

BIOLOGIA MOLECOLARE

VER 2 - 22/02/2018

REF AA896/24 **24 TEST**

REF AA896/48 **48 TEST**

CND W0105020307

ESTRAZIONE: AA1318 NON COMPRESA

HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0

CE
0459

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.
UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 – 20090 SETTALA MI (Italy)
Tel (+39) 02/95. 24. 51 - Fax (+39) 02/95. 24. 52. 37
SITO INTERNET: www.nlm.it – E-MAIL: segreteria@nlm.it

UTILIZZO

Il test HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 fornisce i reagenti necessari per la determinazione qualitativa della presenza del virus dell'Epatite C (HCV RNA) in campioni di plasma umano, mediante Real Time RT-PCR della regione 5'-UTR dell'RNA virale; contemporaneamente viene amplificata anche la regione Core, in modo da rendere compatibili gli amplificati con il kit NLM cod. AC004/24 GEN-C 2.0 per la genotipizzazione di HCV.

Il Controllo Interno è endogeno (mRNA del gene costitutivo GAPDH) e viene estratto ed amplificato in ogni campione, al fine di monitorare l'intera procedura.

Questo prodotto va utilizzato in abbinamento al kit di estrazione NLM **AA1318** "Estrazione DNA/RNA Virale", da ordinare separatamente. L'RNA estratto è retrotrascritto e amplificato in un unico step di RT-PCR Real Time, utilizzando lo strumento CFX (BioRad).

⇒ Il dispositivo può essere utilizzato anche per la sola genotipizzazione virale mediante rivelazione degli amplificati biotinilati su striscia AC004/24, in questo caso è possibile amplificare i campioni utilizzando il termociclatore C1000 (BioRad) o termociclatori equivalenti.

HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 è indicato per la diagnosi di infezione da HCV insieme agli altri parametri di laboratorio (es. anticorpi, ALT, etc.) ed al quadro clinico del paziente. Il dispositivo non va utilizzato come test di screening per la presenza di HCV RNA nei donatori di sangue.

Il kit è da ritenersi per il solo uso professionale.

INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite C è la principale causa di epatite acuta di origine virale che, nella maggior parte dei casi, cronicizza ed evolve in cirrosi epatica ed epatocarcinoma¹. HCV è responsabile anche di patologie extraepatiche²⁻⁴.

Il genoma virale è costituito da RNA lineare a singola catena, con un solo open reading frame; in posizione 5' presenta una regione altamente conservata e non tradotta (5'-UTR) seguita dalla regione Core. Queste due regioni rappresentano il target per i test di biologia molecolare e la loro variabilità genetica è alla base della classificazione di HCV in diversi genotipi^{5,7,8}.

Il virus si trasmette per via parenterale tramite contatto con sangue infetto. L'esposizione a sangue infetto può avvenire in seguito a trasfusioni anteriori al 1992, uso di siringhe infette, trapianto di organi solidi provenienti da donatori infetti, nascita da una madre infetta, esposizione in ambito lavorativo, pratiche sessuali a rischio⁶.

Dopo una prima esposizione ad HCV, la presenza dell'RNA virale nel sangue dei pazienti può essere rilevata nell'arco di 1-3 settimane; l'infezione acuta può avere un decorso severo ma raramente è fulminante⁶.

Sebbene l'infezione acuta sia generalmente asintomatica, nell' 85% dei casi circa si trasforma in patologia cronica: la persistenza dell'infezione viene diagnosticata dalla presenza di HCV RNA nel sangue per almeno sei mesi⁶.

Il recente sviluppo di farmaci cosiddetti DAA (directly acting antiviral) e l'approvazione del primo regime terapeutico triplo a base di boceprevir e telaprevir hanno portato nuove speranze per un più alto tasso di eradicazione del virus. Ciò richiede una ancora più accurata e sensibile rilevazione dell'RNA virale per poter monitorare più precisamente la cinetica virale e determinare in modo tempestivo un eventuale fallimento terapeutico⁹.

I test molecolari sempre più sensibili possono quindi fungere da "aiuto diagnostico" non solo per la terapia convenzionale ma anche per lo sviluppo e le applicazioni della nuova generazione di farmaci DAA, per una gestione più efficace dell'epatite C cronica e le sue complicazioni di lunga durata.⁹

BIBLIOGRAFIA

1. Sarrazin C. *Diagnosis of hepatitis C: update 2004. Journal of Gastroenterology and Hepatology (2004) 19, S88-S93*
2. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H et al. *Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. N Engl J med 1993; 328: 465-470.*
3. Agnello V, Chung RT, Kaplan RM. *A role for hepatitis C virus infection in Type II cryoglobulinemia. N Engl J Med 1992; 327: 1490-1495.*
4. Andreone P, Zignego AL, Cursaro C et al. *Prevalence of monoclonal gammopathies with hepatitis C virus infection. Ann Intern Med 1998; 129: 294-298*
5. Zein NN. *Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2000, p. 223-235.*

6. National Institutes of Health, Consensus Conference Statement. Management of hepatitis C: 2002.
7. P.T. Hrabec et al. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology Journal* 2006, 3:103
8. M. A. Ansari et al. HCV-Core Region: Its Significance in HCV-Genotyping and Type Dependent Genomic Expression. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2012 Mar 15; 5(1):30-39.
9. G. Colucci Molecular diagnostic and predictive tests in the evolution of chronic hepatitis C anti-viral therapies *BMC Infect Dis*. 2012; 12(Suppl 2): S8. Published online 2012 November 12

PRINCIPIO DEL TEST

Il Test HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 si basa su due processi:

1. estrazione dell'RNA virale
2. retrotrascrizione, amplificazione e rivelazione della sequenza bersaglio mediante Real Time RT-PCR

⇒ Il Controllo Interno (GAPDH mRNA) viene estratto insieme al campione e permette di monitorare l'andamento di tutto il saggio (compresa l'integrità del campione di partenza).

1. Estrazione dell'RNA virale

Per la purificazione di HCV RNA e del Controllo Interno a partire da campioni di plasma umano si deve utilizzare il kit "Estrazione DNA/RNA Virale" (cod. NLM AA1318).

2. RT-PCR e Rivelazione

Target selezionato per l'amplificazione

La regione 5'-UTR 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 HCV; la co-amplificazione della regione Core è stata inserita per permettere di discriminare i genotipi 1a, 1b e 6 nel caso che gli amplificati vengano utilizzati in seguito con il kit NLM AC004/24 Gen-C ver. 2.0. Il Controllo Interno è l'mRNA del gene GAPDH, costitutivamente espresso, e viene co-estratto e co-amplificato insieme al target. La sequenza amplificata è simile per lunghezza e composizione in basi alla sequenza di HCV.

Retrotrascrizione ed amplificazione

Successivamente alla fase di estrazione, HCV RNA e CI sono retrotrascritti ed amplificati in un unico passaggio di RT-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 5'-UTR del virus. A ciascuna sonda è legato un diverso fluoroforo donatore: FAM per HCV 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 accettore. Durante l'amplificazione le sonde si appaiano ciascuna al proprio target specifico e sono soggette all'attività nucleasica 5'→3' della DNA polimerasi. Quando i fluorofori donatore ed accettore sono separati, la fluorescenza del donatore può essere rilevata alla sua lunghezza d'onda specifica: in questo modo l'amplificazione dell'RNA virale e del CI può essere monitorata nel corso della reazione.

Lo strumento CFX (BioRad) comprende in un singolo strumento un termociclatore ed un dispositivo per la rilevazione della fluorescenza durante i cicli di PCR. Un computer 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*).

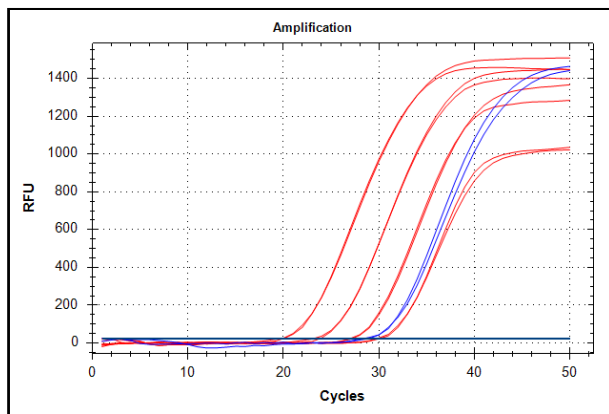


Figura 1: il dato grezzo è riportato in un grafico come valori di fluorescenza rispetto al numero di cicli.

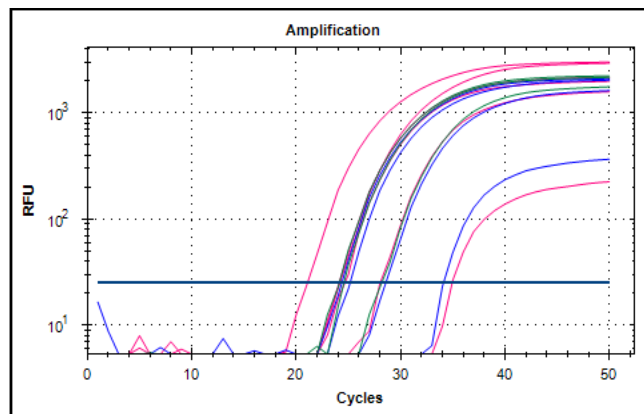


Figura 2: il dato normalizzato è riportato in un grafico in scala logaritmica come fluorescenza rispetto al numero di cicli.

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 RNA target: più alto è il titolo iniziale del target più precocemente si ha l'innalzamento del segnale di fluorescenza.

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

Componente	AA896/24 (24 test)	AA896/48 (48 test)
Mix A Sonde Primers Tris-EDTA	1 x 26 µl	1 x 47 µl
Mix B Primers Tris-EDTA	1 x 55 µl	1 x 110 µl
Mix C Enzimi per RT-PCR MgCl ₂ dNTPs	1 x 170 µl	1 x 335 µl
Controllo negativo* Il controllo negativo contiene plasma di origine umana testato per HIV-Ab ed RNA, HCV-Ab ed RNA, HBs-Ag e DNA e risultato negativo. Il controllo negativo deve essere estratto	2 x 600 µl	4 x 600 µl
Controllo positivo* RNA sintetico Il controllo positivo è fornito in forma liofila. Deve essere risospeso in 14 µl di acqua (fornita) prima dell'uso per la fase di RT-PCR.	2 provette	4 provette
Acqua RNasi, DNasi e Proteasi free	1 x 600 µl	1 x 600 µl

⇒ *Oltre ai campioni da analizzare, anche 1 Controllo Positivo + 1 Controllo Negativo devono essere inclusi in ogni seduta.

Nel caso in cui il dispositivo venga utilizzato esclusivamente per la genotipizzazione in abbinamento al cod. AC004/24, non è necessario inserire il controllo positivo ed il controllo negativo in ogni seduta

STABILITA' E CONSERVAZIONE

- Tutti i reagenti sono stabili sino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati a -25/-15°C.
- Scongelare i reagenti in ghiaccio o a +2/+8°C.
- Le **Mix** sono stabili sino alla data di scadenza se tenute a -25/-15°C. Questi reagenti possono essere ricongelati e scongelati al massimo 4 volte.
- La **Mix A** contiene i fluorofori FAM e JOE che sono fotosensibili: evitare prolungate esposizioni alla luce.
- La **Master Mix** deve essere utilizzata subito dopo la preparazione; dopo averla dispensata nelle provette da PCR, la Master Mix rimanente va scartata. Evitare prolungate esposizioni alla luce.
- Il **Controllo Positivo** è un template ad RNA, fornito già aliquotato e in forma liofila: si raccomanda di risospesare tale reagente con acqua RNasi, DNasi e Proteasi free poco prima dell'uso. Aggiungere quindi la **Master Mix** nella provetta del CP risospeso e trasferire nella strip/piastra di amplificazione, il tutto dopo aver dispensato i campioni nelle rispettive provette onde evitare contaminazioni.

RACCOLTA DEI CAMPIONI

L'RNA 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 dell'RNA (**450 µl**) sotto cappa a flusso laminare verticale, operando in modo da evitare la degradazione dell'RNA.
- Conservare i campioni a +2/+8°C fino al momento dell'estrazione. Se non si procede immediatamente, si consiglia di porre i campioni a -25/-15°C fino a 72 ore prima di congelarli a ≤ -70°C.
- 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 soluzioni permette di ridurre al minimo il rischio di contaminazione crociata:
 - ✓ Separare fisicamente le tre aree di lavoro:
 - Zona 1: pre-PCR (manipolazione dei campioni ed estrazione)
 - Zona 2: preparazione della Master Mix e aggiunta del campione estratto alle reazioni di RT-PCR
 - Zona 3: post PCR (Real Time PCR)Ogni area deve essere rifornita di attrezzatura e consumabili dedicati (camici da laboratorio, centrifughe, pipette, provette, etc).
Il flusso di lavoro deve procedere in modo unidirezionale dalla zona 1 alla zona 3. Ciò significa che tutti i consumabili e i DPI (camici, guanti, occhiali, etc.) che sono stati portati nella zona 3 (post PCR) non devono mai essere riportati nella zona pre_PCR senza essere stati decontaminati.
 - ✓ Assicurarsi che al termine della procedura le superfici di lavoro e gli strumenti utilizzati vengano regolarmente decontaminati con candeggina diluita al 5-10% (la concentrazione finale di ipoclorito di sodio deve essere 0,5% w/v). Preparare la soluzione di candeggina fresca ogni giorno.
 - ✓ 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 controllo negativo, che permette di monitorare l'intera procedura a partire dalla fase di estrazione.
- Il controllo negativo contiene plasma di origine umana negativo per HIV-Ab ed RNA, HCV-Ab ed RNA, HBs-Ag e DNA. Tuttavia tale reagente deve essere maneggiato come campione potenzialmente infettivo, utilizzando i dispositivi di protezione individuale.
- 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 reagenti 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**

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
Separatore magnetico
Vortex e termoblocco
Centrifuga

⇒ **ZONA 2**

Cappa a flusso laminare verticale dotata di lampada UV
Set dedicato di pipette a volume variabile
Puntali con filtro DNAsi ed RNAsi free
Provette DNAsi ed RNAsi free, da 0,2 ml, strip da 8 DNAsi e RNAsi free o piastre per Real Time PCR
DNAsi e RNAsi free

⇒ **ZONA 3**

CFX (BioRad) e software
C1000 (BioRad) o termociclatore equivalente: in caso di utilizzo del dispositivo esclusivamente per la genotipizzazione virale in abbinamento al codice AC004/24 e non per la determinazione qualitativa della presenza di RNA virale.

PROCEDIMENTO

ESTRAZIONE DELL'RNA VIRALE

(Sistema abbinato: "Estrazione DNA/RNA virale", codice NLM **AA1318**).

Fare riferimento alle istruzioni del kit di estrazione per la preparazione, la manipolazione e lo smaltimento dei reagenti, considerando **450 µl** di campione di partenza.

Questo protocollo è per uso manuale e prevede l'utilizzo di tubi di reazione da 2 ml ed un separatore magnetico idoneo. Per l'automazione della procedura con strumento Janus (Perkin Elmer) contattare la Nuclear Laser Medicine.

Preparare il numero di provette da 2 ml da centrifuga necessario per il numero di campioni più il controllo negativo da estrarre.

Prima di procedere con la fase di estrazione portare il termoblocco a +55°C. Assicurarsi che la Proteinasi K e il Poly(A) RNA siano stati preparati come descritto.

1. Dispensare **nel seguente ordine 10 µl di Proteinasi K e 450 µl di campione** in una provetta da 2 ml. Aggiungere **450 µl di Lysis Buffer Viral RNA**, poi **6 µl di Poly(A) RNA**. Mescolare bene pipettando almeno **8 volte** su e giù e incubare a **55°C per 10 minuti**; vortexare brevemente i campioni a metà dell'incubazione.
Per maggiore comodità è possibile preparare una miscela di Lysis Buffer Viral RNA e Poly(A) RNA calcolando la quantità necessaria per il numero totale di campioni da processare + 1. Questa miscela deve essere aggiunta al campione immediatamente (entro 15 minuti dalla preparazione).
2. Dopo l'incubazione, centrifugare brevemente le provette per eliminare l'eventuale liquido evaporato sui tappi ed aggiungere **35 µl di Magnetic Beads Viral DNA/RNA (assicurarsi di risospendere bene le biglie magnetiche prima di prelevarle dalla bottiglia di stoccaggio)** e **900µl di Binding Buffer Viral DNA/RNA** al campione lisato. Mescolare pipettando su e giù almeno **6 volte** e incubare per **5 minuti a TA**.
Le biglie e il Binding Buffer Viral DNA/RNA possono essere pre-miscelati.
3. Disporre le provette nel separatore magnetico ed attendere almeno **2 minuti** fino a quando tutte le biglie sono state attratte dal magnete. Rimuovere il surnatante con una pipetta, **evitando di toccare il pellet**.
4. Rimuovere le provette dal separatore magnetico. Aggiungere **500 µl di Wash Buffer A Viral DNA/RNA**, risospendere bene il pellet di biglie con ripetute pipettate e incubare **1 minuto a TA**
5. Separare le biglie disponendo le provette nel separatore magnetico. Attendere fino a quando tutte le biglie sono state attratte dal magnete (circa 1 minuto). Rimuovere il surnatante con una pipetta.
6. Ripetere i punti 4 e 5 con **500 µl di Wash Buffer B Viral DNA/RNA**. **Rimuovere bene il surnatante aspirando una seconda volta con un puntale più piccolo; in questa fase porre maggiore attenzione a non toccare il pellet.**
7. Dopo avere rimosso ogni traccia di **Wash Buffer B Viral DNA/RNA**, trasferire le provette nel termoblocco e lasciarle asciugare aperte per **20 minuti a 55°C** fino a quando tutto l'etanolo non è evaporato: il pellet di biglie deve diventare di colore marrone chiaro. Se ciò non accade, prolungare l'incubazione di altri 5 minuti o fino alla completa asciugatura.
E' importante che il pellet sia completamente asciutto e che non ci siano residui di etanolo sulle pareti della provetta; l'etanolo infatti può inibire l'amplificazione.
8. Aggiungere **70 µl di Elution Buffer Viral DNA/RNA** a ciascuna provetta e risospendere brevemente le biglie con la pipetta. Chiudere le provette, vortexare a bassa intensità (le biglie devono formare una sospensione omogenea) e incubare a **55°C per 5 minuti**.
9. Separare le biglie disponendo le provette nel separatore magnetico. Per almeno **1 minuto** Recuperare quindi il surnatante contenente l'RNA virale purificato e trasferirlo nelle provette finali di stoccaggio.

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

REAL TIME RT-PCR

- Impostare il profilo termico prima di preparare le mix.

Reagenti	Volume per campione
Mix A	0,6 µl
Mix B	0,4 µl
Mix C	5 µl

- **Risospendere bene le mix prima del loro utilizzo.**
- Preparare la Master Mix per il numero di campioni estratti (campioni + controllo negativo) + controllo positivo + 1 volume (+ 2 volumi per n>15, per avere una quantità di mix sufficiente per tutti i campioni da processare).
- Miscelare delicatamente e dispensare **6 µl** di Master Mix nelle piastre o strip da 0,2 ml precedentemente contrassegnate.
- Aggiungere in ciascuna provetta **14 µl** del rispettivo RNA estratto e mescolare pipettando.
- Per ultimo risospendere il controllo positivo in **14 µl** di acqua RNAsi, DNAsi e Proteasi free (fornita), aggiungere la mix e trasferire il tutto nella strip o piastra di amplificazione.

ATTENZIONE: dispensare e miscelare la mix e i campioni molto attentamente, evitando la formazione di bolle. Se possibile, centrifugare brevemente la piastra o le strip prima di posizionarle nello strumento.

SETUP DELLA CORSA

Accendere PC e Strumento Real Time.

Aprire il Programma "Bio-Rad CFX Manager Software" 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 3)
- "Protocol Editor – new"
- Mettere il volume di reazione (**20 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. **50°C for 15 min**
 2. **95° for 20 sec**
 3. **95°C for 15 sec**
 4. **60°C for 1 min**; aggiungere **plate read** a questo step
 5. **Inserire GOTO 3, 44 more times**
 6. **Opzionale: in caso di successivo utilizzo degli amplificati con GEN-C 2.0 (cod. NLM AC004/24), aggiungere 10°C forever (digitare 00:00 e quindi invio)**
- Cliccare OK. Salvare il nuovo protocollo.

⇒ **NOTE:** Il profilo termico per la RT-PCR è stato ottimizzato per gli strumenti CFX e C1000 (BioRad). Nel caso in cui si utilizzi un termociclatore differente potrebbe essere necessario modificarne le impostazioni, in accordo con le indicazioni fornite dal fabbricante.

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 4)
- ⇒ - 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
- Selezionare un pozzetto della piastra.
- Selezionare in “Sample Type → Unknown, Standard, Positive o Negative Control” a seconda della tipologia del campione
- Selezionare “Target Name”: *HCV per FAM e Internal Control per JOE* e spuntare la casella “Load” per inserire i fluorofori (FAM e JOE per tutti i campioni tranne il controllo positivo, dove deve essere selezionato solo FAM).
- Selezionare “Sample Name”, scrivere il nome del campione e quindi spuntare la casella “Load” per inserirlo.
- Cliccare “OK”. Salvare la nuova piastra.

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.

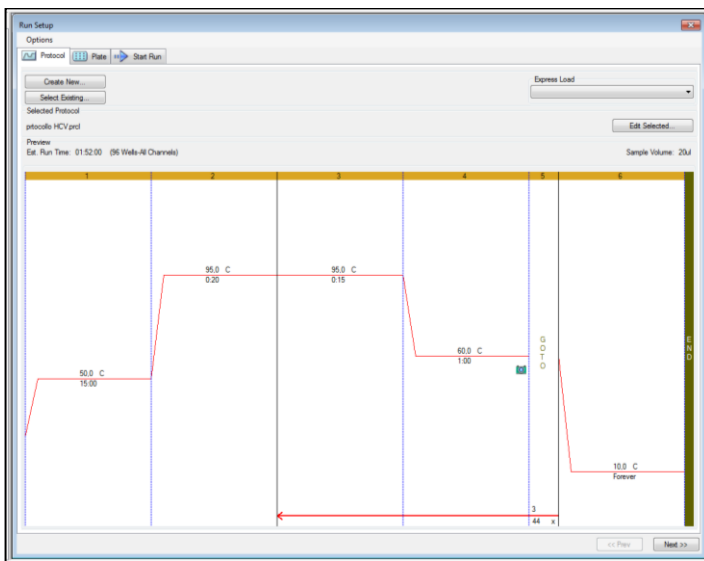


Figura 3

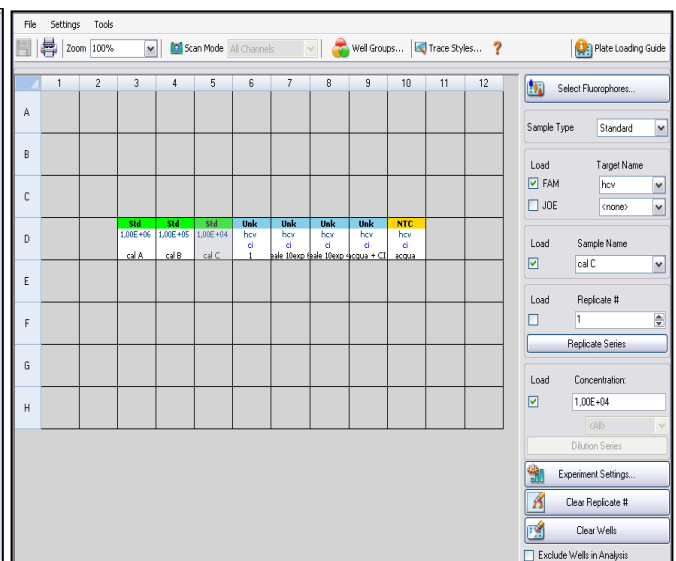


Figura 4

AVVIO DELLA SEDUTA

- Selezionare “Start Run” della finestra “Run Setup”.
- Lo strumento è pronto per iniziare la corsa. Preparare la piastra/strip con campioni e mix.
- Aprire il coperchio, posizionare la piastra/strip nello strumento e chiudere.
- 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 selezionare “STOP” per uscire dalla modalità “10°C forever”.

A questo punto si aprirà automaticamente la finestra “Data Analysis”.

Per escludere un campione dall’analisi andare in “plate setup-view/edit plate” (in alto a destra nella schermata). Selezionare il pozzetto corrispondente e spuntare la casella “Exclude well in analysis” in basso a destra.

In alto a sinistra selezionare *Settings* e impostare:

- *Cq determination mode: single threshold*
- *Baseline Setting: Baseline subtracted curve fit*
- *Apply Fluorescence Drift Correction*
- *Cycles to analyze: from 1 to 45*

Analizzare i dati di FAM e JOE separatamente.

FAM (figura 5): deselezionare Joe nella finestra di amplificazione. In alto a sinistra selezionare *Settings* e impostare:

- *Baseline threshold: Single Threshold-User defined*-introdurre il valore **25**. Cliccare **OK**
- Considerare il Ct di FAM dei campioni validi ed interpretare il risultato come segue:

	FAM Ct	Interpretazione
Campione	Presente	HCV RNA positivo
	Assente	HCV RNA non rilevato

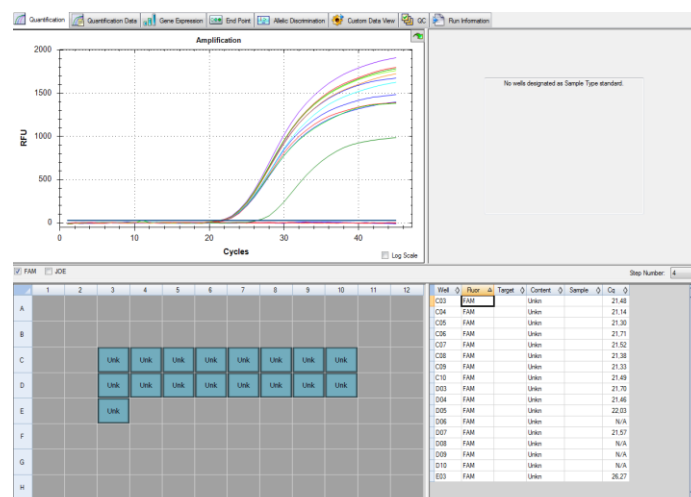


Figura 5

a) **JOE**: deselezionare FAM nella finestra di quantificazione. In alto a sinistra selezionare “Settings” e impostare:

- *Baseline threshold: Single Threshold-User defined*-introdurre il valore **100**. Cliccare **OK**.

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

	JOE 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

Se nella seduta vengono analizzati anche il controllo negativo ed il controllo positivo, interpretare i risultati come segue:

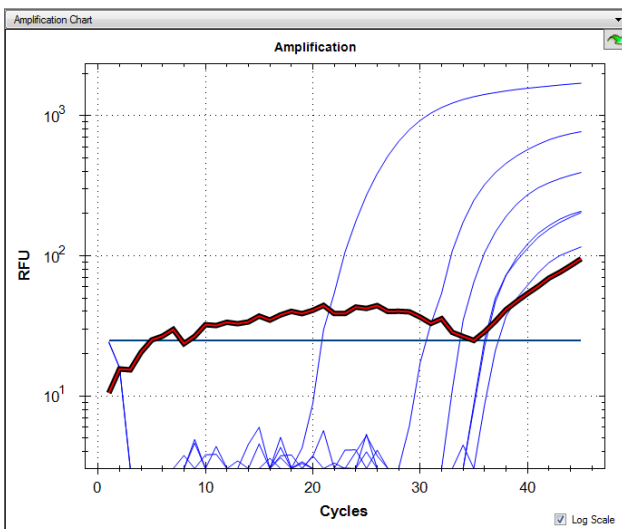
	FAM Ct	JOE Ct	Interpretazione
Controllo Negativo	Assente	Presente	Valido
	Assente	Assente	Non valido*
	Presente	Presente	Non valido**
Controllo Positivo	Presente	Assente	Valido
	Assente	Assente	Non valido*

(*) Ipotesi di inibizione della RT-PCR o degradazione dell'RNA in qualche passaggio della procedura.

(**) Possibile contaminazione.

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

Esempio 1 (figura 6a): il campione evidenziato in rosso nel grafico sembra mostrare un Ct positivo (35), ma dal dato grafico si evidenzia un artefatto strumentale. Il valore trovato di Ct non deve essere preso in considerazione ed 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 6a

Esempio 2 (figura 6b I e II): se il rumore di fondo della fluorescenza all'inizio della curva risulta troppo disomogeneo, è possibile escludere i primi cicli selezionando "Settings" e impostando "Cycles to analyze: from 10 to 45"

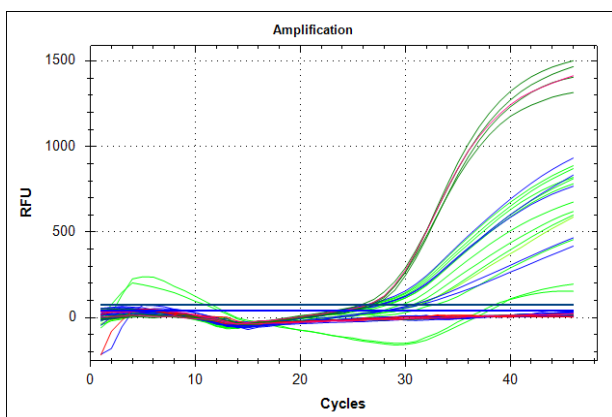


Figura 6b I

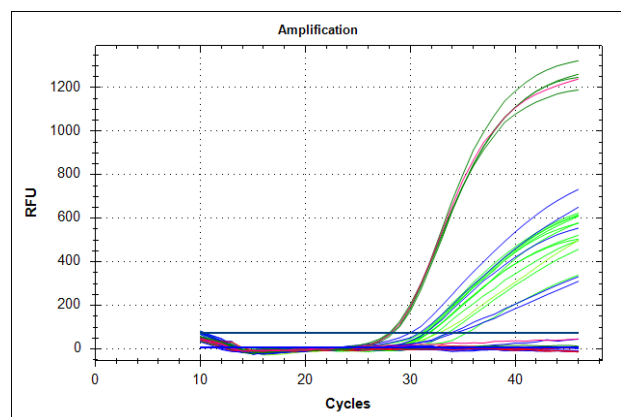


Figura 6b II

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

AVVERTENZE

- In caso di assenza del segnale atteso di JOE è consigliabile ripetere la seduta.
- Il controllo positivo non ha il C.I., quindi non ci si deve attendere il segnale di JOE.
- In caso di contaminazione è importante risalire all'origine (fase di estrazione e/o RT-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 HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 è stata determinata utilizzando 501 campioni di plasma negativo per HCV provenienti da donatori di sangue. 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 sei diluizioni scalari di un campione HCV positivo calibrato con il Terzo Standard Internazionale HCV WHO (NIBSC codice 06/100). Per le diluizioni è stato utilizzato un plasma negativo per HCV RNA ed anticorpi anti-HCV. L'analisi è stata condotta in accordo col manuale d'uso, estrazione compresa. Come indicato nella tabella sottostante, il limite di sensibilità del test HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 è di **18 UI/ml** (Probit analysis al 95%).

Diluizioni	N tot. repliche	N tot. positivi	% positivi
A (100UI/ml)	24	24	100%
B (50UI/ml)	24	24	100%
C (25UI/ml)	24	23	96%
D (12,5 UI/ml)	24	22	92%

*L'analisi Probit è stata eseguita con il programma StatPlus 2009.

Sensibilità diagnostica

Per valutare la sensibilità diagnostica sono stati utilizzati 10 pannelli di seroconversione per HCV, testati con Roche Cobas TaqMan HCV Test come sistema di riferimento. Tutti i campioni sono risultati conformi all'atteso.

Genotipi

Le prestazioni del kit HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 rispetto ai diversi genotipi di HCV sono state valutate analizzando diversi punti di diluizioni di campioni clinici HCV positivi aventi differente genotipo (come indicato di seguito). La carica virale dei campioni clinici è stata determinata utilizzando come riferimento il Terzo Standard Internazionale HCV WHO (NIBSC codice 06/100).

Genotipi testati: 1a, 1b, 2a, 2b, 2a/2c, 3a, 4c/4d, 5 e 6 (determinati col dispositivo NLM GEN-C cod. AC004 e sequenziamento).

Punti di diluizione analizzati:

- Gen 1a:** da $1,5 \times 10^2$ a $2,8 \times 10^6$ UI/ml
- Gen 1b:** da $1,1 \times 10^2$ a $4,3 \times 10^6$ UI/ml
- Gen 2:** da $9,8 \times 10^1$ a $2,7 \times 10^6$ UI/ml
- Gen 3:** da $1,5 \times 10^2$ a $2,8 \times 10^6$ UI/ml
- Gen 4:** da $4,5 \times 10^2$ a $1,8 \times 10^6$ UI/ml
- Gen 5:** 3×10^2
- Gen 6:** 7×10^2

Come mostrato nella figura sottostante (*figura 7*) la rivelazione dei diversi genotipi è confrontabile. L'efficienza di rilevazione del dispositivo HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 è pertanto indipendente dai genotipi analizzati.

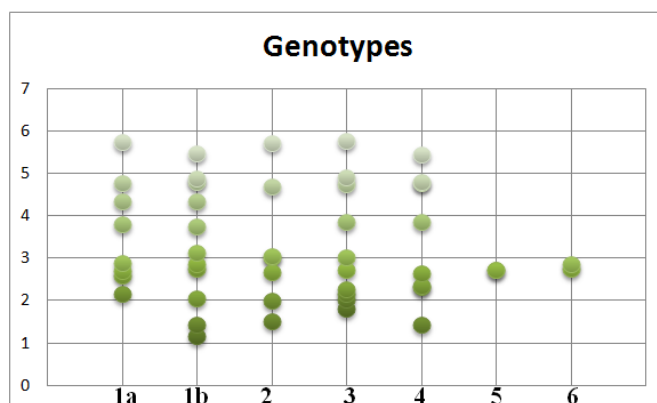


Figura 7. Il genotipo è stato determinato mediante il dispositivo GEN-C cod. AC004

Marcatori potenzialmente cross reattivi

Per valutare la potenziale cross reattività del test HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 con altri patogeni sono stati analizzati i seguenti campioni (provenienti da pazienti infetti):

Altri patogeni	N di campioni analizzati
HGV	2
HCMV	2
HIV	2
HBV	2
HPV	2
Herpes simplex Virus	2
Chlamydia trachomatis	2

Tutti i campioni non-HCV testati hanno dato un risultato negativo. Il test HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 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 100 campioni di plasma positivo per HCV (3 x 95% valore di soglia positivo, ca. 50 UI/ml); in ogni seduta è stato analizzato anche un campione negativo e un controllo positivo.

Il plasma di partenza è stato ottenuto da campioni di pazienti HCV positivi o diluendo in plasma umano negativo un campione positivo calibrato con il Terzo Standard Internazionale HCV WHO (NIBSC codice 06/100).

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

⇒ 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 almeno 5 sedute; l'estrazione è stata effettuata sia in manuale che in automatico.

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

Il test HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 non ha evidenziato alcuna cross-contaminazione fra i campioni.

Confronto con il sistema ABBOTT REAL TIME HCV (Abbott)

Le prestazioni del dispositivo HCV RNA REAL TIME QUALITATIVO 2.0 sono state confrontate con quelle del sistema ABBOTT REAL TIME HCV (Abbott) mediante l'analisi di 102 campioni positivi e negativi per HCV RNA provenienti dalla routine di un laboratorio ospedaliero.

I campioni positivi sono risultati tutti positivi, i campioni negativi hanno dato esito negativo.

I risultati ottenuti mostrano una buona correlazione tra i due dispositivi (*figura 8*).

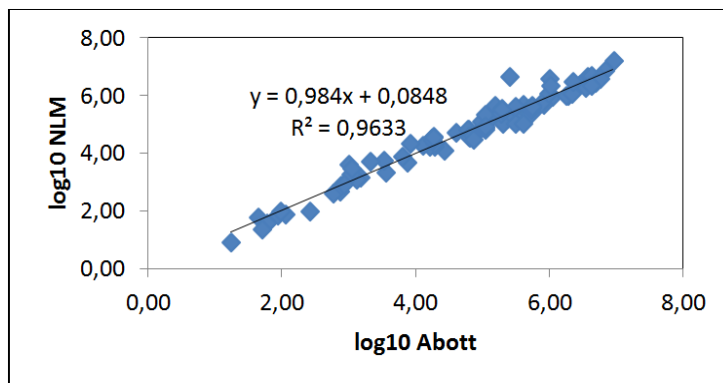














Figura 8

 Numero di lotto	 Codice	 Limite 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	 Controllo positivo	 Controllo negativo	 Testo modificato rispetto alla precedente versione

MOLECULAR BIOLOGY

VER 2 - 22/02/2018

REF AA896/24

24 TEST

REF AA896/48

48 TEST

GMDN 48374

EXTRACTION: AA1318 NOT INCLUDED

HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0

CE

0459

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.
HEAD OFFICE: Viale delle Industrie, 3 – 20090 SETTALA MI (Italy)
Tel (+39) 02/95. 24. 51 - Fax (+39) 02/95. 24. 52. 37
WEB: www.nlm.it – E-MAIL: segreteria@nlm.it

INTENDED USE

HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test provides reagents for the qualitative detection of C-hepatitis virus (HCV) RNA in human plasma samples by Real Time RT-PCR of the 5'-untranslated region (5'-UTR) of the viral RNA; the Core region is co-amplified to make the amplicons compatible with NLM HCV genotyping kit GEN-C 2.0 code AC004/24.

The Internal Control is endogenous (mRNA of the Housekeeping gene GAPDH) and is co-extracted and co-amplified in order to monitor the complete procedure.

This device has to be used in association with viral RNA extraction kit NLM code AA1318 "Viral DNA/RNA Extraction", to be ordered separately.

Viral RNA is retrotranscribed and amplified in one step RT-PCR Real Time, using CFX (BioRad).

⇒ The device can also be used to obtain biotinylated amplification products only for viral genotyping in combination with AC004/24 kit. In this case it is possible to amplify samples using the C1000 thermal cycler (BioRad) or equivalent instrument.

HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test is intended for use in association with clinical presentation and other laboratory markers (HCV-Ab, ALT, etc) for the diagnosis of HCV infection in patients.

The device is not intended for use as a screening test for the presence of HCV RNA in blood donors. The device is for professional use only.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus is the main etiologic agent of acute viral hepatitis that can lead, in most patients, to liver cirrhosis and then to hepatocellular carcinoma¹. HCV can also cause extrahepatic diseases²⁻⁴.

HCV genome is a linear single strand RNA with one ORF (Open Reading Frame); in 5' position there is an untranslated highly conserved region (5'-UTR), followed by the Core region, they both represent the target for viral molecular biology detection. The 5'-UTR and Core genetic heterogeneity among different HCV strains determines the classification into different genotypes^{5,7,8}. HCV has a parenteral transmission through exposure to infected blood. This exposure can occur in the context of blood transfusion before 1992, injection drug use, solid organ transplantation from infected donors, birth from an infected mother, occupational exposure to infected blood, high-risk sexual practice⁶.

After initial exposure, HCV RNA can be detected in patients blood within one to three weeks; acute infection can be severe but rarely is fulminant⁶.

Although generally asymptomatic, about 85% of the acute infections become chronic: persistence of HCV infection is diagnosed by the detection of HCV RNA in the blood for at least six months⁶.

The recent development of directly acting antiviral (DAA)-based regimens and the approval of the first, boceprevir- and telaprevir-based triple-therapy regimen, have brought new hopes for higher virus eradication rate across different disease settings. This calls for even more accurate and sensitive HCV RNA tests able to monitor faster virus kinetics and promptly detect treatment failures.⁹

With new viral load tests acting as "companion diagnostic", not only the conventional treatment but also the development and applications of the new generation DAA can be fully supported for a more effective management of chronic hepatitis C and its long-term complications⁹.

REFERENCES

1. Sarrazin C. *Diagnosis of hepatitis C: update 2004. Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2004) 19, S88-S93
2. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H et al. *Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. N Engl J med* 1993; 328: 465-470.
3. Agnello V, Chung RT, Kaplan RM. *A role for hepatitis C virus infection in Type II cryoglobulinemia. N Engl J Med* 1992; 327: 1490-1495.
4. Andreone P, Zignego AL, Cursaro C et al. *Prevalence of monoclonal gammopathies with hepatitis C virus infection. Ann Intern Med* 1998; 129: 294-298
5. Zein NN. *Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2000, p. 223-235.
6. *National Institutes of Health, Consensus Conference Statement. Management of hepatitis C: 2002.*
7. P.T. Hrabec et al. *Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. Virology Journal* 2006, 3:103

8. M. A. Ansari et al. HCV-Core Region: Its Significance in HCV-Genotyping and Type Dependent Genomic Expression. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2012 Mar 15; 5(1):30-39.
9. G. Colucci Molecular diagnostic and predictive tests in the evolution of chronic hepatitis C anti-viral therapies *BMC Infect Dis*. 2012; 12(Suppl 2): S8. Published online 2012 November 12

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test is based on two processes:

1. Viral RNA extraction
2. Reverse transcription, amplification and detection of target sequence using Real Time RT-PCR.



The Internal Control (GAPDH mRNA) is endogenous and therefore extracted together with the sample in order to monitor all the procedure (including the integrity of the plasma sample).

1. Viral RNA extraction

HCV and IC RNA extraction from human plasma samples has to be performed using “Viral DNA/RNA Extraction” (NLM code AA1318).

2. RT-PCR and Detection

RT-PCR target

The HCV RNA 5'-UTR region was chosen as target to detect the HCV presence in human plasma samples because it is highly conserved among HCV genotypes.

Co-amplification of Core region is included in order to discriminate genotypes 1a, 1b and 6 in case of samples that have to be analyzed with NLM AC004/24 Gen-C 2.0 kit.

The Internal Control is the mRNA of the constitutively expressed GAPDH gene that is co-extracted and co-amplified together with target HCV; the IC amplicon is similar to HCV target sequence in terms of length and base composition.

Reverse transcription and Amplification

Following extraction step, RNA (HCV and IC) is retrotranscribed and amplified in one-step RT-PCR, using appropriate enzymes and buffer conditions.

Detection

Real Time PCR allows target sequences detection during amplification itself, using suitable probes labeled with fluorescent dyes. In the amplification mix there are two specific probes, respectively for the Internal Control and for HCV 5'-UTR region, each labeled with a reporter dye and a quencher dye. The fluorescent reporter dye is different for the two probes: FAM for HCV 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 target of 5' → 3' nuclease activity of the DNA polymerase. When the donor and acceptor fluorophores are separated, the donor fluorescence can be detected at its specific wavelength: in this way, the amplification of the viral RNA and 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 machine 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*).

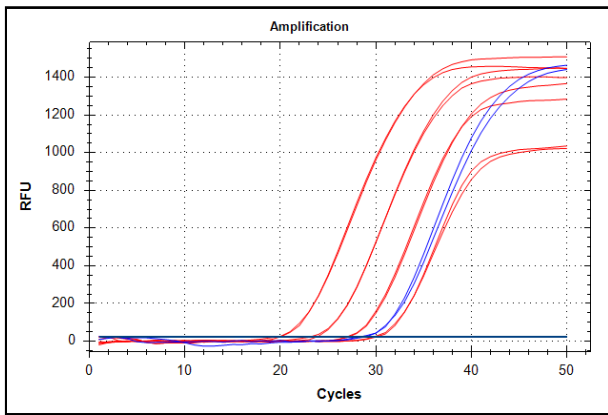


Figure 1: raw data is plotted on a graph of fluorescence versus cycle number.

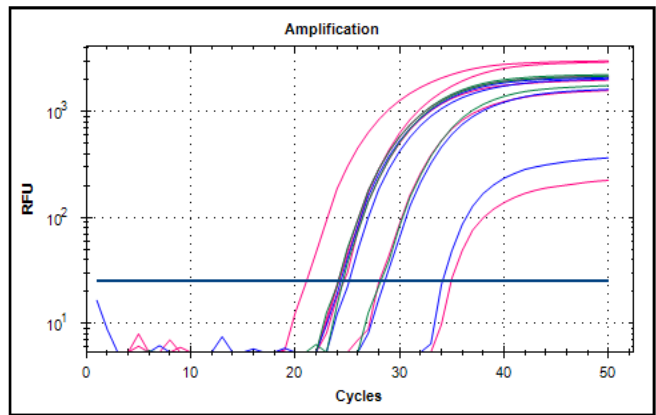


Figure 2: the normalized data is plotted on a log scale graph of fluorescence versus cycle number

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 RNA: the higher is target titer, the earlier the fluorescent signal reaches the threshold level.

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

Components	AA896/24 (24 test)	AA896/48 (48 test)
Mix A Probes Primers Tris-EDTA	1 x 26 µl	1 x 47 µl
Mix B Primers Tris-EDTA	1 x 55 µl	1 x 110 µl
Mix C RT-PCR enzymes MgCl ₂ dNTPs	1 x 170 µl	1 x 335 µl
Negative Control* Negative Control is human plasma non reactive for HIV-Ab and RNA, HCV-Ab and RNA, HBS-Ag and DNA. Negative Control has to be extracted.	2 x 600 µl	4 x 600 µl
Positive Control* Synthetic RNA Positive Control is provided in freeze-dried state. Resuspend it in 14 µl of water (provided) before use in RT-PCR step.	2 tubes	4 tubes
RNase, DNase and Protease free water	1 x 600 µl	1 x 600 µl

⇒ *Together with the samples to be tested, 1 Negative Control and 1 Positive Control shall be analysed in each run.

If the device is used only for viral genotyping in combination with NLM code AC004/24, it is not necessary to include the Positive and Negative controls.

STABILITY AND STORAGE

- All the reagents are stable up to the expiry date indicated on the label when stored at -25/-15°C.
- Thaw all the reagents on ice or at +2/+8°C.
- **Mixes** are stable until expiration date if stored at -25/-15°C. These reagents can be refrozen and thawed max 4 times.
- **Mix A** contains FAM and JOE fluorophores that are photosensitive: avoid prolonged exposure to light.
- **Master Mix** has to be used immediately after preparation; once dispensed in PCR tubes, discard the remaining reagent. Avoid prolonged exposure to light.
- The **Positive Control** is a template RNA, supplied pre-aliquoted and lyophilized: it is recommended to resuspend the reagent with RNase, DNase and Protease free water before use. Then add the master mix into the tube and transfer the entire volume in the amplification strip/plate; do this operation after the addition of the samples into the respective tubes to avoid contamination.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Viral RNA 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 anticoagulant, other types of anticoagulants may interfere with the performance of the test
- Aliquot **450 µl** of plasma for RNA extraction using biohazard vertical down-flow airbox and operate to avoid RNA degradation.
- Store samples at +2/+8°C until extraction step. If they are not processed immediately store them at -25/-15°C for up to 72 hours prior to freezing at ≤ -70°C.
- Avoid repeated freeze-thaw cycles of plasma samples
- Perform the procedure using universal precautions and handle samples as if 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 three different areas:
 - Area 1: pre-PCR (samples handling and extraction)
 - Area 2: Master Mix preparation and sample addition to the RT-PCR mix.
 - Area 3: post-PCR (Real Time PCR)

Each area should be provided with dedicated equipment and consumables (lab coats, centrifuge, tubes, pipettes, etc).

Workflow must proceed in a unidirectional manner, beginning in the RNA extraction area (Area 1), moving to the mastermix preparation and RNA addition area (area 2) and finally to amplification and detection area (Area 3). This means that consumables and PPE (lab coats, gloves, etc.) that have been introduced into the post-PCR room should never be placed back to the pre-PCR room without thorough decontamination.

- ✓ It's recommended to clean the workstation with 5-10% bleach (final concentration of sodium hypochlorite: 0,5% w/v) at the end of the procedure. Prepare bleach solution daily.
- ✓ 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.
- ✓ Work using vertical downflow airbox with UV lamp
- ✓ Change gloves frequently
- ✓ The absence of contamination is guaranteed by the analysis in each session of a negative control, 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

- The negative control is a human plasma sample non reactive for HIV-Ab and RNA, HCV-Ab and RNA, HBV HbsAg and DNA. However it should be handled as potentially infectious and should be treated with the necessary safety precautions.
- 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 reagents 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**

Vertical downflow airbox with UV lamp

Dedicated adjustable volume pipettes set and aerosol barrier tips 1,5 and 2 ml DNase, RNase free tubes

Magnetic separator

Vortex mixer and Heat block

Centrifuge

⇒ **AREA 2**

Vertical downflow airbox with UV lamp

Dedicated adjustable volume pipettes set and aerosol barrier tips DNase, RNase free
0,2 ml flat cap Real Time PCR, strips or plates DNase, RNase free

⇒ **AREA 3**

CFX (Biorad) and software

C1000 (BioRad) or equivalent thermal cycler: when the device is used only for viral genotyping in combination with AC004/24 device and not for the qualitative determination of the presence of HCV

ASSAY PROCEDURE

VIRAL RNA EXTRACTION

(Extraction method "Viral DNA/RNA Extraction", NLM code AA1318).

Refer to the instructions for use for preparation, handling and disposal of reagents, taking into account **450 µl** starting sample quantity.

This protocol is for manual use and involves the use of a 2 ml reaction tubes and a suitable magnetic separator. For the automation of the procedure with the Janus workstation (Perkin Elmer) contact Nuclear Laser Medicine.

Prepare the necessary amount of 2 ml centrifuge tubes (samples and negative control).

Before starting with the procedure set heat block to +55°C. Ensure that Proteinase K and Poly(A) RNA have been prepared as described.

1. Dispense in the following order **10 µl Proteinase K** and **450 µl** of **sample** into 2,0 ml centrifuge tubes. Add **450 µl Lysis Buffer Viral RNA** and then **6 µl Poly(A) RNA**; proceed pipetting up and down for at least **8 times** and incubate at **55°C** for **10 minutes**, vortexing ones or twice during incubation.

It is also possible to prepare a premix of Lysis Buffer Viral RNA and Poly(A) RNA, calculating the necessary amount for the number of samples + 1 to process. Use this mix within 15 minutes.

2. Following incubation, briefly centrifuge the samples to avoid contamination when opening the tubes. Add **35 µl** of resuspended **Magnetic Beads Viral DNA/RNA (the Magnetic Bead suspension should be mixed vigorously before dispensing)** and **900 µl** of **Binding Buffer Viral DNA/RNA** to each tube, mix by pipetting up and down for **at least 6 times** and incubate for **5 minutes** at RT.

It is possible to prepare a premix of beads and Binding Buffer Viral DNA/RNA.

3. Place the tubes in a magnetic separator for **at least 2 minutes** to let the beads be attracted by the magnets. Remove and discard supernatant by pipetting, **being careful not to take any beads**.
4. Remove the tubes from the magnetic separator. Add **500 µl Wash Buffer A Viral DNA/RNA** to the tube. Resuspend the beads by pipetting until the beads are completely resuspended and incubate for **1 minute** at RT.
5. Place the tube in the magnetic separator to draw the beads to the side of the tube (about 1 minute). Pipette off the supernatant and then remove the tube from the magnet.
6. Repeat the washing procedure (steps 4 and 5) with **500 µl Wash Buffer B Viral DNA/RNA**. **Discard Wash Buffer B Viral DNA/RNA repeating the aspiration with a fine-tipped pipette; be careful to remove all the residual fluid without disturbing the pellet.**
7. Transfer the tubes to the thermo block and let them air-dry at **55°C** for **20 minutes** to remove any traces of ethanol. The beads-pellet should become light brown when dried, otherwise extend the incubation for further 5 minutes or until completely dry

It is important that the beads are completely dried and that there aren't ethanol drops on the tube walls before continuing with the elution step, as residual ethanol can prevent amplification.

8. Add **70 µl** of **Elution Buffer Viral DNA/RNA** to the tubes and briefly resuspend the beads by pipetting. Close the tubes, gently vortex the tubes and incubate the suspension for **5 minutes** at **55°C**.
9. Separate the magnetic beads by placing the tubes in the magnetic separator for at least. **1 minute**. Transfer the supernatant containing the purified viral RNA to the desired storage tubes.

Purified RNA 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 RNA at +2/+8°C.

REAL TIME RT-PCR

- Set Real Time PCR profile before preparing Master Mix.

Reagents	Volume per sample
Mix A	0,6 µl
Mix B	0,4 µl
Mix C	5 µl

- **Carefully resuspend the mix before use.**

- ⇒
- Prepare Master Mix for the number of purified samples (clinical specimens and negative control) + positive control + 1 volume (+ 2 volumes for number of samples > 15, to have enough Master Mix for all the samples).
 - Mix gently and dispense **6 µl** of Master Mix in the plate/strip previously marked.
 - Add **14 µl** of purified RNA to each well/tube and mix pipetting up and down.
 - At last (to avoid cross contaminations), resuspend the positive control with **14 µl** RNase, DNase and Protease free water (provided), then add the mix and transfer all the volume in the specific well/tube .

WARNING: dispense mix and samples very carefully, in order to avoid creating air bubbles. If possible, centrifuge the plate/strip before placing it into the Real Time PCR instrument.

RUN SETUP

Turn on the PC and CFX.

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 and click on “*File - Repeat Run*”.

Create a new protocol

- “*Protocol → create New*” (figure 3)
- “*Protocol Editor – new*”
- Enter the reaction volume (**20 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):
 1. **50°C for 15 min**
 2. **95° for 20 sec**
 3. **95°C for 15 sec**
 4. **60°C for 1 min**; add “*plate read*” in this step
 5. **Insert GOTO 3, 44 more times**
 6. **Optional: for downstream application with GEN-C 2.0 (NLM code AC004/24), add 10°C forever (type 00:00 and press Enter)**
- Click OK. Save the new protocol.

- ⇒ **NOTE:** The thermal profiles for the RT_PCR step were optimized on the CFX and C1000 (BioRad) thermal cycler. It may be necessary to modify the profile according to the manufacturer’s instruction if a different thermal cycler is used.

PLATE SETUP

In “Run setup” window edit “plate” editor 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 4) in “Scan Mode” select “All channels”
- ⇒ - Select plate type: Setting → Plate Type → BR clear
- Click “Select Fluorophores” button and check FAM and JOE
- Select a well and on the right side of the window Choose “Sample Type → Unknown, Standard, Positive or Negative Control” depending on the type of sample
- In Target Name type HCV for FAM and Internal Control for JOE) and Select Load check boxes to insert fluorophores (FAM and JOE for each well except for the positive control where only FAM has to be loaded).
- Insert “Sample Name” and click “Load”. Check boxes to insert sample Name
- Click OK. Save the new plate.

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.

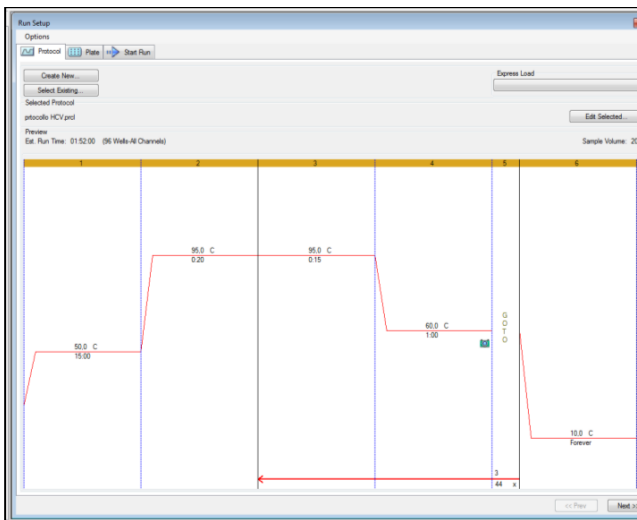


Figure 3

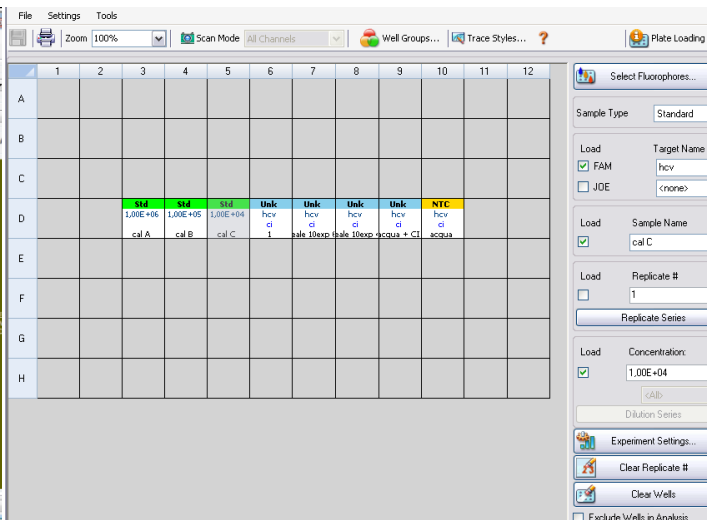


Figure 4:

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 assay click “Stop” to exit from 10°C forever mode. The window “Data Analysis” will open automatically.

To exclude a sample from the analysis go to “plate setup-view/edit plate” (in the upper right), click on the well to omit and then on “Exclude well in analysis” (in the lower right).

Click on “Settings” and select:

- Cq determination mode: single threshold
- Baseline Setting: Baseline subtracted curve fit
- Apply Fluorescence Drift Correction
- Cycles to analyze: from 1 to 45

Analyze data for FAM and JOE separately.

a) **FAM** (figure 5): deselect Joe in the amplification window.

- Baseline threshold: Single Threshold-User defined-introduce the value **25**. Click OK.

Check samples FAM Ct and interpret results as follows:

	FAM Ct	Interpretation
Sample	Present	positive HCV RNA
	Absent	HCV RNA not detected

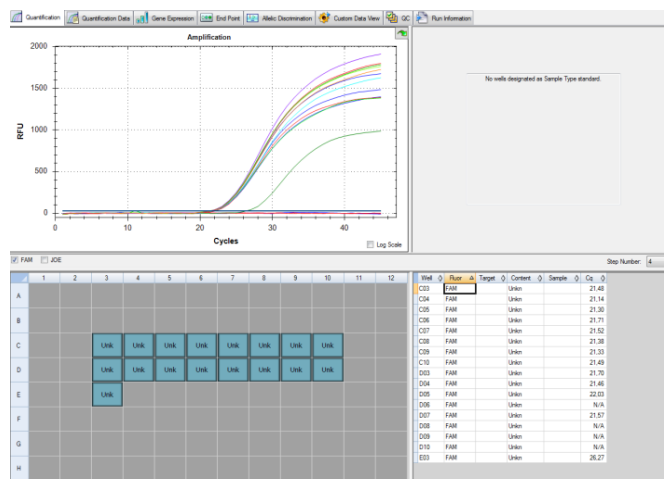


Figure 5

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

- Baseline threshold: Single Threshold-User defined-introduce the value **100**. Click OK

Check samples JOE Ct and interpret results as follows:

	JOE 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.

If negative and positive controls have been tested, interpret results as follows:

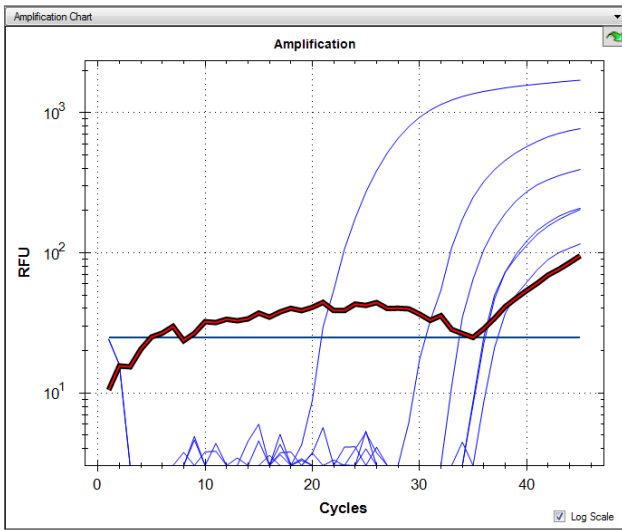
	FAM Ct	JOE Ct	Interpretation
Negative Control	Absent	Present	Valid
	Absent	Absent	Not Valid*
	Present	Present	Not Valid**
Positive Control	Present	Absent	Valid
	Absent	Absent	Not Valid*

(*) Hypothesis of RT-PCR inhibition or RNA degradation in one of the procedure steps

(**) Possible contamination

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

Example 1 (figure 6a): the sample in red in the graph shows a positive Ct value (35), but the graph itself shows it is an instrumental artifact. The Ct value should not be taken into account and the sample has to be repeated.



↓

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

Figure 6a

Example 2 (figure 6b I e II): If fluorescence signals at the beginning of the run are not homogeneous, it is possible to exclude the first cycles; select from "Settings" - Cycles to analyze: from 10 to 45

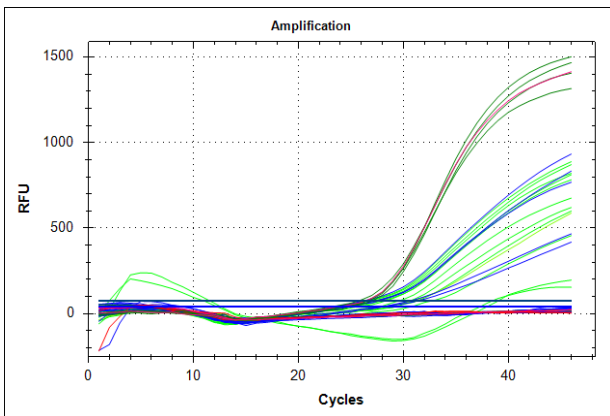


Figure 6b I

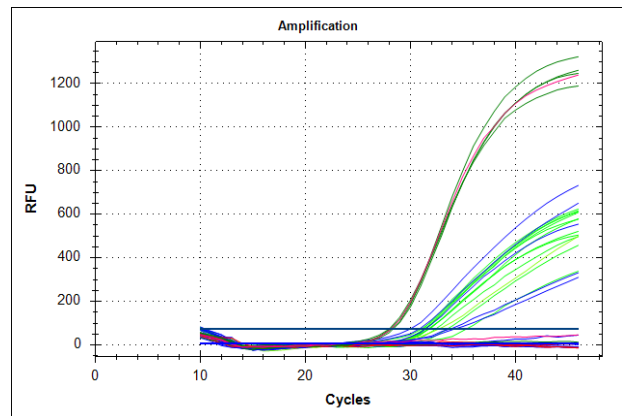


Figure 6b II

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

WARNING

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Specificity

The specificity of HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test was determined by analysing 501 HCV 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 dilution levels of an HCV positive clinical specimen calibrated with the HCV WHO 3rd International Standard (NIBSC code 06/100). For the dilutions a plasma negative for HCV RNA and antibodies was used. The analysis was performed according to instructions for use, RNA extraction included. As shown in table below, the detection limit of HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test is **18 IU/ml** (Probit analysis at 95%).

Dilutions	N tot. runs	N tot. positives	% positives
A (100 IU/ml)	24	24	100%
B (50 IU/ml)	24	24	100%
C (25 IU/ml)	24	23	96%
D (12,5 IU/ml)	24	22	92%

*Probit Analysis done with *Statplus 2009* software.

Diagnostic sensitivity

Diagnostic sensitivity was evaluated by analysing 10 HCV seroconversion panels, tested with Roche Cobas TaqMan HCV Test as reference system. All the samples gave the expected result.

HCV Genotypes

The performance of HCV RNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 test on different HCV genotypes was determined by analysing four dilution levels of different HCV positive clinical specimens genotypes (as listed below). The viral load of the samples used was determined by comparing the signal of the original samples with the signal of the HCV WHO 3rd International Standard (NIBSC code 06/100).

Genotypes tested: 1a, 1b, 2a, 2b, 2a/2c, 3a, 4c/4d, 5 and 6 (determined with NLM GEN C code AC004 and sequencing).

Dilutions analyzed:

- Gen 1a:** from $1,5 \times 10^2$ to $2,8 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 1b:** from $1,1 \times 10^2$ to $4,3 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 2:** from $9,8 \times 10^1$ to $2,7 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 3:** from $1,5 \times 10^2$ to $2,8 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 4:** from $4,5 \times 10^2$ to $1,8 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 5:** 3×10^2
- Gen 6:** 7×10^2

As showed in the graphic below (*figure 7*) detection of HCV RNA is comparable for the different genotypes analysed. Every tested samples gave a positive result, as expected, therefore detection efficiency of HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test is independent from the genotype.

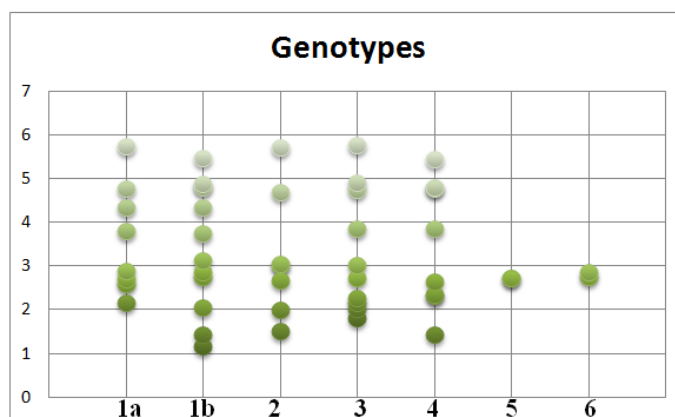


Figure 7 Samples genotype was determined using NLM GEN-C cod. AC004

Potential cross reactive markers

To evaluate the potential cross reactivity of HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test with other pathogens the following samples (from infected patients) were analysed:

Other pathogens	Nr of samples tested
HGV	2
HCMV	2
HIV	2
HBV	2
HPV	2
Herpes simplex Virus	2
Chlamydia trachomatis	2

Each non-HCV sample tested gave a negative result. Therefore HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test 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 100 HCV positive plasma samples were analysed (3 x 95% positive cut-off concentration ~ 50 IU/ml); in each run one negative control was added. The starting plasma was obtained diluting in human negative plasma a positive clinical specimen calibrated with the HCV WHO 3rd International Standard (NIBSC code 06/100).

All the HCV positive samples tested gave a positive result, therefore HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test doesn't lead to false-negative results.

⇒ Absence of Cross-contamination

Absence of Cross-contamination for the whole work-flow was demonstrated alternating high positive and negative samples in at least 5 runs.

All the negative samples tested resulted negative as expected.

Therefore HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 test showed no cross-contamination between positive and negative samples.

Comparison with ABBOTT REAL TIME HCV (Abbott)

The performance of the REAL TIME HCV QUALITATIVE test was compared to ABBOTT REAL TIME HCV (Abbott) by analysing 102 HCV positive and negative clinical samples.

All the positive samples gave a positive result and the four negative were found negative. Results obtained show a good correlation between these two assays (figure 8).

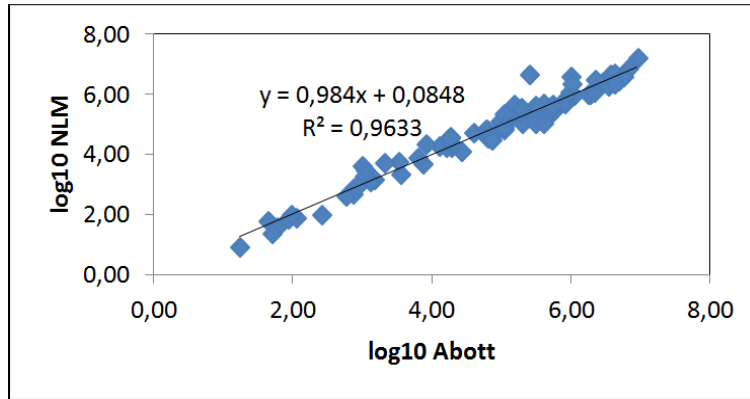
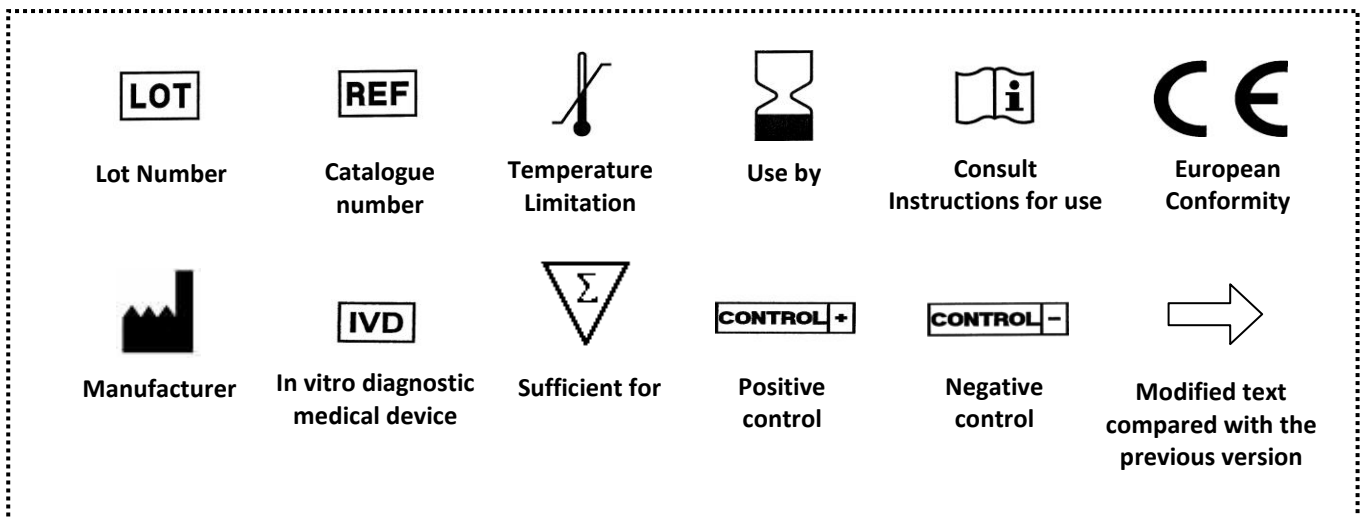


Figure 8



MOLEKULARBIOLOGIE

VER 2 – 22/02/2018

REF AA896/24

24 TEST

REF AA896/48

48 TEST

GMDN 48374

EXTRAKTION: AA1318 NICHT INKLUSIVE

HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0

CE
0459

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.
HAUPTSITZ: Viale delle Industrie, 3 – 20090 SETTALA MI (Italy)
Telefon (+39) 02/95. 24. 51 - Fax (+39) 02/95. 24. 52. 37
WEBSEITE: www.nlm.it – E-MAIL: segreteria@nlm.it

VERWENDUNGSZWECK

Der HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST stellt die Reagenzien für die qualitative Detektion von RNA des Hepatitis Virus C (HCV) aus humanem Plasma durch Real Time Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) der 5'-Untranslatierten Region (5'-UTR) von viraler RNA bereit; Zugleich wird die Core Region mit amplifiziert, um die Amplicons mit dem NLM HCV Genotypisierungskit GEN-C 2.0 code AC004/24 kompatibel zu machen.

Die interne Kontrolle ist endogen (mRNA des Haushalts Gens GAPDH) und wird in jeder Probe mit extrahiert und mit amplifiziert, um den gesamten Prozess mitverfolgen zu können.

Der HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST kann in Verbindung mit dem Viralen RNA Extraktionskit NLM code **AA1318** "Viral DNA/RNA Extraction" (als zusätzliche Bestellung erhältlich) verwendet werden.

Virale RNA wird durch Verwendung des CFX (BioRad) in einem RT-PCR Schritt retrotranskribiert und amplifiziert.

⇒ Wenn der HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST nur mit NLM AC004/24 Gen-C 2.0 verwendet wird, können die HCV Proben auch auf C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad) amplifiziert werden.

Der HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST wird bei Patienten mit der Diagnose einer HCV-Infektion und entsprechender Symptomatik sowie anderen Markern (HCV-Ab, ALT, usw.) eingesetzt.

Der Test ist nicht als Screeningtest für den Nachweis von HCV RNA in Blutspenden vorgesehen. Der Test ist nur zur Verwendung durch geschultes Personal vorgesehen.

EINLEITUNG

Hepatitis C Virus ist der Hauptkrankheitserreger der akuten viralen Hepatitis, welche bei den meisten Patienten zur Leberzirrhose und dann zu Leberzellkarzinom führt¹. HCV kann auch extrahepatische Krankheiten verursachen²⁻⁴. Das HCV Genom ist eine lineare einzelsträngige RNA mit einem offenen Leseraster ORF (engl. Open Reading Frame); in der 5' Position besitzt es eine untranslatierte hochkonservierte Region (5'-UTR), gefolgt von der Core Region (Kernregion), welche beide das Ziel für die molekularbiologische Detektion darstellen.

Die Heterogenität der 5'-UTR und Core Region zwischen verschiedenen HCV Stämmen bestimmt die Klassifizierung in unterschiedliche Genotypen^{5,7,8}.

HCV wird parenteral ausserhalb des Verdauungstrakts durch Exposition mit infiziertem Blut übertragen. Diese Exposition kann im Kontext mit Bluttransfusionen vor dem Jahr 1992, Drogen Injektion, Organtransplantation von infizierten Spendern, Übertragung bei der Geburt durch eine infizierte Mutter und ungeschützten sexuellen Praktiken erfolgen⁶.

Nach erstmaliger Exposition kann HCV RNA im Patientenblut nach einer bis drei Wochen detektiert werden; akute Infektionen können zwar schwere aber selten tödliche Auswirkungen haben⁶.

Wenn auch generell asymptomatisch, werden ungefähr 85% der akuten Infektionen chronisch: die Persistenz der HCV Infektion wird durch die Detektion von HCV RNA im Blut für mindestens sechs Monate diagnostiziert⁶.

Die Entwicklung von direkt wirkenden antiviral basierten Kuren (directly acting antiviral (DAA) und die Zulassung der ersten boceprevir- und telaprevir basierten Tripel Therapie Kur, bringt die Hoffnung mit sich, dass die Eradikationsrate des Virus in verschiedenen Krankheitsstadien höher ist. Dieses schreit geradezu nach genaueren und sensitiveren HCV RNA Tests, die die Viruskinetik schneller erfassen und gescheiterte Behandlungen zeitnah aufdecken⁹. Mit neuen Viruslasttests, die als begleitende Diagnostik dienen, kann nicht nur die herkömmliche Behandlung unterstützt werden, sondern auch die Entwicklung und Anwendung einer neuen Generation von DAA, um einen effizienteren Umgang mit der chronischen Hepatitis C und deren Langzeitkomplikationen zu erreichen⁹.

LITERATUR

10. Sarrazin C. *Diagnosis of hepatitis C: update 2004. Journal of Gastroenterology and Hepatology* (2004) 19, S88-S93

11. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J med* 1993; 328: 465-470.
12. Agnello V, Chung RT, Kaplan RM. A role for hepatitis C virus infection in Type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1992; 327: 1490-1495.
13. Andreone P, Zignego AL, Cursaro C et al. Prevalence of monoclonal gammopathies with hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med* 1998; 129: 294-298
14. Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2000, p. 223-235.
15. National Institutes of Health, Consensus Conference Statement. Management of hepatitis C: 2002.
16. P.T. Hraber et al. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology Journal* 2006, 3:103
17. M. A. Ansari et al. HCV-Core Region: Its Significance in HCV-Genotyping and Type Dependent Genomic Expression. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2012 Mar 15; 5(1):30-39.
18. G. Colucci Molecular diagnostic and predictive tests in the evolution of chronic hepatitis C anti-viral therapies *BMC Infect Dis*. 2012; 12(Suppl 2): S8. Published online 2012 November 12

TESTPRINZIP

HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST basiert auf zwei Prozessen:

1. Virale RNA Extraktion
2. Reverse Transkription, Amplifikation und Detektion der Zielsequenz mit Hilfe von Real Time RT-PCR.

⇒ Die interne Kontrolle (GAPDH mRNA) ist endogen und wird daher zusammen mit den Proben extrahiert, um den gesamten Prozess zu monitorieren (einschließlich der Integrität der Plasmaprobe).

1. Virale RNA Extraktion

HCV und IC RNA Extraktion von menschlichen Plasmaproben können mit Hilfe von "Viral DNA/RNA Extraction" (NLM code AA1318) durchgeführt werden.

2. RT-PCR und Detektion

RT-PCR Target (Zielsequenz)

Die HCV RNA 5'-UTR Region wurde als Target gewählt, um die HCV Präsenz in humanen Plasmaproben zu detektieren, weil sich diese Region unter den HCV Genotypen außergewöhnlich konserviert erwiesen haben.

Die Co-Amplifikation der Core-Region ist einbezogen, um eine Unterscheidung zwischen den Genotypen 1a, 1b und 6 vorzunehmen, wenn Proben mit dem NLM AC004/24 Gen-C 2.0 Kit weiter analysiert werden.

Die interne Kontrolle ist die mRNA des konstitutiv exprimierten GAPDH Gens, welches zusammen mit der HCV-Zielsequenz co-extrahiert und co-amplifiziert wird. Das IC Amplikon gleicht bezüglich der Basenpaarlänge und Basenpaarzusammensetzung der HCV-Zielsequenz.

Reverse Transkription und Amplifikation

Nach der Extraktion wird die RNA (HCV und IC) in einer Einschnitt-RT-PCR, unter Verwendung der richtigen Enzyme und Puffern, retrotranskribiert und amplifiziert.

Detektion

Während der Amplifikation der Zielsequenz werden die Proben in dem Real Time PCR Test, durch den Einsatz geeigneter und mit Fluoreszenzfarbstoffen doppelt markierter Sonden, detektiert. Im Amplifikationsmix gibt es zwei spezifische Sonden entsprechend für die interne Kontrolle und für die HCV 5'-UTR Region, welche jeweils mit einem Reporter (Signalfarbstoff) und einem Quencher (Lichtbogenlöscher) markiert sind. Der Reporter ist für die beiden Sonden unterschiedlich: FAM für HCV und JOE für IC.

Wenn die Sonden intakt sind und Donor und Quencher nahe zueinander positioniert sind, wird die durch den Donor emittierte Fluoreszenz, in Gegenwart einer Lichtquelle, vom nahen Quencher absorbiert. Während der Amplifikation bindet jede Sonde an ihre spezifische Sequenz

und bildet somit die Zielsequenz für die 5' → 3' nuklease Aktivität der DNA Polymerase. Wenn die Donor und Empfänger Fluorophoren getrennt sind, kann die Donor Fluoreszenz mit Hilfe ihrer spezifischen Wellenlänge detektiert werden. Dadurch kann die Amplifikation der Viralen RNA und IC während des Reaktionsverlaufs überwacht werden.

CFX (BioRad) beinhaltet in einem einzigen Gerät einen Thermocycler für die Zielsequenzamplifikation und einen Fluorometer für die Detektion der Fluoreszenz während der Prozesszyklen.

Der Computer, der mit der Real Time Maschine verbunden ist, sammelt die Fluoreszenzdaten, die durch eine spezielle Software verarbeitet, in einem Graphen angezeigt werden (*Abbildung 1*).

Nach der Aufzeichnung der Rohdaten, wird die Analyse durchgeführt. Die Rohdaten werden normiert, um das Hintergrundsignal zu korrigieren, dann kann ein Level für den Schwellenwert gesetzt werden: Auf diesem Level werden die Fluoreszenzdaten analysiert (*Abbildung 2*).

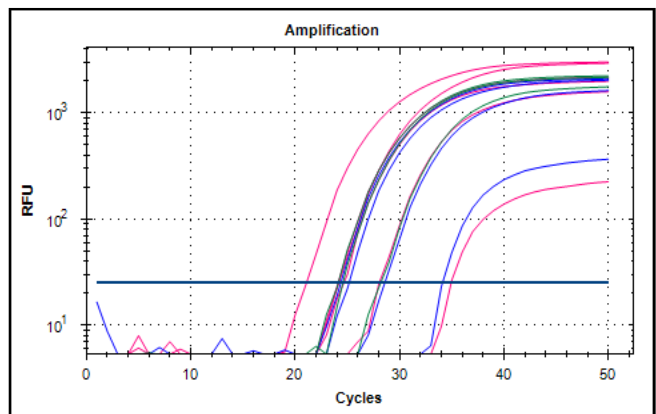
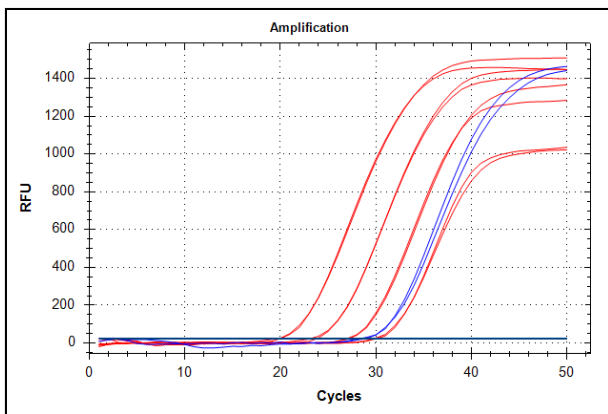


Abbildung 1: graphische Darstellung der Rohdaten - Fluoreszenz gegen Anzahl der Zyklen

Abbildung 2: Die normierten Daten werden auf einer log Skala graphisch aufgetragen - Fluoreszenz gegen Anzahl der Zyklen

Der Ct Wert gibt die Anzahl der Zyklen wieder bis eine Probe den Schwellenwert erreicht (Schwellenwertzyklus) und mit der Ausgangsmenge der Ziel-RNA verbunden ist: Je höher der Titer der Zielsequenz, desto eher erreicht das Fluoreszenz Signal den Schwellenwert.

⇒ **PRODUKTZUSAMMENSETZUNG (Lagern bei -25°/-15°C)**

Zusammensetzung	AA896/24 (24 Test)	AA896/48 (48 Test)
Mix A Sonden Primer Tris-EDTA	1 x 26 µl	1 x 47 µl
Mix B Primer Tris-EDTA	1 x 55 µl	1 x 110 µl
Mix C RT-PCR Enzyme MgCl ₂ dNTPs	1 x 170 µl	1 x 335 µl
Negative Kontrolle* Negative Kontrolle ist humanes Plasma nicht reaktiv für HIV-Ak und RNA, HCV-Ak und RNA, HBS-Ag und DNA. Negative Kontrolle muss extrahiert werden.	2 x 600 µl	4 x 600 µl
Positive Kontrolle* Synthetische RNA Positive Kontrolle wird lyophilisiert geliefert. Vor der Verwendung im RT-PCR schritt in 14 µl RNase-, DNase- und proteasefreien Wasser resuspendieren.	2 Röhrchen	4 Röhrchen
RNase-, DNase- und proteasefreien Wasser.	1 x 600 µl	1 x 600 µl

⇒ * In jedem einzelnen Lauf sollen 1 Negative Kontrolle + 1 Positive Kontrolle analysiert werden. Im Falle, dass der 24 Test Vorrat ausschließlich für die Genotypisierung verwendet wird und ist mit cod. AC004/24 kombiniert, ist 1 Negative Kontrolle +1 Positive Kontrolle in jedem Lauf nicht notwendig.

STABILITÄT UND LAGERUNG

- Bei Lagerung von -25 bis -15°C sind alle Reagenzien bis zum Verfallsdatum stabil, welches auf dem Label angegeben ist.
- Auftauen der Reagenzien erfolgt auf Eis oder bei +2 bis +8°C.
- Die **Mixe** sind bei Lagerung von -25 bis -15°C bis zum Verfallsdatum stabil. Diese Reagenzien können maximal bis zum viermal aufgetaut und eingefroren werden.
- **Mix A** enthält die Fluorophore FAM und JOE, welche lichtempfindlich sind: vermeiden Sie unnötigen Kontakt des Mixes A mit Licht.
- **Der Master Mix** muss nach dem Ansetzen sofort verbraucht werden; nach Verteilung in die PCR Röhrchen wird der verbleibende Rest verworfen. Vermeiden Sie unnötigen Kontakt des Master Mix mit Licht.
- Die positive Kontrolle ist eine Template RNA, sie wird aliquotiert und lyophilisiert geliefert: es wird empfohlen das Reagenz in RNase-, DNase- und proteasefreiem Wasser vor der Verwendung zu resuspendieren. Fügen Sie den Master Mix in das Röhrchen und überführen Sie das gesamte Volumen in das Amplifikations Strip/Plate; tun Sie dies nach Zugabe der Proben in den entsprechenden Röhrchen um Kontaminationen zu vermeiden.

SAMMELN UND HANDHABUNG DER PROBEN

Virale RNA wird aus humanen Plasmaproben innerhalb von 6 Stunden nach Blutentnahme isoliert und aufgereinigt.

- Sammeln Sie das Blut unter Einhaltung allgemeiner Sicherheitshinweise.
- Sammeln Sie die Blutproben in sterilen Röhrchen mit EDTA (Anticoagulant) und zentrifugieren Sie bei 1000-1500g für 10-15 Minuten, um das Plasma aufzutrennen. Verwenden Sie nur EDTA als Anticoagulant, andere Anticoagulantien können den Test beeinflussen.
- Aliquotieren Sie **450 µl** des Plasmas, um die RNA zu extrahieren
Verwenden Sie Biohazard Vertical down-flow airbox und vermeiden Sie RNA Degradierung.
Lagern Sie die Proben bei +2 bis +8°C bis zum Extraktionsschritt. Sollten Sie sie nicht sofort weiterbearbeitet werden, so sollten die Proben bei -25 bis -15°C bis zu 72 Stunden gelagert werden, bevor sie bei ≤ -70°C gelagert werden.
- Vermeiden Sie mehrfache Auftau-Einfrier-Zyklen der Plasma Probe.
- Führen Sie die Prozedur unter Verwendung allgemeiner Vorsichtsmaßnahmen durch, und handhaben Sie die Proben als infektiöses Material.

⇒ VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur professionell geschultes Personal sollte dieses Kit benutzen. Handhaben Sie dieses Produkt gemäß den GLP Empfehlungen (good laboratory practices).
- Aufgrund der hohen Sensitivität des Tests ist besondere Aufmerksamkeit gefordert, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
 - ✓ Es wird empfohlen den Assay in drei verschiedenen Bereichen durchzuführen:
 - Bereich 1: pre-PCR (Proben Handhabung und Extraktion)
 - Bereich 2: Master Mix Zubereitung
 - Bereich 3: post-PCR (Real Time PCR)Jeder Bereich soll mit der richtigen und passenden Ausrüstung ausgestattet werden (Kittel, Pipetten, Röhrchen usw.). Die Arbeit soll unidirektional vom Bereich 1 bis zum Bereich 3 fortschreiten. Das heißt die Ausrüstung und Persönliche Schutzausrüstung, die sich im Bereich 3 befinden, dürfen nicht zum vorherigen Bereich gebracht werden, ohne vorher dekontaminiert zu werden.
 - ✓ Vergewissern Sie sich, dass die Arbeitsstationen nach Verrichtung der Arbeitsplatz mit 5-10%iger Bleiche (Endkonzentration von Natriumhydrochlorit: 0,5% w/v) gereinigt werden. Die Bleichlösung täglich herstellen..
 - ✓ Alle Verbrauchsmaterialien (Pipettenspitzen und Röhrchen) müssen DNase- RNase-frei sein. Benutzen Sie Pipettenspitzen mit Filtern, um Aerosole zu vermeiden. Verwenden Sie immer eine neue unbenutzte Spitze für den Pipettiervorgang.
 - ✓ Verwenden Sie eine Sicherheitswerkbank mit UV Beleuchtung (laminar flow cabinet)
 - ✓ Verwenden Sie öfter neue Handschuhe
 - ✓ Wenn in jedem Lauf zur Überprüfung des gesamten Arbeitsablaufs mit Beginn bei der Extraktion, eine Negativkontrolle mitgeführt und als negativ bestätigt wird, kann eine Kontamination ausgeschlossen werden.
- Die negative Kontrolle ist humanes Plasma nicht reaktiv für HIV-Ak und RNA, HCV-Ak und RNA, HBS-Ag und DNA. Trotzdem sollte die Negativkontrolle als potentiell infektiös gehandhabt werden.
- Entsorgen Sie alle gebrauchten Materialien gemäß der local und national geltenden Richtlinien
- Das Essen, Trinken, Rauchen oder auftragen von Kosmetika ist in Bereichen, in denen Reagenzien und Proben verwendet werden verboten.
- Im Falle eines Hautkontaktes mit Reagenzien sofort mit Wasser waschen und medizinischen Rat aufsuchen.
- Verwenden Sie das Kit nicht mehr nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums.
- Mischen Sie nicht die Reagenzien verschiedener Chargen.
- Verwenden Sie das Kit nicht wenn die Box stark beschädigt ist. Kontaktieren Sie den Hersteller/Lieferanten.
- Es ist ratsam konstante und einheitliche Temperaturverhältnisse im Labor zu haben, vermeiden Sie die Nähe zu Wärme bzw. Kühlquellen für die Kitinhalte während des Versuchs.

BENÖTIGTES ABER NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

⇒ BEREICH 1

Vertikale Sicherheitswerkbank mit UV Beleuchtung
Volumeneinstellbares Pipettenset und Filterspitzen 1,5 und 2 ml DNase- und RNase-freie Röhren
Magnetabscheider
Vortexmixer und Heizblock
Zentrifuge

⇒ BEREICH 2

Vertikale Sicherheitswerkbank mit UV Beleuchtung
Volumeneinstellbares Pipettenset und Filterspitzen DNase- und RNase-frei
0,2 ml DNase- und RNase-freie Röhren, Streifen mit 8 DNase- und RNase-frei, Flachdeckel für Real Time PCR
RNase- und DNase- frei

⇒ BEREICH 3

CFX (Biorad) und Software
C1000 (Biorad) oder gleichwertiger Thermozykler. Im Falle, dass der Vorrat ausschließlich für die virale Genotypisierung, mit cod. AC004/24 kombiniert, verwendet wird und ist und nicht für die qualitative Bestimmung der viralen RNA.

TESTDURCHFÜHRUNG

EXTRAKTION DER VIRALEN RNA

(Extraction method "Viral DNA/RNA Extraction", NLM code AA1318)

Beziehen Sie sich auf die Anleitung für die Vorbereitung, Handhabung und Entsorgung der Reagenzien. Für den Test benötigen Sie **450 µl** Probenvolumen.

Dieses Protokoll ist für den manuellen Gebrauch und sieht den Gebrauch von 2ml Röhren und eines geeigneten Magnetic Separator vor. Kontaktieren Sie Nuclear Laser Medicine für eine automatisierte Form mit Janus Workstation (Perkin Elmer).

Bereiten Sie die notwendige Anzahl an 2 ml Zentrifugenröhren (Proben und Negativkontrolle) vor. Stellen Sie den Heizblock auf +55°C. Die Proteinase K und Poly(A)RNA müssen, wie beschrieben, vorbereitet sein.

1. Geben Sie **10 µl Proteinase K** und **450 µl** der Probe in das 2 ml Zentrifugenröhren. Geben Sie **450 µl Lysis Puffer Viral RNA** und dann **6 µl Poly(A) RNA**; achtmal hoch und runter pipettieren und bei **55°C** für **10 Minuten** inkubieren, einmal oder zweimal vortexen während der Inkubation.
Es ist auch möglich einen Premix aus Lysis Buffer Viral RNA und Poly(A) RNA vorzubereiten, indem Sie die erforderliche Menge + einem Ansatz berechnen (innerhalb 15 Min. nach der Vorbereitung).
2. Nach der Inkubation kurz herunterzentrifugieren, um Kontaminationen beim Öffnen der Röhren zu vermeiden. Geben Sie **35 µl** der **Magnetic Beads Viral DNA/RNA (die Magnetic Bead Suspension sollte vor Verwendung gut durchgemischt werden)** und **900 µl** des **Binding Buffer Viral DNA/RNA** zu jedem Röhren, mischen durch sechsmal hoch und runter pipettieren und bei Raumtemperatur 5 min inkubieren.
3. Platzieren Sie die Röhren **für mindestens 2 Minuten** in den Magnetic Separator, um die Kügelchen durch die Magnete anziehen zu lassen. Entfernen Sie den Überstand durch vorsichtiges Abpipettieren, ohne Kügelchen mitzunehmen.
4. Nehmen Sie die Röhren aus dem Magnetic Separator. Geben Sie **500 µl Wash Buffer A Viral DNA/RNA** zu. Resuspendieren Sie die Kügelchen/Beads durch Auf- und Abpipettieren bis die Kügelchen vollkommen resuspendiert sind und inkubieren Sie **1 Minute** bei Raumtemperatur.
5. Platzieren Sie das Röhren in den Magnetic Separator, um die Kügelchen an die Seite zu ziehen (etwa 1 Minute). Pipettieren sie den Überstand ab und entfernen Sie das Röhren vom Magneten.
6. Wiederholen Sie den Waschvorgang (Schritte 4 und 5) mit **500 µl Wash Buffer B Viral DNA/RNA**.

Verwerfen Sie den **Wash Buffer B Viral DNA/RNA**. Die **Aspiration** erfolgt mit einer kleiner **Pipette**, **entfernen Sie die restliche Flüssigkeit, ohne das Pellet zu berühren**.

7. Setzen Sie die Röhrcchen in den Heizblock und lassen Sie die Röhrcchen bei **55°C** für **20 Minuten** an der Luft trocknen, um restliches Ethanol zu entfernen. Das Kügelchenpellet sollte nach dem Trocken hellbraun erscheinen, ansonsten das Trocknen so lange fortführen bis ein komplett trockenes Pellet erhalten wird. Vor dem Elutionsschritt ist es sehr wichtig, dass die Kügelchen komplett getrocknet sind und dass es keine Ethanoltröpfchen an den Gefäßwänden der Röhrcchen mehr gibt, da restliches Ethanol die Amplifikation empfindlich stört.
8. Geben Sie **70 µl** vom **Elution Buffer Viral DNA/RNA** zu den Röhrcchen und resuspendieren Sie durch kurzes Pipettieren der Kügelchen. Schließen Sie die Röhrcchen, vortexen Sie leicht und inkubieren Sie die Suspension für **5 Minuten** bei **55°C**.
9. Trennen Sie die magnetischen Kügelchen durch das Platzieren der Röhrcchen für mindestens 1 Minute in den Magnetic Seperator. Überführen Sie den Überstand, der die aufgereinigte Virale RNA enthält, in saubere Röhrcchen. Die aufgereinigte RNA kann bei +2 bis +8°C gelagert werden, wenn es sofort verwendet wird, ansonsten muss es bei -25 bis -15°C oder aber bei ≤ 70°C für längere Perioden eingefroren werden. Es ist empfohlen RNA bei +2 bis +8°C aufzutauen.

REAL TIME RT-PCR

- Vor der Zubereitung des Master Mix müssen Sie ein Real Time PCR Profil aufsetzen.

Reagenzien	Volumen pro Probe
Mix A	0,6 µl
Mix B	0,4 µl
Mix C	5 µl

- **Vor dem Gebrauch des Mixes vorsichtig resuspendieren.**
- ⇒ - Bereiten Sie den Master Mix entsprechend der Anzahl der aufgereinigten Proben vor (Klinische Proben und Negativkontrolle) + Positivkontrolle + 1 Ansatz (+ 2 Ansätze per n>15 um ausreichend Master Mix für alle Proben zu haben)
- Mischen Sie vorsichtig und geben **6 µl** des Master Mix in den zuvor markierten Streifen/Platte.
- Geben Sie **14 µl** der aufgereinigten RNA zu jedem Well/Röhrcchen und mischen Sie vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren.
- Als letzten Schritt und um Kreuzkontaminationen zu verhindern wird die Positivkontrolle mit **14µl** RNase-, DNase- und proteasefreiem Wasser resuspendiert. Dann wird der Mix hinzugegeben und das gesamte Volumen in die spezifischen Wells/Röhrcchen überführt.
Achtung: Verteilen Sie den Mix vorsichtig, um Luftblasen zu vermeiden. Falls möglich zentrifugieren Sie noch einmal die Platte/Streifen bevor Sie es in das Real Time PCR Gerät platzieren.

RUN SETUP

Schalten Sie den PC und CFX an.

Öffnen Sie die "Bio-Rad CFX Manager Software" und klicken Sie auf "Create new run", wählen Sie das Model, welches verwendet wird und klicken Sie auf "OK"; das "Run Setup" Fenster wird geöffnet.

Es ist möglich ein neues Protokoll für einen Lauf zu erstellen, ein Vorhandenes auszuwählen oder zu verändern. Um einen Lauf mit den gleichen Settings zu wiederholen, öffnen Sie den gewünschten Lauf und klicken auf "File - Repeat Run".

Erstellen eines neuen Protokolls

- "Protocol -> create New" (Abbildung 3)
- "Protocol Editor - New"
- Geben Sie das Reaktionsvolumen (**20 µl**) im "Sample Volume" Kästchen
- Fügen Sie die Schritte durch klicken auf "Insert Step" auf der linken Seite des Fensters (hier ist es möglich die Temperaturen und Zeiten auf dem Graphen oder im darunter befindlichen Test direkt durch Doppelklick zu verändern):
 1. **50°C for 15 min**
 2. **95° for 20 sec**
 3. **95°C for 15 sec**
 4. **60°C for 1 min**; fügen Sie "**plate read**" in diesem Schritt hinzu
 5. **Insert GOTO 3, 44 more times**
 6. **Optional: Für Downstreamanwendungen mit GEN-C 2.0 (cod. NLM AC004/24), 10°C unendlich hinzufügen (type 00:00) und drücken Sie Enter**
- Klicken Sie OK. Speichern Sie das neue Protokoll.

⇒ **ACHTUNG**; Für die RT-PCR ist das thermische Profil für die Instrumenten CFX und C1000 (BioRad) optimiert worden. Gemäß den Herstellerhinweisungen sollte man die Einstellung ändern müssen, im Falle dass einen anderen Thermozykler verwendet wird.

PLATE SETUP

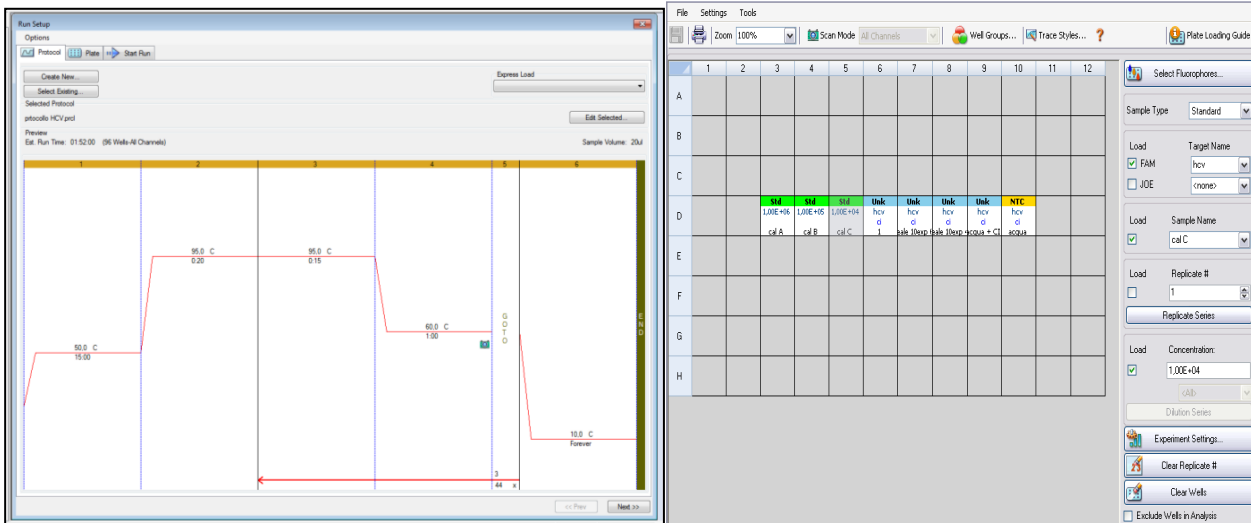
Im Fenster "Run setup" bearbeiten Sie "plate" editor window. Es ist möglich eine neue "plate" einzurichten oder ein bereits existierendes zu wählen bzw. zu modifizieren.

Eine neue "plate" einrichten

- "Plate → create New"
- Im Fenster "Plate Editor – new" (Abbildung 4)
- ⇒ - Setting → Plate Type → BR clear
- in "Scan Mode" wählen Sie "All channels" aus
- Klicken Sie auf "Select Fluorophores" und überprüfen Sie FAM und JOE
- Wählen Sie ein Well aus und suchen Sie auf der rechten Seite des Fensters "Sample Type → Unknown, Standard, Positive or Negative Control" aus (abhängig vom Typ der Probe)
- Für den Target-Namen tippen Sie HCV für FAM und interne Kontrolle für JOE und wählen „Load“, überprüfen Sie die Kästchen um die Fluorophore einzufügen (FAM und JOE für jedes Well außer für die Positivkontrolle, dort wird nur FAM geladen).
- Geben Sie die Probenamen in "Sample Name" ein und klicken Sie "Load". Überprüfen Sie Kästchen um die Probenamen einzugeben
- Klicken Sie Ok. Speichern Sie die neue Platte ("**plate**")

Auswählen/modifizieren vorhandener Protokolle

- Um ein vorhandenes Protokoll (Plate) zu importieren klicken Sie *“Select Existing”* im *Protokoll/Plate* Fenster
- Um ein vorhandenes Protokoll (Plate) zu modifizieren klicken Sie *“Select Existing”* → *“Edit Select”*.
- Fahren Sie wie oben beschrieben Fort.



LAUF STARTEN

- Bereiten Sie die Platte/Streifen mit den Proben und Mix vor.
- Klicken Sie im *“Start Run”* Tab *“Open Lid”*, platzieren sie die Platte/Streifen in das CFX Instrument und klicken Sie *“Close Lid”*. Drücken Sie zum Starten *“Start Run”*.
- Es ist möglich die Rohdaten während des Tests im *“Run Details”* –Fenster , im *“Real Time status”* zu monitoren

DATEN AUSWERTUNG

Am Ende des Tests klicken Sie *“Stop”* um den *10°C forever* Modus zu beenden. Das Fenster *“Data Analysis”* öffnet automatisch.

Um eine Probe von der Analyse auszuschließen, gehen Sie zu *“plate setup-view/edit plate”* (oben rechts), Klicken Sie auf das auszulassende Well und dann *“Exclude well in analysis”* (weiter unten rechts).

Klicken Sie auf *“Settings”* und wählen Sie:

- *Cq determination mode: single threshold*
- *Baseline Setting: Baseline subtracted curve fit*
- *Apply Fluorescence Drift Correction*
- *Cycles to analyze: from 1 to 45*

Analysieren Sie die Daten für FAM und JOE getrennt.

a) **FAM** (Abbildung 5): Heben Sie die Auswahl JOE im Amplifikationsfenster auf. Klicken Sie auf *“Settings”* und wählen Sie:

- *Baseline threshold: Single Threshold-User defined-introduce the value 25*. Klicken Sie *OK*.

Überprüfen Sie die FAM Ct Proben und interpretieren Sie die Ergebnisse folgendermaßen:

	FAM Ct	Interpretation
Probe	Präsent	positive HCV RNA
	Abwesend	HCV RNA nicht detektiert

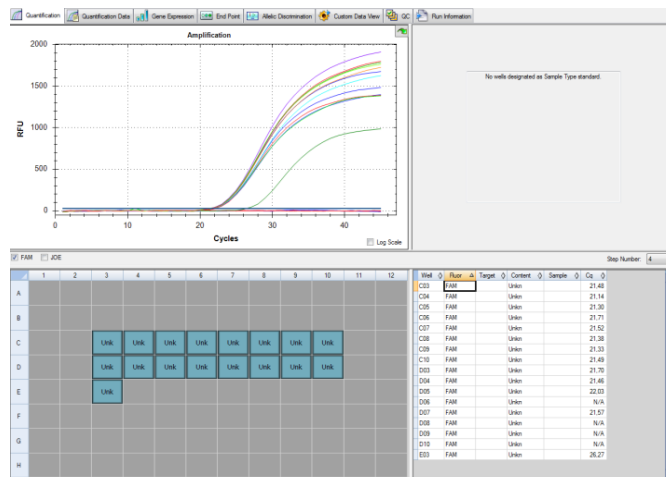


Abbildung 5

b) **JOE:** Heben Sie die Auswahl FAM im Amplifikationsfenster auf. **Klicken** Sie auf “Settings” und wählen Sie:

- *Baseline threshold: Single Threshold-User defined-introduce the value 100.* Klicken Sie **OK**

Überprüfen Sie die JOE Ct Proben und interpretieren Sie die Ergebnisse folgendermaßen:

	JOE Ct	Interpretation
Probe	Präsent	Valid
	Abwesend	Not Valid*

(**In Abwesenheit der IC Signalprobe kann das Ergebnis nicht bestätigt werden, daher sollte der Probenlauf wiederholt werden*

Wenn Negativ und Positiv Kontrollen getestet wurden interpretieren Sie die Ergebnisse folgendermaßen:

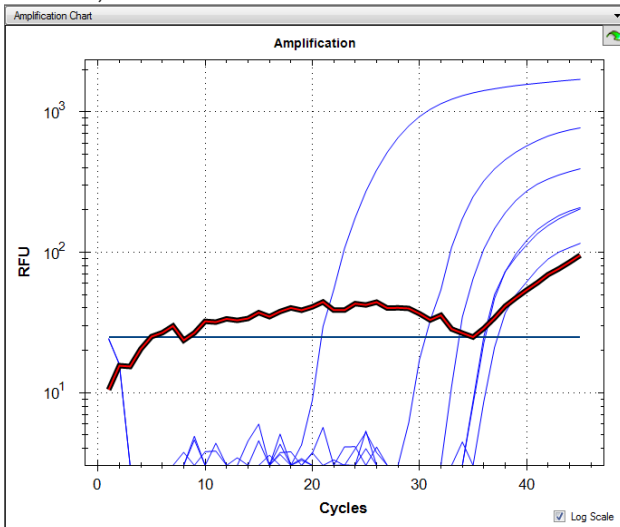
	FAM Ct	JOE Ct	Interpretation
Negativkontrolle	Abwesend	Präsent	Valid
	Abwesend	Abwesend	Not Valid*
	Präsent	Präsent	Not Valid**
Positivkontrolle	Präsent	Abwesend	Valid
	Abwesend	Abwesend	Not Valid*

(**Hypothese der RT-PCR Inhibition oder RNA Degradierung in einem der Arbeitsschritte*

(***Mögliche Kontamination*

Achtung: Für eine richtige Interpretation der Ergebnisse, sollte immer Acht auf den Graphen des Laufs gegeben werden.

Beispiel 1 (Abbildung 6a): Die rote Probe im Graphen zeigt einen positiven Ct Wert (35), aber der Graph selbst zeigt es als ein instrumentelles Artefakt. Der Ct Wert sollte nicht berücksichtigt werden, und die Probe muss wiederholt werden.



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

Abbildung 6a

Beispiel 2 (Abbildung 6bI und 6bII): Wenn die Fluoreszenzsignale zu Beginn des Laufs nicht homogen sind, ist es möglich, die ersten Zyklen wegzulassen; wählen Sie aus den "Settings" - Cycles to analyze: from 10 to 45

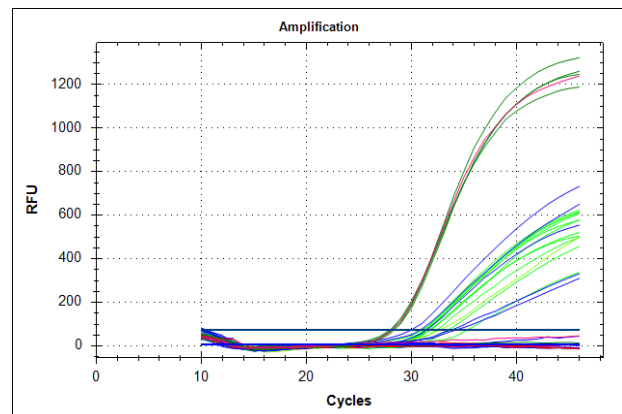
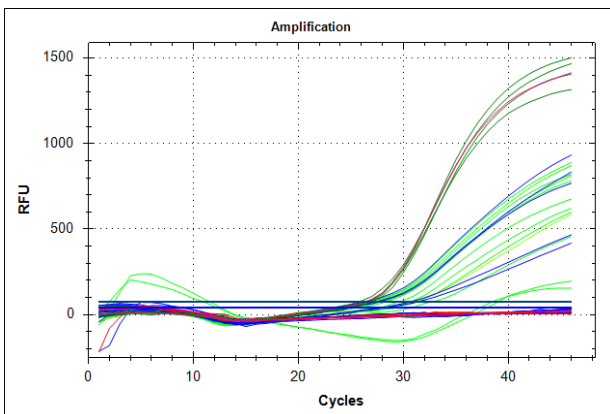


Abbildung 6b I

Abbildung 6b II

Erstellen Sie einen Bericht ("Tools → Reports"). Select/Deselect nützliche Informationen

ACHTUNG

- Fehlt das zu erwartenden JOE Signals, ist es ratsam den Test zu wiederholen.
- CP hat keine interne Kontrolle, daher ist das JOE Signal nicht zu erwarten.
- Wenn es zu Kontaminationen kommt, ist es wichtig die Quelle ausfindig zu machen (Extraktion und/oder RT-PCR Schritte). Gelieferte Kontrollen können sehr nützlich sein, um die Testperformance zu sichern und die Fehlerquellen aufzudecken.

LEISTUNGSMERKMALE

Spezifität

Die Spezifität des HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST wurde durch die Analyse von 501 HCV negativen Plasma Proben von Blutspendern ermittelt. Keine falschpositiven Ergebnisse wurden erhalten. Bezüglich der Ergebnisse beträgt die Spezifität des Tests 100%.

Analytische Sensitivität

Die Sensitivität wurde durch die Analyse von Verdünnungsstufen einer HCV positiven klinischen Probe bestimmt. Kalibriert mit dem HCV WHO 3rd International Standard (NIBSC code 06/100). Für die Verdünnungen wurde ein Plasma (negative für HCV RNA und Antikörper) verwendet. Die Analyse wurde gemäß den Anleitungen durchgeführt, RNA Extraktion einzogen. In der unten aufgeführten Tabelle ist zu sehen, dass das Detektionslimit von HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST **18 IU/ml** ist (Probit analysis at 95%).

Verdünnungen	N tot. runs	N tot. positives	% positives
A (100 IU/ml)	24	24	100%
B (50 IU/ml)	24	24	100%
C (25 IU/ml)	24	23	96%
D (12,5 IU/ml)	24	22	92%

*Probit Analysis done with *Statplus 2009* software.

Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität wurde mit Hilfe der Analyse von 10 HCV Serokonversionspaneln bewertet, getestet mit Roche Cobas TaqMan HCV Test als Referenz. Alle Proben erbrachten die zu erwartenden Ergebnisse.

HCV Genotypen

Die Leistungen des HCV RNA REAL TIME QUANTITATIVE 2.0 TEST bezüglich verschiedener HCV Genotypen wurde durch die Analyse von vier Verdünnungsstufen verschiedener HCV klinisch positiver Proben ermittelt (unten aufgelistet). Die Viruslast der verwendeten Proben wurde durch den Vergleich des Signals der original Proben mit dem Signal der HCV WHO 3rd International Standard (NIBSC cod. 06/100) ermittelt.

Getestete Genotypen: 1a, 1b, 2a, 2b, 2a/2c, 3a, 4c/4d, 5 und 6 (ermittelt mit NLM GEN C cod. AC004 und Sequenzierung).

Analysierte Verdünnungen:

- Gen 1a:** von $1,5 \times 10^2$ bis $2,8 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 1b:** von $1,1 \times 10^2$ bis $4,3 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 2:** von $9,8 \times 10^1$ bis $2,7 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 3:** von $1,5 \times 10^2$ bis $2,8 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 4:** von $4,5 \times 10^2$ bis $1,8 \times 10^6$ IU/ml
- Gen 5:** 3×10^2
- Gen 6:** 7×10^2

Wie in der unteren Grafik gezeigt (Abbildung 7) ist die Detektion von HCV RNA für die verschiedenen analysierten Genotypen vergleichbar. Jede getestete Probe gab, wie erwartet, ein positives Ergebnis, daher ist die Detektionseffizienz des HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST unabhängig vom Genotyp.

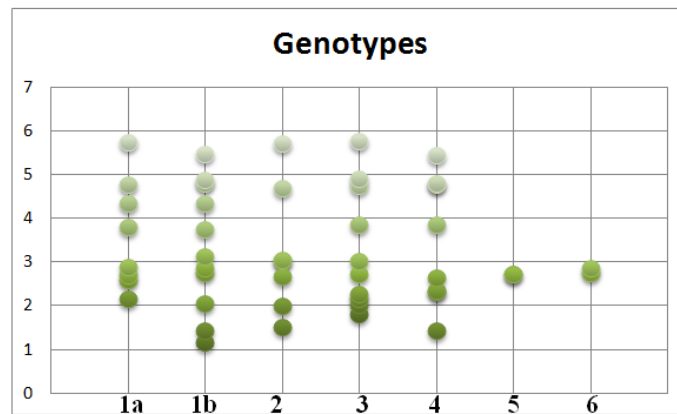


Abb. 7 Durch Verwendung von NLM GEN-C cod. AC004 wurden die Genotypen der Proben bestimmt

Potentielle Kreuzreaktive Marker

Um die potentielle Kreuzreaktivität des HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST mit anderen Pathogenen zu bewerten, wurden die folgenden Proben infizierter Patienten analysiert:

Andere Pathogene	Nummer getesteter Proben
HGV	2
HCMV	2
HIV	2
HBV	2
HPV	2
Herpes simplex Virus	2
Chlamydia trachomatis	2

Jede nicht-HCV Probe ergab ein negatives Testergebnis. Der HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST zeigte daher keine Kreuzreaktivität mit anderen Pathogenen.

Potentielle Interferenz mit anderen Substanzen

Keine Daten vorhanden.

Die Gesamtsystemausfallrate führt zu falschnegativen Ergebnissen

Um die Die Gesamtsystemausfallrate, die zu falschnegativen Ergebnissen führt zu bewerten, wurden 100 HCV plasmapositive Proben analysiert (3 x 95% positive Obergrenzenkonzentration ~ 50 IU/ml); In jedem Lauf wurde eine negative Kontrolle hinzugegeben.

Das Startplasma wurde durch die Verdünnung einer positiven klinischen Probe in humanem negativem Plasma erhalten, das mit dem HCV WHO 3rd International Standard (NIBSC cod. 06/100) kalibriert wurde. Alle HCV positiv getesteten Proben ergaben ein positives Ergebnis, daher führt der HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 TEST nicht zu falsch-negativen Resultaten.

⇒ Cross-Kontaminationsfrei

Der Wechsel von hochviralen mit negativen Proben in mindestens 4 Läufen hat eine Cross-Kontaminationsfrei zwischen Proben während des gesamten Arbeitsflusses. Die Extraktion wurde sowohl manuell als auch automatisch durchgeführt.

Alle getesteten negativen Proben haben das erwartete negative Ergebnis gezeigt. Der HCV RNA REAL TIME QUALITATIVE 2.0 hat keinerlei cross-Kontamination zwischen den Proben hervorgehoben.

Vergleich mit ABBOTT REAL TIME HCV (Abbott)

Die Leistung des REAL TIME HCV QUALITATIVE TEST wurde mit ABBOTT REAL TIME HCV (Abbott) durch die Analyse von 102 HCV positiven und negative klinischen Proben verglichen. Alle positiven Proben ergaben ein positives Resultat und die vier negativen Proben ergaben ein negatives Resultat. Die Ergebnisse zeigen eine gute Korrelation zwischen den beiden Assays (Abbildung 8).

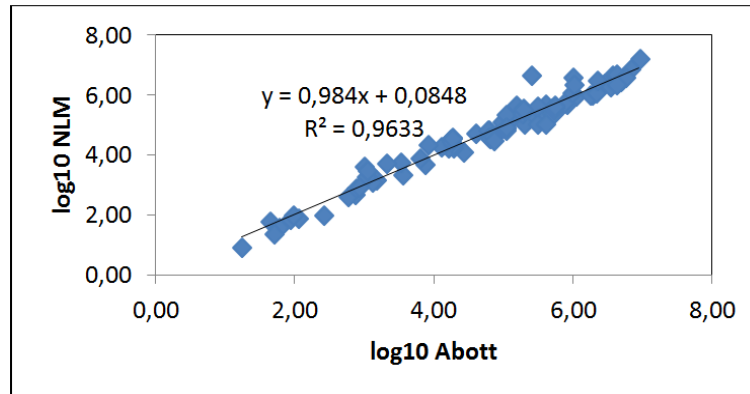


Abbildung 8

