensing. Be careful not to contaminate the mix during its handling.
 - Area 2: post-PCR (Real Time PCR)
- Each area should be provided with dedicated equipment and consumables (lab coats, centrifuge, tubes, pipettes, etc).
- ✓ Workspace should be organized to ensure that the workflow occurs in one direction, from clean areas (pre-PCR) to dirty areas (post-PCR).
 - ✓ At the end of the procedure, it's recommended to clean the working surfaces (bench and vertical downflow airbox) with 5-10% bleach (final concentration of sodium

hypochlorite: 0,5% w/v), freshly prepared. Follow the manufacturer recommendations to clean the instruments.

- ✓ All disposable items (tips and tubes) must be DNase, RNase free. Use aerosol-resistant pipette tips to avoid pipettes contamination. Use a new tip every time a volume is dispensed.
 - ✓ Use vertical downflow airbox with UV lamp
 - ✓ Change gloves frequently
 - ✓ The absence of contamination is guaranteed by the analysis in each session of a NTC, which allows to monitor the whole procedure starting from the extraction step.
- Discard all used material in accordance with the existing local and national regulations in force.
 - Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in areas where reagents or specimens are handled.
 - In case of contact with reagents rinse immediately with water and seek medical advice.
 - Do not use device after its expiration date.
 - Do not mix **HBV Mix** from different lots.
 - Do not use the device if the box is damaged; contact the supplier.
 - It is advisable to have constant and uniform laboratory temperature, avoid to place the instruments near heating/cooling sources that may compromise the right working.

⇒ MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

AREA 1

Nucleic acid extraction system and related disposable

DNA extraction kit

Vertical downflow airbox with UV lamp

Dedicated adjustable volume pipettes set

Aerosol barrier tips, 2 ml and 1,5ml DNase, RNase free tubes

Vortex mix

Centrifuge

DNase, RNase free, strips or plates for Real TimePCR

AREA 2

CFX (BioRad) and software

ASSAY PROCEDURE

VIRAL DNA EXTRACTION

→ Extraction kit to be used:

- AUTOMATIC EXTRACTION QIASymphony **NLM code AA1440/96**
- SEMI-AUTOMATIC EXTRACTION MagCore **NLM code AA1507/96**

For the preparation, use and disposal of the reagents, refer to the specific instructions for use of the extraction system used.

For the preparation of plasma samples it is necessary to follow the protocol concerning the specific method.

Use the volumes indicated in the table below

Extraction system	Sample volume	Elution Volume
MagCore semi-automatic extraction (NLM code AA1507/96).	1200 µl	60 µl
QIASymphony automatic extraction (NLM code AA1440/96 – protocol Cell free 500)	700 µl	60 µl

Purified DNA can be stored at +2/+8°C if immediately used, otherwise keep it frozen at -25/-15°C or at ≤ -70°C for longer periods. It is recommended to thaw DNA at +2/+8°C.

→ REAL TIME PCR

Set Real Time PCR profile before preparing HBV Mix.

- **Carefully mix the HBV mix before use.**
- Mix gently and dispense in the plate/strip, previously marked, **25 µl** of HBV Mix for each sample + 1 NTC + 4 calibrators.
- Add **25 µl** of purified DNA or NTC to each well/tube and **mix pipetting up and down.**
- Resuspend the calibrators with **30 µl** RNase, DNase and Protease free water, mix properly, then transfer **25 µl** in the specific well/tube.

WARNING: dispense and pipette mix and samples very carefully, avoiding the formation of bubbles. Centrifuge the plate/strip before place it into the instrument.

RUN SETUP

- Turn on the PC and Real Time instrument.
- Open the Bio-Rad CFX Manager Software and click on *Create new run*, select the model of instrument used and click *OK*; the *Run Setup* window will open.
- It is possible to create a new protocol, select/modify an existing one or repeat a run. To repeat a run with the same settings, open the desired run, click on *File - Repeat Run*.

Create a new protocol

- Protocol → create New (Figure 4)
- Protocol Editor – new
- Enter the reaction volume (50 µl) in the Sample Volume box
- Add the steps by clicking on *Insert Step* on the left of the window (it is possible to modify temperatures and times directly on the graph or in the test below with a double click on them):
 1. 37°C for 10 min
 2. 50°C for 15 min
 3. 95° for 20 sec
 4. 95°C for 15 sec
 5. 60°C for 1 min; add “plate read” at this step
 6. Insert GOTO 4, 44 more times
- Click OK. Save the new protocol.

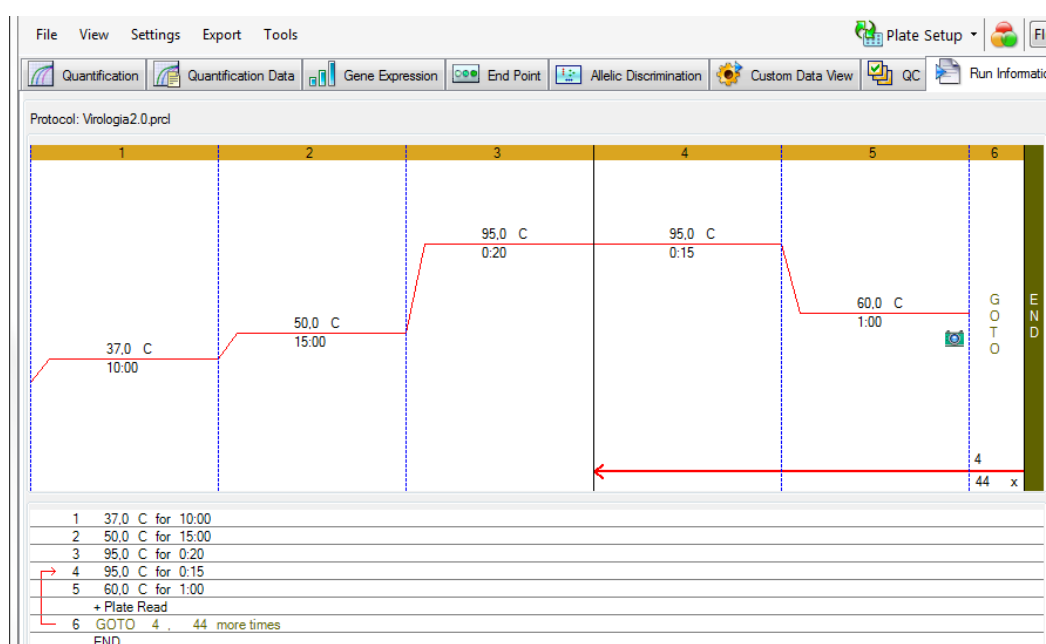


Figure 4

➔ PLATE SETUP

Open *plate* in *Run setup* window. It is possible to create a new plate or select/modify an existing one.

Create a new plate

- Plate → create New”
- In *Plate Editor – new* window (Figure 5) → *Scan Mode* select *All channels*
- Select plate type: *Setting* → *Plate Type* → *BR clear*
- Click *Select Fluorophores* button and check *FAM* and *JOE/HEX*
- Select a well
- Choose *Sample Type* → *Unknown*, *Standard* or *Negative Control* depending on the type of sample
- Type *Target Name* (*HBV* for *FAM* and *IC* for *JOE/HEX*) and Select *Load* check boxes to insert fluorophores (*FAM* and *JOE/HEX* for each well except for the standards, where only *FAM* has to be loaded).
- Type *Sample Name* and click *Load*. Check boxes to insert sample Name

- For the *Standards*, type the respective concentration values as indicated on the label inside the box of the device and click the load button in the concentration window.
- Click *OK*. Save the new plate.

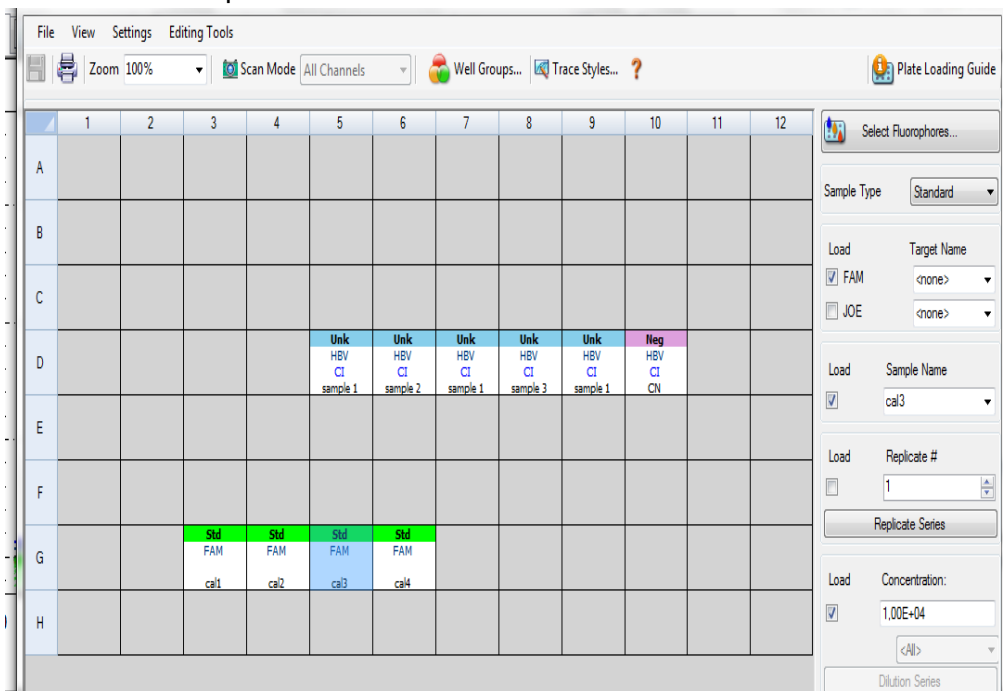


Figure 5

Select/modify existing protocol or plate

- To import an existing protocol or plate click *Select Existing* in protocol or plate window.
- To modify an existing plate click *Select Existing* → *Edit Select*.
- Proceed as explained above.

START RUN

- Prepare the plate/strip with samples and mix.
- In *Start Run* tab click *Open Lid*, place the plate/strip in CFX instrument and click *Close Lid*
- Press *Start Run* to begin.
- It's possible to monitor the Raw data plots during the assay in *Run Details* window in *Real Time status* page.

DATA ANALYSIS

At the end of the run the window *Data Analysis* will open automatically.

To exclude a sample/calibrator from the analysis go to *plate setup-view/edit plate*, select the well of interest and click on *Exclude well in analysis*.

Analyze data for FAM and JOE/HEX separately.

a) **FAM**: deselect JOE/HEX in the amplification window. Click on *Settings* and select (Figure 6):

- *Cq determination mode: single threshold*
- *Analysis mode: Baseline subtracted curve fit*
- *Baseline threshold: Single Threshold-User defined-introduce the value 200*. Click *OK*

In “*Quantification*” for the data analysis: the graph on the left shows the amplification data (linear or log scale), the graph on the right shows the standard curve. The R^2 value should be as close as possible to 1. If one of the four calibrators doesn't match with the linear fitting (i.e. in the presence of a Ct value outside the corresponding acceptability RANGE reported on the label inside the box),

it can be excluded from the analysis, in order to obtain a better fitting of the standard curve and a more precise sample quantification without altering the clinical significance of the results.

If more than one calibrator doesn't match with the linear fitting, Standard Curve cannot be accepted and the run must be repeated.

Check FAM results for valid samples: a value of concentration (IU/ml) is given in the result table.

- If given concentration is lower than Detection Limit, report result as HBV DNA < LOD; in this case positive result reproducibility is not guaranteed.
- If sample has positive signal in the JOE/HEX channel but no signal in the FAM channel report as *HBV DNA Target not detected*.
- Results that are not within the linear range of the assay cannot be considered accurate, therefore they should be carefully interpreted.
- If given concentration is above the upper quantification limit, report result as HBV DNA > 1,00E+08 IU/ml. To get a more accurate result, the test should be repeated using the starting plasma sample diluted with negative plasma. The calculated concentration must be multiplied by the dilution factor to obtain the initial concentration of that sample.

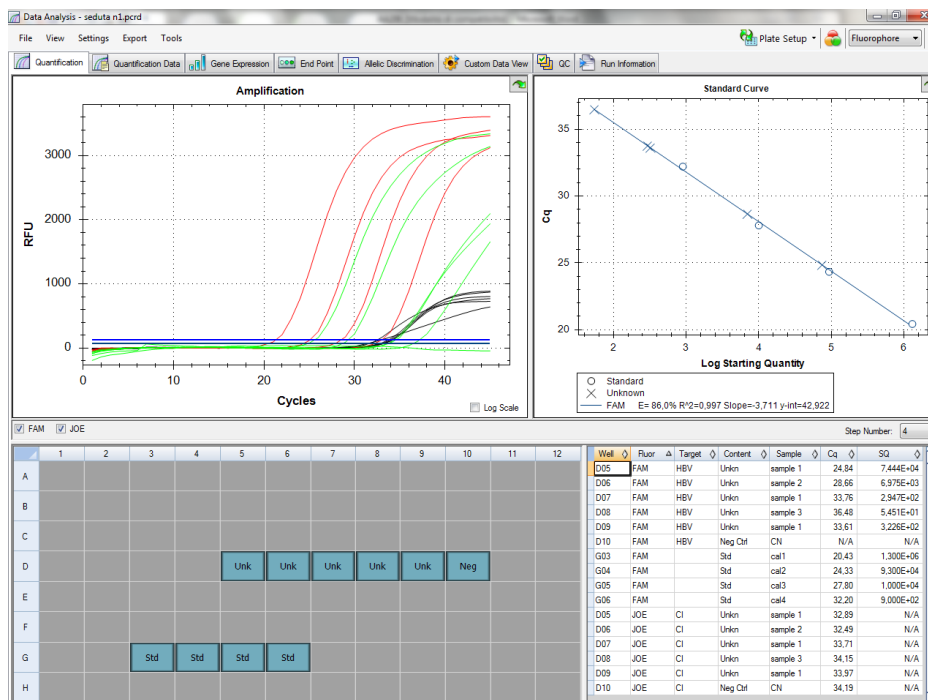


Figure 6

b) **JOE/HEX:** deselect FAM in the amplification window. Click on *Settings* and select

- *Cq determination mode: single threshold*
- *Analysis mode: Baseline subtracted curve fit*
- *Baseline threshold: Single Threshold-User defined-introduce the value 100.* Click **OK**

Check samples JOE/HEX Ct and interpret results as follows:

	JOE/HEX Ct	Interpretation
Sample	Present	Valid
	Absent	Not Valid*

(*) *In absence of IC signal sample result can't be confirmed, therefore sample run should be repeated from the extraction. However, the absence of IC signal in HBV DNA with high-titer (>10⁸ IU/ml) could be explained with the competition between HBV specific target and IC. In this case, the positive result for HBV can be considered valid.*

If NTC is run, interpret results as follows:

	FAM Ct	JOE/HEX Ct	Interpretazione
No Template Control	Absent	Absent	Valid
	Present	Absent	Not Valid*
	Absent	Present	
	Present	Present	

(*) Possible contamination

Create a Report (*Tools* → *Reports*). Select/Deselect useful information.

WARNING: for a correct interpretation of results, always pay attention to the graph of the session.

Example 1 (*figure 7a*): the sample highlighted in red in the graph shows a positive Ct value (35), but the graph itself shows it is an instrumental artifact. The found Ct value should not be taken into account and the sample must be repeated.

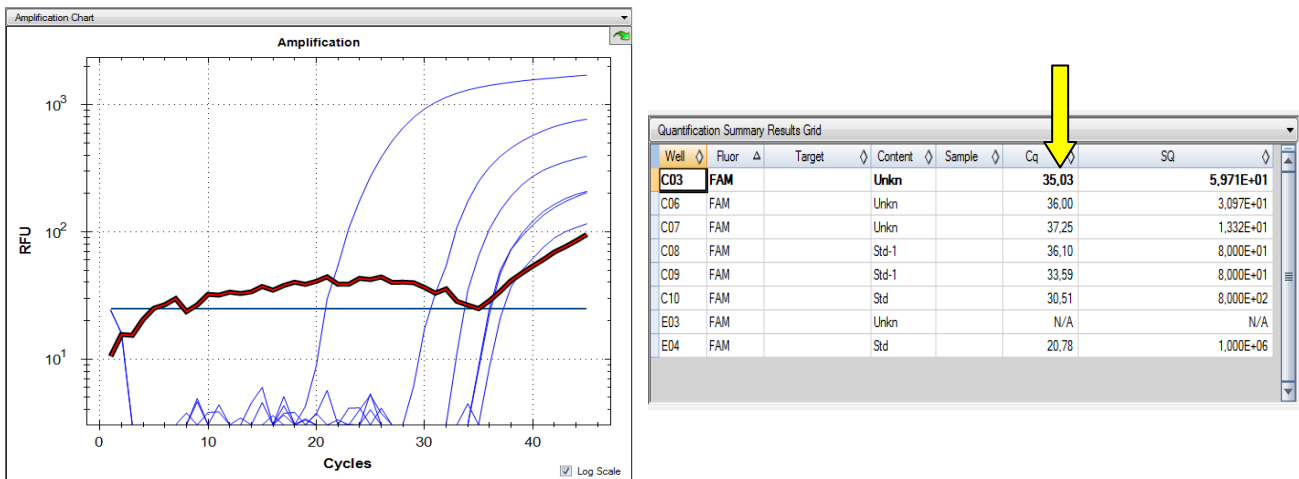


Figure 7a

Example 2 (*Figure 7b I and II*): if fluorescence signals at the beginning of the run are inhomogeneous or there are artifacts, it is possible to adjust the signal clicking on *Settings* and selecting:

- Apply *Fluorescence Drift Correction* or, alternatively, *Baseline cycles*; in this case select *User defined* and choose from **10** to **20**.
- After the operation described above, check if the calibrators Ct are in range.

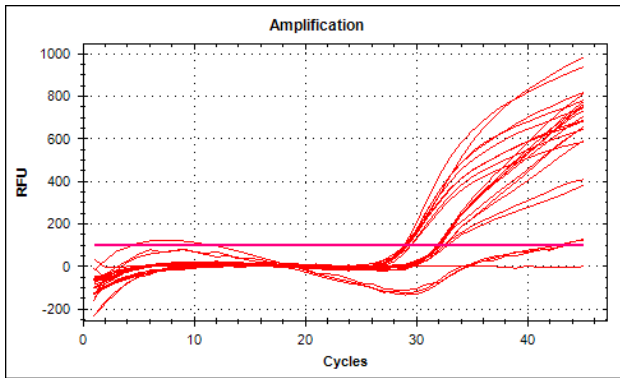


Figure 7b I

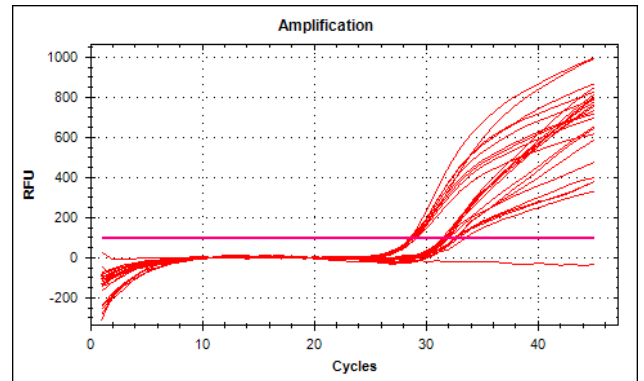


Figure 7b II

WARNING

- In case of absence of expected JOE/HEX signal it is advisable to repeat the assay.
- Calibrators haven't Internal Control, therefore JOE/HEX signal is not expected.
- When contamination events occur it's important to find out the source (extraction and/or PCR steps). Provided controls can be very useful to ensure the correct test performance and to find out contamination origin.

➔ PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity

The specificity of the HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 was determined by analysing 104 HBV negative plasma samples from blood donors. No false positive results were obtained. According to the results the specificity of the assay is 100%.

Analytical sensitivity

Sensitivity was determined by analysing four dilution levels of the 4th WHO International Standard HBV (NIBSC code 10/266). For the dilutions a plasma negative for HBV DNA and antibodies was used. The analysis was performed according to instructions for use, DNA extraction included. As shown in table below, the detection limit of HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 is **<8 IU/ml** (Probit analysis at 95%, done with XLSTAT 2014).

QIASymphony cod. NLM AA1440/96:

Dilutions	N tot. runs	N tot. positives	% positives
A (31 IU/ml)	28	28	100%
B (10 IU/ml)	28	28	100%
C (5 IU/ml)	28	23	82,14%
D (2,5 IU/ml)	28	20	71,43%
LOD= 7,04 UI/ml			

*Probit Analysis done with XLSTAT 2014

MagCore cod. NLM AA1507/96:

Dilutions	N tot. runs	N tot. positives	% positives
A (31 IU/ml)	28	28	100%
B (10 IU/ml)	28	28	100%
C (5 IU/ml)	28	22	78,57%
D (2,5 IU/ml)	28	18	64,28%
LOD= 7,84 UI/ml			

*Probit Analysis done with XLSTAT 2014

Linear Range

To evaluate the linear range of the device, 14 dilution levels were prepared using high viral load HBV positive samples diluted in HBV negative human plasma. The test was performed according to the instructions for use, with both the extractions, using two different lots of reagents. Each dilution level has been tested at least in 16 replicates.

Dilutions	Titre (IU/ml)
A	1×10^8
B	$3,3 \times 10^7$
C	1×10^7
D	$3,3 \times 10^6$
E	1×10^6
F	$3,3 \times 10^5$

G	1×10^5
H	$3,3 \times 10^4$
I	1×10^4
L	$3,3 \times 10^3$
M	1×10^3
N	$3,3 \times 10^2$
O	1×10^2
P	$3,3 \times 10^1$

As shown in figures below (Figure 8.1 and Figura 8.2), HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 showed a linear response from 3,300E+01 IU/ml to at least 1,00E+08 IU/ml, using the accuracy acceptance criterion of $\pm 0,3 \log 10$.

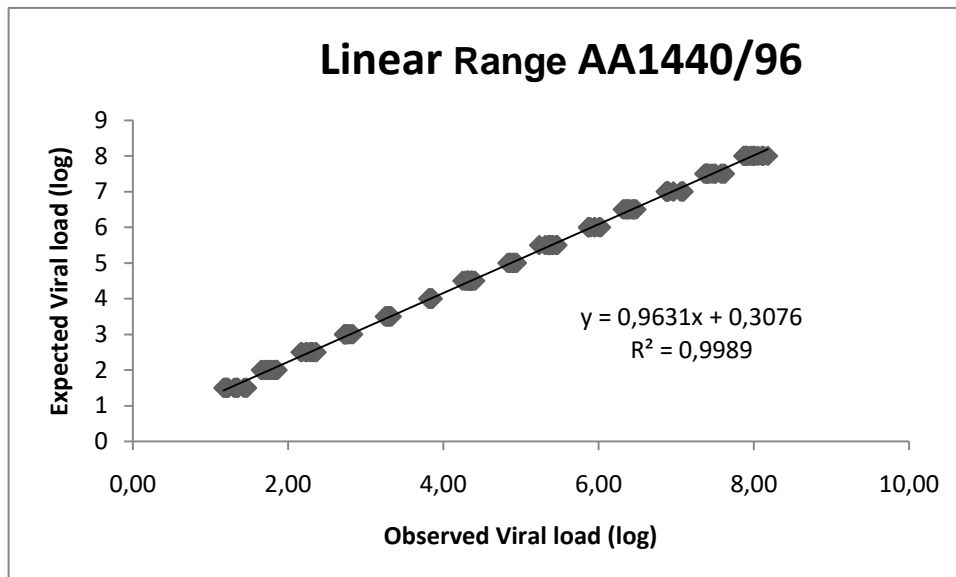


Figure 8.1: Linear range with QIASymphony NLM code AA1440/96

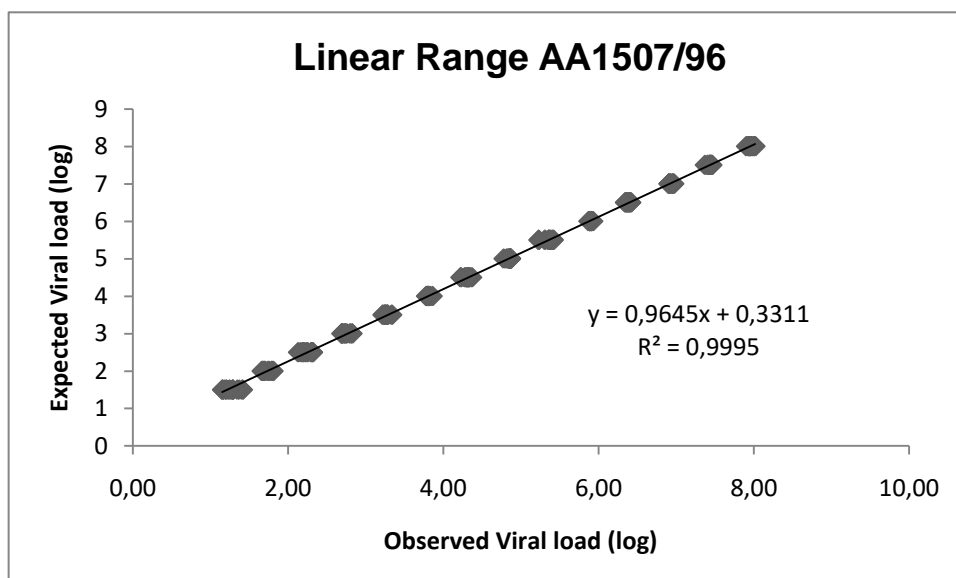


Figure 8.2: Linear range with MagCore NLM code AA1507/96

Precision

Intra-assay precision

Intra-assay precision was evaluated by using 6 positive samples with different viral load. Two different operators tested three replicates per dilution level using the same lot of reagents. Results of intra-assay tests are showed in the table below.

Viral load (IU/ml)	3,5x10 ⁷	3,2x10 ⁶	2,8x10 ⁵	2,2x10 ⁴	1,8x10 ³	1,03x10 ²
CV%	9,12	4,12	11,31	4,80	7,45	10,66

Inter-assay precision

Inter-assay precision was evaluated by using the same samples used in the intra-assay study. Two different operators tested three replicates per dilution level, in different runs and days, using 3 different lots of reagents.

The test was performed according to the instructions for use, using both the extractions; in this way the precision was evaluated for all the steps of the procedure.

Results of inter-assay tests are showed in the table below.

Viral load (IU/ml)	3,5x10 ⁷	3,2x10 ⁶	2,8x10 ⁵	2,2x10 ⁴	1,8x10 ³	1,03x10 ²
CV%	9,86	6,65	11,30	3,74	10,47	11,24

Genotypes

The performance of HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 on different HBV genotypes was determined by analysing dilution levels of different HBV positive specimens for the most relevant genotypes (A-H). Samples from commercial panels were used.

Dilution levels analysed:

- Gen A:** from 1,26 x10⁶ to 1,26x10¹ IU/ml
- Gen B:** from 8,32 x 10⁵ to 8,32 x 10¹ IU/ml
- Gen C:** from 1,23 x 10⁶ to 1,23 x 10¹ IU/ml
- Gen D:** from 1,07 x 10⁶ to 1,07 x 10¹ IU/ml
- Gen E:** from 7,24 x 10⁵ to 7,24 x 10¹ IU/ml
- Gen F:** from 5,75 x 10⁴ to 5,74 x 10¹ IU/ml
- Gen G:** from 6,03 x 10³ to 6,03 x 10¹ IU/ml
- Gen H:** from 2,63 x 10³ to 2,63 x 10¹ IU/ml

As showed in the graphic below (*Figure 9*) quantification is comparable for the different genotypes analysed. HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 detection efficiency is therefore independent of the genotype analysed (acceptance criteria: maximum difference between obtained and expected concentration $\pm 0,5$ Log IU/ml).

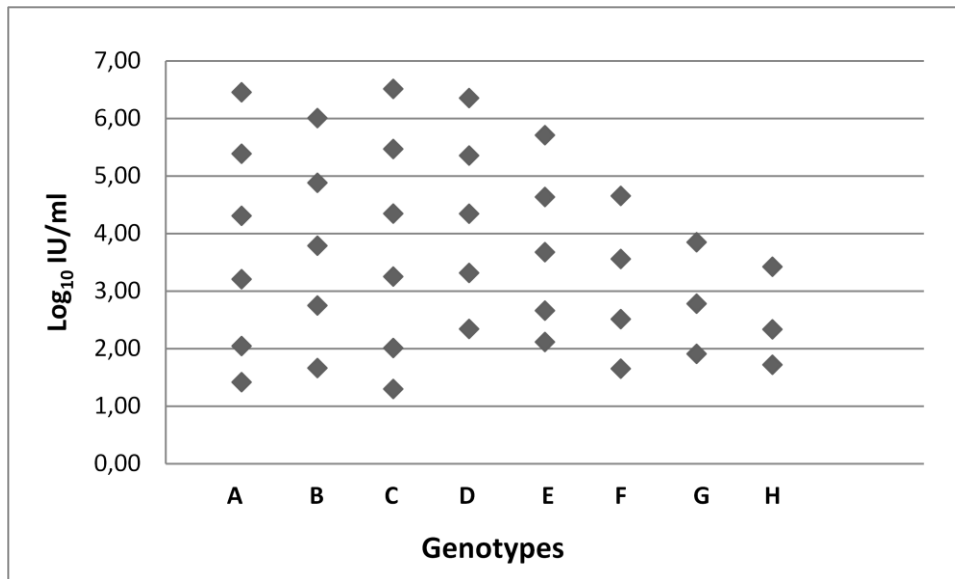


Figure:9

Potential cross reactive markers

To evaluate the potential cross reactivity of HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 with other pathogens the following samples (from infected patients) were analysed:

Other pathogens	Nr of samples tested
HHV6	2
HCMV	2
EBV	2
VZV	2
BKV	2
Chlamydia trachomatis	3
Neisseria gonorrhoeae	3
HPV	3

Each non-HBV sample tested gave a negative result. Therefore HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 showed no cross reaction with other pathogens.

Potentially interfering substances

Data not available.

Whole system failure rate leading to false-negative results

To evaluate the whole system failure rate leading to false negative results, 110 HBV positive plasma samples were analyzed (~ 21 IU/ml, 3 times positive cut-off concentration).

The starting plasma was obtained by diluting in human negative plasma a positive HBV sample, calibrated with the 4th WHO International Standard HBV (NIBSC code 10/266).

All HBV positive samples tested gave a positive result, therefore HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 reported no false negatives.

Positive results	110
Negative Results for Positive Samples	0

Absence of Cross-contamination

Absence of Cross-contamination for the whole work-flow was demonstrated alternating high positive and negative samples in 5 runs; both the DNA purification methods were used, AA1440/96 and AA1507/96.

All the negative samples tested resulted negative as expected.

Therefore HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE device showed no cross-contamination between positive and negative samples.

Robustness

The robustness of HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 kit was evaluated adding different volumes of mix and samples ($\pm 10\%$): 10 low positive HBV plasma samples (21 IU/ml) were tested with +10% of mix and sample and -10% of mix and sample.

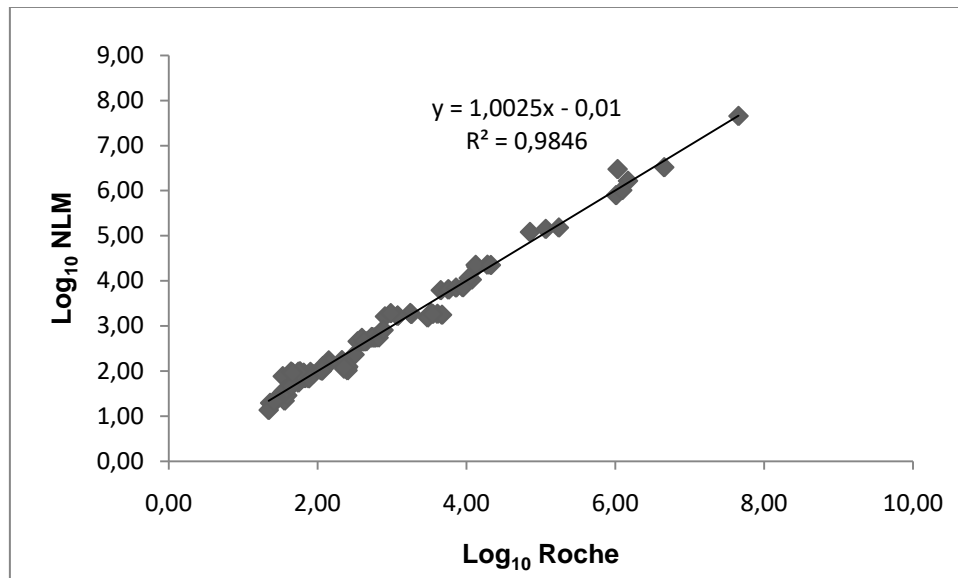
All samples tested gave a positive result, therefore HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 is reliable during normal usage even when subjected to small volume variations.










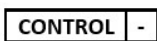

Comparison with Roche Cobas TaqMan® HBV test in routine samples

The performance of the HBV DNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 was compared to Roche Cobas TaqMan® HBV test analysing 103 HBV samples.

The analysis was performed according to the instructions for use, including the extraction step.

Results obtained showed a good correlation between these two assays (*Figure 10*).



					
Lot Number	Catalogue number	Temperature Limitation	Use by	Consult Instructions for use	
					
European Conformity	Manufacturer	<i>in vitro</i> diagnostic service	Sufficient for	No Template Control	Modified text compared with the previous version