

HBV DNA

QUANTITATION (QT)

Quantitative Real -Time PCR for detection of HBV genome

- for “in vitro diagnostic” use only -



DIA.PRO

Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milano) - Italy

Phone +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF. HBVDNAQT.CE
25/50/100/150 Tests

HBV DNA

A. INTENDED USE

The **HBV DNA Quantitation** Real-Time PCR kit coded **HBVDNAQT.CE** is intended for quantitative detection of Hepatitis B Virus DNA in human plasma with a simultaneous control of the amplification reaction through an **Internal Control (IC)**. The kit is intended for use in conjunction with clinical observation and laboratory markers as an indicator of disease prognosis and for use as an aid in assessing viral response to antiviral treatment.

The kit has been adapted for the use on the Real-Time Thermocyclers ABI 7500 Sequence Detection System® (Applied Biosystems™*) software SDS 1.3.1 or MX3000P® software MxPro 4.01(Stratagene™***).

* Applied Biosystems is a registered trademark and ABI PRISM® is a trademark of Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries.

***Stratagene is a registered trademark.

B. INTRODUCTION

The hepatitis B virus is a virus belonging to the Hepadnavirus family. Its genome is a small circular, incomplete ds DNA that became a complete and super-coiled genome (cccDNA) when the virus get into the host hepatocytes. Recently eight genotypes are been identified (A through H). The virus has a high speed replicative and high frequency of mutation. This mutations lead to accumulation in each infected individual of multiple genetic variant called quasiespecies. Growing evidence shows that the natural history and treatment response may differ depending on the infecting HBV genotype. However the real correlation between genotype and outcome of disease are not completely understood. Hepatitis B virus infection is a global public health problem concerning 350 million people worldwide. It can evolve to chronicity (CHB) and can be the cause of liver disease or hepatocellular carcinoma (HCC). At the present time some observation showed that the severity of liver injury during the infection, is modulated by the strength of host immune response. According on what it is possible to recognize two type of infection: acute and chronic.

In acute HBV infection hepatitis B *surface* antigen (HBsAg), *core* IgM antigen (HBcIgM), *e* antigen (HBeAg) are detectable in serum but ALT do not increase until the infection is well established. Levels of HBV DNA are generally very high ranging from 200 million UI/ml to 200 billion UI/ml.

Chronic HBV infection may present 5 phases:1) Immune tolerance (high levels of HBeAg, HBsAg and HBV DNA-high rate of viral replication); 2) Immune reactive (HBeAg/HBsAg positive, high or low levels HBV DNA in relation of perinatally or adulthood infection, ALT fluctuating); 3) Inactive carrier state (seroconversion HBeAg vs HBeAb, HBsAg positive, normal ALT, very low or undetectable HBV DNA <3log); 4) HBeAg-negative Chronic Hepatitis (HBeAg negative/HBeAb positive or reversion to HBeAg positive, fluctuating levels of HBV DNA, increased or fluctuating ALT. The lack of HBeAg in some patients, in this phase, is related to a mutation in HBV genome;5) past infection (HBsAb positive, HBsAg negative, normal ALT, negative or very low levels of HBV DNA <2.3log).

The diagnosis and clinical monitoring of HBV infection is based on the detection of immunological, serological markers and circulating viral genome (HBV DNA), as indicated above. Serum or plasma HBV DNA levels reflecting viral replication and potential infectivity, so that quantification for HBV viral load is important in the evaluation and management of patients with chronic HBV infection. The new EASL guidelines recommend HBV viral load to determine which chronic patients should be treated and what therapy to apply (interferon or NUC-nucleoside analogue). The main goal of all therapies is the reduction of HBV DNA below the 2.3log in such a way that the progression to liver cirrhosis or HCC is countered.

C. PRINCIPLE OF THE TEST

The HBVDNAQT.CE Kit uses the Real Time PCR technology to detected and quantify HBV DNA in the clinical plasma samples.

The specificity of the assay is first ensured by the selection of specific primers and probes as well as the selection of stringent reaction conditions.

HBV DNA, recovered from the plasma sample is extracted and amplified together with the unrelated sequence (**IC**) introduced into the each specimen at the beginning of sample preparation. This IC serves to demonstrate that the whole process proceeds properly for each one.

The amplified product is detected and quantified, against the standard curve, using a fluorescent reporter dye probe specific for HBV sequence. The construction of standard curve allow the determination of the viral load.

The assay is standardized against the World Health organization (WHO) 2nd International Standard for Hepatitis B virus (NIBSC Code 97/750). Results are reported in Units per millilitre (UI/ml) or copies/ml.

This assay is not intended for use as a screening test for HBV or as a diagnostic test to confirm the presence of HBV infection.

D. COMPONENTS

The standard format of the product code HBVDNAQT.CE contains reagents for 50 tests.

Component	Labelling and Contents	HBVDNAQT.CE 50 Reactions
A CODED: ALL/MM Colour code : blue	Master mix	N° 2 / 0.40 ml
B CODED: HBV/CB Colour code : yellow	Lyophilised Primers/Probes	N° 2 (Dissolve with the ALL/C indicated on the vial label)
C CODED: ALL/C Colour code : red	MG Water	N° 3 vials/1.5 ml
NTC CODED: ALL/NTC Colour code : white	Negative control	N° 1 vials /1.5 ml
STD CODED: HBV/STD Colour code : red	Lyophilised Standard Curve Calibrator (2.0E+05 UI/μl)	N° 4 (Dissolve with the ALL/C indicated on the vial label)
I.C. CODED: ALL/IC Colour code: green	Lyophilized Internal Control	N° 2 (Dissolve with the ALL/C indicated on the vial label)
Package Insert	Instruction for Use	N° 1

Important note: Upon request, Dia.Pro can supply reagents for 25, 100, 150 tests, as reported below :

Component A	n°1 vial/0.4 ml	n°4 vials/0.4 ml	n°6 vials/0.4 ml
Component B	n°1 vial	n°4 vials	n°6 vials
Component C	n°2 vial/1.5 ml	n°3 vials/1.5 ml	n°5vials/1.5 ml
NTC	n°1 vial/1.5ml	n°1 vials/1.5ml	n°1 vials/1.5ml
IC	n°1 vial	n°4 vials	n°6 vials
STD	n°2 vial	n°4 vials	n°6 vials
Pack. insert	n° 1	n° 1	n° 1
Number of tests	25	100	150
Code	HBVDNAQT.CE.25	HBVDNAQT.CE.100	HBVDNAQT.CE.150

E. STORAGE STABILITY

The kit code HBVDNAQT.CE must be stored at +2.....+8°C.

Once dissolve Component B (coded HBV/CB) and Component I.C. (coded ALL/IC) are stable for 30 days at -20°C. Instead Component STD (Coded HBV/STD) is stable for 15 days at -20°C. Thaw only one time components dissolved.

F. MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated Micropipettes (0,5 µl <volume<1000 µl)
2. DNA extraction kit
3. MG EtOH
4. Thermal Block
5. Thermo-Shaker
6. Microcentrifuge
7. Tube and racks for 2 ml and 1.5 ml of volume
8. Sterile filtered tips with aerosol barrier
9. 0,2 ml Microtubes recommended from the Real-Time PCR instruments manufacturers
10. Disposable gloves, powder-free
11. Real-Time PCR Thermalcycler (*)
12. Absorbent paper tissues.
13. Vortex or similar mixing tools.

(*) **Attention:** A valid calibration of the pure dyes (Pure Spectra Component File) and of the background (Background Component File) is necessary when putting the instruments into operation.

G. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. The kit has to be used by skilled and properly trained technical personnel only, under the supervision of a medical doctor responsible of the laboratory.
2. The technical personnel must be deeply trained in the use of Real-Time thermalcyclers, in the manipulation of Molecular Biology reagents and skilled in the Real-Time PCR amplification protocols.
3. The kit has to be used in a laboratory certified and qualified by the national authority in that field (Ministry of Health or similar entity) to carry out this type of analysis.
4. All the personnel involved in performing the assay have to wear protective laboratory clothes, talc-free gloves and glasses. The use of any sharp (needles) or cutting (blades) devices should be avoided. All the personnel involved should be trained in biosafety procedures, as recommended by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. and reported in the National Institute of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. All the personnel involved in sample handling should be vaccinated for HBV and HAV, for which vaccines are available, safe and effective.
6. The laboratory environment should be controlled so as to avoid contaminants such as dust or air-born microbial agents, when opening kit vials and the Components and when performing the test.
7. Component A and B are light sensitive. Protect them from strong light exposition
8. Pay **special attention** during the dissolution of the tubes lyophilized observing that the powder present on the walls of the tube, in the case in which the centrifugation was not sufficient, is included in the volume of the water used for dissolution
9. Incorrect dissolution of the lyophilized tube could compromise the result.
10. Avoid vibration of the bench surface where the test is undertaken
11. Upon receipt, store the kit at 2..8°C into a temperature controlled refrigerator or cold room.
12. Do not interchange components between different lots of the kits. It is recommended that components between two kits of the same lot should not be interchanged.
13. Check that the reagents are clear and do not contain visible heavy particles or aggregates. If not, advise the laboratory supervisor to initiate the necessary procedures for kit replacement.
14. The extraction step is very important to obtain the correct result. Carefully follow the instruction recommended in the user guide
15. During the extraction some steps are crucial. A key step in the purification procedure is the centrifugation. It is important to obtain the pellet and the supernatant should be clear. The next complete resuspension of the pellet is vital to ensure the maximum nucleic acid recovery.
16. Incorrect centrifugation speed can cause the formation of the pellet which will be difficult to resuspend. The incorrect dissolution of the pellet can cause a mistake in the quantification. In this case refer to "optimization of centrifugation" indicated in the user manual.
17. Caution should be taken to avoid cross-contamination between samples by using disposable tips and changing them after each sample.
18. Prevent cross-contamination between kit reagents by using disposable tips and changing them every-time.
19. Do not use the kit after the expiration date stated on the external container and internal (vials) labels.
20. Treat all specimens as potentially infective. All human plasma specimens should be handled at Biosafety Level 2, as recommended

- by the Center for Disease Control, Atlanta, U.S. in compliance with what reported in the Institutes of Health's publication: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
21. Store and extract positive materials (specimens, controls and amplicons) separately from the other reagents and use a separate room for their handling
 22. Dissolve the lyophilised reagents with the correct amount, stated in the labels, of Molecular Grade water (component C coded:ALL/C) supplied in the kit
 23. Carry on all the working operations as quickly as possible
 24. Workflow in the laboratory must proceed in an unidirectional way, beginning in the Extraction Area and moving to the Amplification and Data Analysis Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area where previous steps have been performed.
 25. The use of disposable plastic-ware is recommended in the preparation of the liquid components or in transferring components into automated workstations, in order to avoid cross contamination.
 26. Waste produced during the use of the kit have to be discarded in compliance with national directives and laws concerning laboratory waste of chemical and biological substances. In particular, liquid waste generated from the washing procedure, from residuals of controls and from samples has to be treated as potentially infective material and inactivated before . Do not put in contact the extraction waste with blench.
 27. Accidental spills from samples and operations have to be adsorbed with paper tissues soaked with household bleach and then with water. Tissues should then be discarded in proper containers designated for laboratory/hospital waste.
 28. Other waste materials generated from the use of the kit (example: tips used for samples) should be handled as potentially infective and disposed according to national directives and laws concerning laboratory wastes.
 29. Monitoring the laboratory for the presence of amplification product. It is recommended to monitor laboratory surface and equipment for contamination.

H. SPECIMEN: PREPARATION AND RECOMMENDATIONS

1. Blood is drawn aseptically by venepuncture and plasma is prepared using standard techniques of preparation of samples for clinical laboratory analysis.
 2. The whole peripheral blood samples for DNA extraction must be collected in EDTA according to laboratory procedure, transported and stored at +2/+8°C for a maximum period of 3 days. Do not freeze the whole peripheral blood samples to avoid cell lysis and loss.viral load.
 3. No influence has been observed in the preparation of the sample with citrate, EDTA.
- Attention: Heparin (≥10 IU/ml) affects the PCR reactions. Samples, which has been collected in tubes containing heparin as an anticoagulant should not be used. Also, samples of heparinised patients must not be used.
4. Avoid any addition of preservatives to samples.
 5. Samples have to be clearly identified with codes or names in order to avoid misinterpretation of results.
 6. Haemolysed (red) and visibly hyperlipemic ("milky") samples have to be discarded as they could generate false results. Samples containing residues of fibrin or heavy particles or microbial filaments and bodies should be discarded as they could give rise to false results.
 7. Plasma samples with high amount of lipid can cause little or no recovery of nucleic acid. In this case the pellet will be small or not present at all. Take a fresh sample and follow the troubleshooting guide present in the user manual.
 8. Plasma, if not used immediately, must be aliquoted and stored at -20°..-80°C after collection. Samples can be stored frozen at 20°..-80°C for several months. Any frozen samples should not be frozen/thawed more than once as this may affect the test result.
 9. The plasma samples for DNA extraction must be collected according to the common laboratory procedures, transported and stored at +2/+8°C for a maximum period of 4 hours. The plasma samples can be stored frozen at -20°C for a maximum period of 30 days or -70°C for long periods Avoid repeated freezing/thawing cycles
 10. We recommend you, for optimal storage samples, to split them in several aliquots (minimum volume 500 µl, what is necessary for a single session of extraction) and store them frozen at -20°C for a maximum period of 30 days or -70°C for long periods.
 11. **Remember that there is a pre-analytical treatment of the plasma sample. All samples must be diluted 1:2 in Phosphate Buffer Solution (500 µl sample + 500 µl PBS) before extraction.**
 12. The lack of the step indicated above causes an error of quantification.

13. When using frozen samples, thaw the samples just immediately before the extraction in order to avoid possible causes of nucleic acid degradation.

I. PREPARATION OF COMPONENTS AND WARNINGS

Master Mix:

Component A. Ready to use. Mix well on vortex before use.

WARNING: Component A is light sensitive. Protect it from strong light exposition

Primers/Probes:

Component B.

- Centrifuge the vial for 1 min at 12000 rpm
- Open carefully the vial cap avoiding powder dispersion
- Dissolve homogenously the Lyophilized Component B with the volume of water (Component C coded: ALL/C) indicated on the vial label.
- Keep it dissolve on the benchtop for at least 15 min at room temperature (15°C<RT<25°C)
- Briefly vortex it avoiding the formation of foam

WARNING: Component B is light sensitive. Protect it from strong light exposition

MG Water:

Component C. ready to use

NTC or Negative Control :

ALL/NTC. Ready to use.

Standard Curve:

Component STD.

- Centrifuge the vial for 1 min at 12000 rpm
- Open carefully the vial cap avoiding powder dispersion
- Dissolve homogenously the Lyophilized Component HBV/ STD with the correct volume of water (Component C coded: ALL/C) as indicated on the vial label.
- Keep it dissolve on the benchtop for at least 15 min at room temperature (15°C<RT<25°C)
- Briefly vortex it avoiding the formation of foam
- Prepare 5 Nuclease Free tubes for the preparation of the Standard Curve
- Set up a 1:10 serial dilution in **Component C** (MG water) to obtain the standard curve as table below:

Standard curve preparation		
STD	Calibrator 200000 (UI/μl)	Volume of Component C (MG water) as written on the vial label
STD 1	20000 (UI/μl)	10 μl (STD) + 90 μl Component C (MG water)
STD 2	2000 (UI/μl)	10 μl (STD) + 90 μl Component C (MG water)
STD 3	200 (UI/μl)	10 μl (STD) + 90 μl Component C (MG water)
STD 4	20 (UI/μl)	10 μl (STD) + 90 μl Component C (MG water)
STD 5	2 UI/μl	10 μl (STD) + 90 μl Component C (MG water)

Internal Control:

Component I.C.

- Centrifuge the vial for 1 min at 12000 rpm
- Open carefully the vial cap avoiding powder dispersion
- Dissolve homogenously the Lyophilized Component IC with the volume of water (Component C coded: ALL/C) indicated on the vial label .
- Keep it dissolve on the benchtop for at least 15 min at room temperature (15°C<RT<25°C)
- Briefly vortex it avoiding the formation of foam

L. INSTRUMENTS AND TOOLS USED IN COMBINATION WITH THE KIT

1. **Micropipettes:** have to be calibrated to deliver the correct volume required by the assay and must be submitted to regular decontamination (household alcohol, 10% solution of bleach, hospital grade disinfectants) of those parts that could accidentally come in contact with the sample. They should also be regularly maintained in order to show a precision of 1% and a trueness of +/- 5%. Decontamination of spills or residues of kit components should also be carried out regularly.
2. **Extraction Device:** The HBVDNAQT.CE Kit is intended for the use in combination with QIAamp UltraSense virus Code.53706 (QIAGEN). The end users must strictly follow the Instruction for use supplied by the manufacturer.
3. **Real-Time Thermalcyclers:** The HBVNAQT.CE Kit is intended for the use in combination only with the Real Time Thermal cyclers ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) software SDS version 1.3.1, MX3000P® software MxPro version 4.01 (Stratagene™). The end users must strictly follow the Instruments Instruction for use supplied by the manufacturers.

M. PRE ASSAY CONTROLS AND OPERATIONS

1. Check the expiration date of the kit printed on the external label of the kit box. Do not use if expired.
2. Check that the liquid components are not contaminated by naked-eye visible particles or aggregates. Check that the vials of the Lyophilized components is present a well formed aggregate. Check that no breakage occurred in transportation and no spillage of liquid is present inside the box.
3. Dissolve Lyophilized Components with the appropriate amount of Component C (Molecular Grade water) as written on the vial label.
4. Turn the Thermalcycler on, check settings and be sure to use the right assay protocol.
5. Follow strictly the Instruments Manuals supplied by the manufacturers for the correct setting of the Real-Time Thermalcyclers.
6. Check that the micropipettes are set to the required volume.
7. Check that all the other equipment is available and ready to use.
8. In case of problems, do not proceed further with the test and advise the supervisor.

N. ASSAY PROCEDURE

The assay has to be carried out according to what reported here below.

N.1 Viral DNA extraction

The extraction step of the HBV genomic DNA has to be carried out exclusively in combination with the following kit:

Material	Description	Kit code	manufacturer
Plasma	QIAamp UltraSense virus®	53706	Qiagen™

1. Before you begin, setting up as many tubes as there are samples to be extracted
2. Add 500 μl of sterile Phosphate Buffer Solution (PBS) in each tube
3. Add 500 μl of the sample. So that the total volume is 1 ml
4. Add 10 μl of ALL/IC. The IC is added in this step to evaluate if the DNA extraction is performed properly.
5. Proceed with the extraction as indicated in the user guide.
6. The elution volume recommended is 70 μl
7. The DNA isolation must be carried out according to the Manufacturer's instructions and all of our advice.(see Section H)

In the table below we summarize the pre-analytical process

Pre-analytical process				
Sample code	PBS volume	Sample volume	ALL/IC volume	Total volume
Assigned defined code	500 µl	500 µl	10 µl	1010 µl

The DNA extracted from the sample and not used in the run has to be stored frozen (-20°C...-80°C).

N.2 Setting up of the reaction

HBVDNAQT.CE kit is intended to be used exclusively in combination with ABI PRISM 7500 standard (Applied Biosystem) software SDS version 1.3.1, MX3000P® software MxPro version 4.01 (Stratagene™).

N.2.1 Preparing the PCR

Important: An example of dispensation scheme is reported in Section O. Please, refer to it before starting to read the instructions here below.

- Prepare the components as described in Section I;
- Prepare the required number of reaction tubes or a 96-well reaction plate for the samples under evaluation and for the Standard curve (prepared as described in section I).

Important note: Use only optical tubes or microplates suggested by the Real-Time thermocyclers manufacturers.

- Consider that the samples, if possible, should be tested in duplicate or triplicate;
- Include at least 1 tube for the NTC (negative control)
- Prepare the **Amplification Mix** for **Samples, NTC and standard curve** as indicated below:

Tab 1-Internal Control (IC) as Amplification control

Preparation of the Amplification Mix

Number of Reactions		1 rxn	10 rxn
A	Master mix	12,5 µl	125 µl
B	Primers/probes	2 µl	20 µl
I.C.	Internal Control	0,5 µl	5 µl
Tot vol.		15 µl	150 µl

Tab 2-.Internal Control (IC) as Extraction and Amplification control

Preparation of the Amplification Mix

Number of Reactions		1 rxn	10 rxn
A	Master mix	12,5 µl	125 µl
B	Primers/probes	2 µl	20 µl
ALL/C	MG water	0,5 µl	5 µl
Tot vol.		15 µl	150 µl

In this case (Tab 2) the internal control (IC) is included yet in the sample before extracting.

N.2.2 Amplification procedure

- dispense 15 µl of the amplification mix in each reaction tube or microplate well
- add 10 µl of the **Samples, NTC and Standard curve** to the reaction tubes
- centrifuge briefly reaction tubes at 2000 rpm
- don't leave reaction tubes at room temperature (RT) for more than 30 min and at light exposure
- cover strictly the tubes
- load the tubes in the Real-Time Thermocycler Thermoblock Holder
- after the setting operation described in the section N3 (Instrument Programming) start the Thermocycler run.

Important note: Component Lyophilized after dissolution in component C (MG water) are stable no more the 3 hours at 2°C...8°C.

At the end of the working day discard adequately the material leftover of the STD Dilution Points.

The not used volume of Component B, STD and IC can be split in aliquots and kept frozen at -20°C. The aliquots must be thaw only one time and must be used as indicated in Section E.

N.3 Instrument programming

Programming tools, refers to instruction manuals (Absolute Quantitation Guidelines) provided by the manufacturers

Important note: For Mx3000P (Stratagene) pay attention to set "filter set gain" as indicated below;

ROX =x1;FAM=x8;JOE=x1

N.3.1 Thermal Profile

The thermal profile is reported in the table below:

Step	Cycle	Temp.	Time
1	1	50°C	2 min
1	1	95°C	15 min
2	45	95°C	15 sec
		60°C(*)	1 min

IMPORTANT NOTE :(*) step for the real time data collection

Warning: keep attention to set up the Real-Time Thermocycler with correct Thermal Profile following the instruments manual supplied by the manufacturer

N.3.2 Selection of the Detectors

Following the Instruction manuals of the Real-Time thermo cyclers suggested (ABI 7500, and MX3000P®) select the Detectors reported in the table here below:

Detection	Reporter	Quencher
HBV	FAM	Non Present
Internal Control (I.C.)	JOE	Non Present
Passive Reference	ROX	Non Present

O. ASSAY SCHEME

An example of dispensation scheme for Quantitative Analysis is reported below:

		Microplate/Tubes				
		1	2	3	.	.
A	STD 1					
B	STD 2					
C	STD 3					
D	STD 4					
E	STD 5					
F	NTC					
G	Sample 1					
H	Sample 2					

Legenda: NTC = Negative Control STD 1,2,3,4,5 = HBV DNA Standard Curve, Sample 1,2, = Samples under evaluation.

P. INTERNAL QUALITY CONTROL

P.1 Pre- Analysis setting

Before starting the interpretation of the data:

- Set the "Baseline" (the background fluorescence level) as reported in the table below:

"Baseline"	
ABI™ PRISM 7500SDS	Manual Baseline: Start cyler=3 End cyler=10
MX3000P® (Stratagene™)	Adaptive baseline Important note: <u>Do not use</u> <u>Mx4000 v1.00 to v3.00 algorithm</u>

- Set manually the FAM/JOE fluorescence "Threshold"

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

P.2 Data Analysis

A check is carried out on the STD 1 calibrator any time the kit is used in order to verify whether its Ct value is as expected and reported in the table below.

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

Moreover the Slope and R² values are checked in order to verify the quality of the run. The following requirements must be fulfilled.

Check FAM	Requirements
Slope	-3.1 < Slope < -3.9

Check FAM	Requirements
Efficiency	R ² > 0.98

Q. INTERPRETATION OF RESULTS AND TROUBLESHOOTING

For each samples FAM fluorescence (positive/negative Ct value) and Internal Control JOE fluorescence are assumed to validate HBV detection as described in the table below:

HBV FAM	Internal control JOE	Assay result
SAMPLE POSITIVE	+	CORRECT
	-	CORRECT**
SAMPLE NEGATIVE	Ct<42	CORRECT
	Ct>42 or undetermined	INVALID***

IMPORTANT NOTE:

(**) High initial concentration of HBV DNA in the sample (positive FAM) can lead to REDUCE or ABSENT Fluorescence Signal of Internal Control IC due to the reagent competition

(***) In this case problems have occurred during the amplification step (inefficient or absent amplification) or during the extraction step (presence of inhibitors) which may lead to incorrect result and false negatives. So that it is necessary to repeat the extraction with a new fresh sample.

For each positive sample undergone to the extraction and detected by kit code HBVDNAQT.CE a correct Quantification of the HBV viral load can be applied as reported in the table below:

ABI™ PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P®	
Sample HBV run data (UI/ml)	HBV viral load (UI/ml)
Quantity > 2.0E+07	HBV viral load >2.0E+07
5.0E+01 ≤ Quantity ≤ 2.0E+07	QUANTITATION
Quantity < 5.0E+01	HBV viral load < 5.0E+01

IMPORTANT NOTE: For samples quantification refer to [section R](#)

The result obtained with this product must be interpreted with consideration of clinical presentation and other laboratory markers inherent to the patient.

The following results are possible:

Troubleshooting table

	FAM	JOE	Result	CHECK
SAMPLE unknown	+	+/-	CORRECT RESULT <u>Positive</u>	IMPORTANT: High Initial concentration of HBV DNA (Positive FAM Signal) can lead to REDUCED or ABSENT Fluorescent Signal of Internal Control I.C. due to the reagents competition.
SAMPLE unknown	-	-	ATTENTION ! POSSIBILITY OF: Inhibition, error in the procedure or no functioning of the Instruments	1. that components have been prepared correctly 2. that no mistake has been done in the assay procedure; 3. That the selected detection dyes are corrected FAM for the HBV detection and JOE for the I.C. detection; 4. that the analysis has been run with the correct Instrument settings; 5. that the kit has been stored correctly; 6. that no potential PCR inhibitor have been contaminated the tube 7. that the extraction procedures have been executed correctly as indicated Section N
SAMPLE unknown	-	+	CORRECT RESULT <u>Negative</u>	
STD	+	+/-	CORRECT RESULT	IMPORTANT: High Initial concentration of HBV DNA (Positive FAM Signal) can lead to REDUCED or ABSENT Fluorescent Signal of Internal Control I.C. due to the reagents competition.

STD	-	-	<p style="text-align: center;">ATTENTION !</p> <p>POSSIBILITY OF: Error in the pipetting or in the procedure</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. that components have been prepared correctly 2. that no mistake has been done in the assay procedure; 3. that the selected detection dyes are corrected FAM for the HBV detection and JOE for the I.C. detection; 4. that the analysis has been run with the correct Instrument settings; 5. that the kit has been stored correctly; 6. that no potential PCR inhibitor have been contaminated the tube.
STD	-	+	<p style="text-align: center;">ATTENTION !</p> <p>POSSIBILITY OF: Error in the pipetting or in the procedure</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. that components have been prepared correctly 2. that no mistake has been done in the assay procedure; 3. that the selected detection dyes are corrected FAM for the HBV detection and JOE for the I.C. detection; 4. that the analysis has been run with the correct Instrument settings; 5. that the kit has been stored correctly.
NTC	-	+	CORRECT RESULT	
NTC	+	+	<p style="text-align: center;">ATTENTION !</p> <p>POSSIBILITY OF: Contamination</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. that components have been prepared correctly 2. that no mistake has been done in the assay procedure; 3. That the work space and Instruments are decontaminated at regular intervals; 4.that the kit has been stored correctly;
NTC	+	-	<p style="text-align: center;">ATTENTION !</p> <p>POSSIBILITY OF: Contamination</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. that components have been prepared correctly 2. that no mistake has been done in the assay procedure; 3. that the work space and Instruments are decontaminated at regular intervals; 4.;that the kit has been stored correctly;

R. QUANTITATION

The STD calibrators are treated as purified samples and the same volume is used 10 µl.

To generate a standard curve, all five standard calibrators should be used and defined as standard with a specific concentration.

All STD calibrators are defined as UI/µl.

The following equation has to be apply to calculate the **initial concentration** of the samples undergone to the assay:

$$\text{Result (UI/ml)} = \frac{\text{Result obtained (UI/}\mu\text{l)} \times \text{Elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

Important note:

**as indicated in the Sections H and N the initial sample volume is 0.5 ml.*

****Samples quantification can be reported both in UI/ml and copies/ml. The conversion factor is 2.5 (1UI/ml=2.5 copies/ml).**

Example:

Sample volume used to the extraction= 0.5 ml

Result obtained (UI/µl)= 20

Elution volume=70 µl

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

Result (UI/ml)= 2800

Result (copies/ml) = Result (UI/ml) x 2.5 = 2800 x 2.5 = 7000

Important notes:

1. *Interpretation of results should be done under the supervision of the responsible of the laboratory to reduce the risk of judgment errors and misinterpretations.*
2. *When test results are transmitted from the laboratory to an informatics centre, attention has to be done to avoid erroneous data transfer.*

S. PERFORMANCES

Evaluation of Performances has been conducted in accordance to what reported in the Common Technical Specifications or CTS (art. 5, Chapter 3 of IVD Directive 98/79/EC).

The performance evaluation was carried out in DiaPro's laboratories on materials supplied by the Fondazione Irccs Cà Granda-Ospedale Ospedale Maggiore Policlinico Milano Italy.

S.1 ANALYTICAL SENSITIVITY

Analytical sensitivity of a quantitative molecular method refers to the smallest amount of the target marker that can be properly detected.

In the context of the CTS it may be expressed as: **limit of detection** or **limit of quantification**:

Limit of detection (LOD): it is the lowest **concentration** of the target that can be detected with a 95% of probability.

In the kit code HBVDNAQT.CE the **LOD** it was determined by testing serial dilution of standard curve at limiting concentration which were prepared in HBV negative plasma.

Each dilution was extracted and amplified. A total of 24 replicates, for each one, were tested in three different runs. The results were analyzed by PriProbit program ver 1.63 to obtaining the HBV DNA concentration detected with a 95% of probability. As the HBVDNAQT.CE can be used in combination with different instruments, we define the LOD for each one. Data are reported below:

Detection Limit (LOD)	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	10 UI/ml
(Stratagene™) MX3000P®	30 UI/ml

If the results of the test match the CORRECT RESULT requirements stated above, proceed to the next section.

If one or more of the problems described in the table above happens, after checking, report any residual problem to the supervisor for further actions.

S.1.1 Dynamic Range and Linearity

Limit of quantification is determined by **Linearity** or **Dynamic range**. **Linearity** is the measure of the degree to which a standard curve approximate a straight line and it is represent by a **Slope** value.

Dynamic range is the span of standard points concentrations for which the final output value (Ct threshold cycle) of system is directly proportional to the concentration for each one.

The boundaries of the measuring range are the lower and upper limits of quantification (**Limit of quantification**)

In the kit code HBVDNAQT.CE the linearity (analytical measurement) was determined by testing in three replicate different concentrations of standard curve ranging from 2.0E+08 UI/μl to 6.24E-0.2 UI/μl. The dilution series has been calibrated against the 2nd WHO International Standard for hepatitis B virus (code:97/750). Date for each instrument are reported in the table 1:

Tab 1

Limit of quantification (analytical measurement)		
instrument	upper	lower
ABI™ PRISM® 7500 SDS	2.0+08 UI/ μl	2.5E-0.1 UI/ μl
(Stratagene™) MX3000P®	2.0+08 UI/ μl	2.5E-0.1 UI/ μl

In addition the upper and lower limit of quantification were determined in consideration of the purification step using QIAamp Ultrasense virus Kit. At first were prepared serial dilution points of standard curve in a pool of negative plasma sample ranging from 2.0E+07 UI/ml to 5.0E+01 UI/ml, each dilution was analyzed with two lots. Secondly we analyzed HBV DNA Quantification panel (Acrometrix) in the same way.

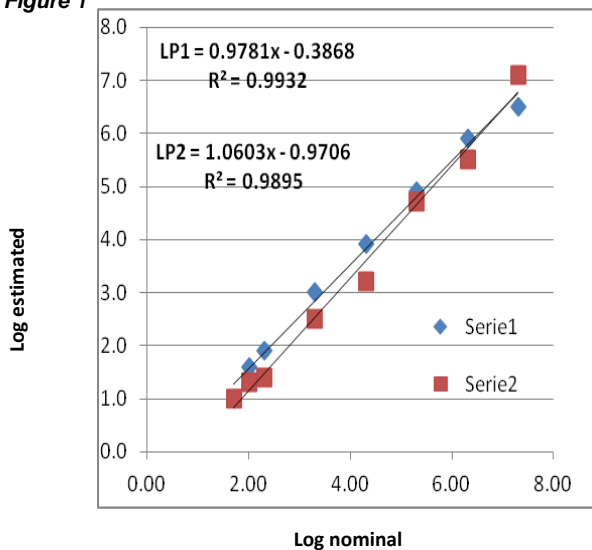
Limits of quantification are reported in the table 2:

Tab 2

Limit of quantification		
Instrument	Upper limit	Lower limit
ABI™ PRISM® 7500 SDS	2.0+07 UI/ ml	5.0E+01 UI/ml
(Stratagene™) MX3000P®		

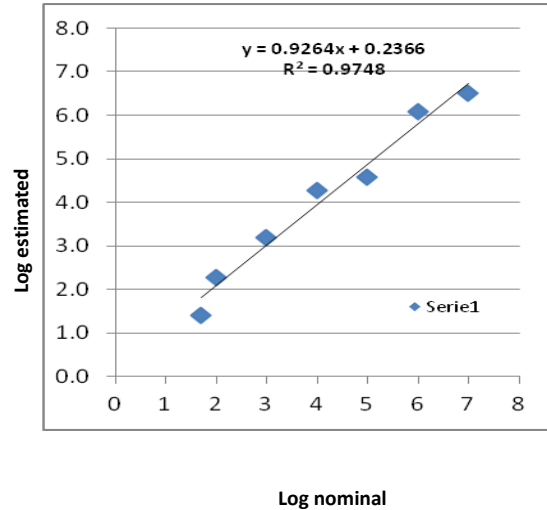
The figure 1 reported below refers to ABI 7500SDS and the **standard curve in negative plasma sample**:

Figure 1



The figure 2 reported below i refers to Mx3000P and to **HBV DNA Quantification panel (Acrometrix)**.

Figure 2



The coefficient R² show a good correlation. Similar result were obtained by the other instrument.

The upper **limit of quantification for positive samples** is 7.3log (2.0+07 UI/ml) and the lower limit of quantification is 1.69log (5.0+01 UI/ml).

S.2 ANALITYCAL SPECIFICITY

Analytical specificity is the ability of a method to detect and quantify only the target marker.

The analytical specificity of HBV DNA assay has been studied as follow:

1. The primer/probe Set has been choose analysing the genome target sequence with an appropriate software (Primer Express v.3.0" supplied by Applied Biosystem Inc.).
2. The primer/probe Set and the target genome sequence has been controlled by the "BLAST" software, in order to check if any of the nucleotide sequences deposited in the worldwide genomic banks has any homology with HBV, and by the "ClustalX" software, in order to compare the genome target sequences of the different genotypes of HBV.
3. The specificity was improved through the selection of stringent reaction conditions.
4. Plasmas from patients infected with organisms potentially interfering were obtained from Fondazione Irccs Cà Granda-Ospedale Maggiore Policlinico Milano -Italy and tested

The results are reported in the following table:

Number of samples	Organism	Result
12	HIV	negative
10	HCV	negative
7	CMV	negative
1	Enterovirus	negative
1	VZV	negative
1	HH6	negative
1	HSV1	negative
1	HSV2	negative
1	EBV	negative

S.3 DIAGNOSTIC SPECIFICITY AND SENSITIVITY

S.3.1 Diagnostic Specificity:

Diagnostic specificity is the probability that the device gives a negative result in the absence of the target marker. So that **true negative** sample is a specimen known to be negative for the target marker and correctly classified by the device

HBV DNA Negative sample

TRUE NEGATIVES	100
FALSE POSITIVES	0
TOTAL SAMPLES	100
SPECIFICITY %	100

On the basis of the results obtained **Diagnostic Specificity for HBVDNAQT.CE is 100%**, so that the system satisfies the acceptance criteria ($\geq 99.5\%$.)

S.3.2 Diagnostic Sensitivity

Diagnostic sensitivity is the probability that the device gives a positive result in the presence of the target marker. So that **true positive** sample is a specimen known to be positive for the target marker and correctly classified by the device.

In the kit code HBVDNAQT.CE this parameter was studied by examining HBV DNA positive plasma samples supplied by the Fondazione Irccs Cà Granda-Ospedale Maggiore Policlinico Milano-Italy, in the same run and then it was been calculated the percentage (%) of positive samples .

The positive samples were tested positive with the kit in use, **Abbott Real Time HBV**, in the laboratory that provided them.

HBV DNA Positive samples

TRUE POSITIVES	100
FALSE NEGATIVES	0
TOTAL SAMPLES	100
SENSITIVITY %	100

Moreover the Diagnostic Sensitivity of the assay was tested using QCMD Panel (HBVDNA08, HBVDNA10A, HBVDNA11A) in duplicates in different runs. Results obtained were consistent with the expected.

On the basis of the results obtained Diagnostic Sensitivity of the system has been calculated in the 100%.

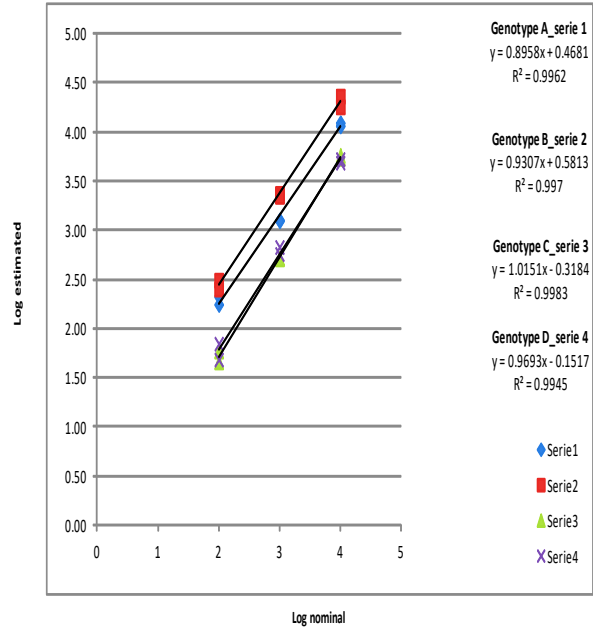
Diagnostic Sensitivity	100 %
Diagnostic Specificity	≥ 99.5 %

T. DETECTION AND QUANTIFICATION OF HBV RELEVANT GENOTYPE

According to CTS the kit code HBVDNAQT.CE was evaluated for genotypes detection and quantification efficiency. For the analysis were tested genotypes included in the QCMD Genotyping Panel 2010 (HBVGT10) and 2011 (HBVGT11). The kit code HBVDNAQT.CE is able to detected all genotypes included in the panels except **Genotype H** (it was detected with less efficiency than expected).

The kit code HBVDNAQT.CE was also evaluated for diluting of relevant genotypes (A, B, C, and D) from 10000 copies/ml (4000 IU/ml) to 100 copies/ml (40 IU/ml).

In the graph is shown regression analysis with the results.



As showed the correlation coefficient ranged from 0.994 to 0.998.

U. PRECISION

Precision shows the degree of the system's reliability. Every measurement procedure has an inherent random variation called "random error". Random error does not have a number value but it is determined by dispersion of measurement as standard deviation (DevST) and coefficient variation (CV%). Usually precision of an assay refers to the agreement between replicate measurements of the same material.

In the kit code HBVDNAQT.CE, **precision** was expressed as intra-assay variability and inter-assay variability. Were tested in the same run (intra-assay) and in three different runs (inter-assay) all 5 standard points curve in 8 replicates for each one.

Intra and inter-assay variability were then calculated.

In absence of an established parameters in the European IVD Directive CTS we have identified the following value of acceptability for the HBV DNA:

Intra-Assay Coefficient Variation (CV%) $\leq 10\%$.

Inter-Assay Coefficient Variation (CV%) $\leq 10\%$.

V. LIMITATIONS

1. For in vitro diagnostic use only.
2. Before using this kit is recommended to read carefully and understand the package insert.
3. Strict adherence to the protocol is necessary in order to obtain reliable test results.
4. Optimal performance of this test requires appropriate specimen collection, storage, transport and handling of samples and reagents.
5. The kit is intended to be use only for plasma samples according to our advice
6. Environment laboratory, equipment, instrumentation and reagents must be controlled through good laboratory practise to avoid contamination during all steps starting from extraction to amplification. Low level positive result may occur from cross contamination during processing of specimen with high DNA copy number. In any case per treatment guidelines a 1 log increase is need in order to impact patient management.
7. In addition, treatment guidelines require two consecutive elevated measurements to occur before changing patient management.
8. Follow out a workflow both an accurate pipetting of samples/reagents and appropriate setting of thermocycler instrument.
9. Be careful when entering standards concentration during the set up of the assay. It is advisable to express the











concentrations of standards in UI/μl as indicated in the **Section I**

10. A positive result has extensive medical, social, psychological and economic implications.
11. It is recommended that confidentiality, appropriate counselling and medical evaluation must be considered as an essential aspect of the testing sequence.

Z.BIBLIOGRAPHY

1. The new EASL guidelines for the management of chronic hepatitis B infection adapted for Swiss physicians. *Florian Bihl, Mahnaz Alaei, Francesco Negro*. Swiss med wkly 2010 ;140(11-12):154-159
2. DNA-guided hepatitis B treatment, viral load is essential, but not sufficient. *Rafael Bárcena Marugán, Silvia Garcia Garzon*. World J Gastroenterology 2009;28:15(4):423-430
3. Ruolo degli acidi nucleici e marcatori immunologici nella diagnosi e gestione del portatore cronico di virus epatitici maggiori (B,C,D). *Ferruccio Bonino, Maurizia Rossana*. Ligand assay 11 (4) 2006:319-32M
4. Real time-PCR HBV-DNA Analysis: Significance and first experience in armed forces. *Col GS Chopra, sm*, Lt Col PK Gupta+, Col AC Anand, vsm#, Col PP Varma, vsm**, Col V Nair, vsm++Lt Gen Ramji rai, avsm, vsm, phs#*. MJAFI 2005;65:234-237
5. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real time fluorescence PCR assay. *R.Jardi, F.Rodriguez, M.Buti, X. Costa, M.Cotrina, A.valdes, R.Galimany, R.Esteban and J.Guardia*. Journal of Viral hepatitis 2001,8,465-471
6. Treatment of chronic hepatitis B: recommendations from an Italian workshop. *Carosi G., Rizzetto M*. Gig Liver Dis. 2008;40:603-317
7. Efficacy of lamivudine in patient with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Tassopoulos NC, Volpes R., Pastore G., Heathcote J., Buti M., Goldin RD, Hawley S., Barber J., Condreay L., Gray DF*. Hepatology 1999;29:889-896
8. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *Ganem D, Prince AM*, N Engl J Med 2004;350-1118-1129
9. Viral determinas and host immune response in pathogenesis of HBV infection. *Rapicetta M, Ferrari C, Levrero M*. J Med Virol 2002;67:454-457
10. World-wide epidemiology of HbeAg negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variant. *Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS*. J Viral Hepat. 2002;9:52-61
11. Hepatitis B virus concentrations in serum determined by sensitive quantitative assays in patients with established chronic hepatitis delta virus infection. *Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Yamashiro T, Maeshiro T, Kinjo F, Saito A, Zukeran H*. J Med Virol. 2001 Nov;65(3):478-84.
12. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. *Keith R. Loeb, Keith R. Jerome, James Goddard, Meei-Li Huang, Anne Cent, Lawrence Corey*. Hepatology:2000;32:3:626-629
13. Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). *Klaus M. Weinberger, Elisabeth Wiedenmann, Stephan Bohm, Wolfgang Jilg*. Journal of Virological Methods 2000;85:75-82
14. Real-Time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus Genotype A to G. *Tania M. Wezel, Wendell J. Miley, Thomas L. parks, James J. Goedert, Denise Whitby, Betty A.Ortiz-Conde*. Journal fo Clinical Microbiology 2006;44:3325-3333

Z.1 SYMBOLS

LEGENDA			
	Product code		Storage temperature
	In Vitro Diagnostic Device		See use instructions
	Lot number		Manufacturer
	Expiry date		Number of tests
	CE conformity mark		Date of manufacturing

All the IVD Products manufactured by the company are under the control of a certified Quality Management System approved by an EC Notified Body. Each lot is submitted to a quality control and released into the market only if conforming with the EC technical specifications and acceptance criteria.

Manufacturer:
Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.r.l.
Via G. Carducci 27 – 20099 Sesto S. Giovanni (MI) – Italy


0318

HBV DNA

QUANTITATION (QT)

**PCR en tiempo real
para la cuantificación del
genoma del VHB**

- Uso exclusivo para diagnóstico “in vitro”-



DIA.PRO

**Diagnostic Bioprobes Srl
Via G. Carducci n° 27
20099 Sesto San Giovanni
(Milán) - Italia**

Teléfono +39 02 27007161

Fax +39 02 44386771

e-mail: info@diapro.it

REF. HBVDNAQT.CE
25/50/100/150 pruebas

ADN DE VHB

A. OBJETIVO DEL EQUIPO

El equipo de PCR en tiempo real para **cuantificación (QT) de ADN del VHB**, con código **HBVDNAQT.CE**, ha sido desarrollado para la detección cuantitativa de ADN del virus de la hepatitis B en plasma humano con un control simultáneo de la reacción de amplificación mediante un **Control Interno (IC)**. Este equipo está diseñado para utilizarse como indicador pronóstico de la enfermedad en combinación con la observación clínica y los marcadores de laboratorio y para ayudar a evaluar la respuesta viral al tratamiento antiviral. El equipo se ha adaptado para el uso en termocicladores Real-Time ABI 7500 Sequence Detection System® (Applied Biosystems™*) con software SDS 1.3.1, o MX3000P® con software MxPro 4.01(Stratagene™***).

* Applied Biosystems es una marca comercial registrada y ABI PRISM® es una marca comercial de Applied Biosystems Corporation o sus filiales en EE.UU. y/o en otros países determinados.
***Stratagene es una marca comercial registrada.

B. INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis B es un virus perteneciente a la familia Hepadnaviridae. El genoma de este virus es una doble cadena circular incompleta de ADN que se cierra y adquiere una estructura superhelicoidal (ADNccc) cuando el virus se aloja en los hepatocitos del huésped. Recientemente se han identificado ocho genotipos (de A a H). El virus se replica a gran velocidad y muta con mucha frecuencia. Las mutaciones conllevan la acumulación de numerosas variantes genéticas, denominadas cuasiespecies, en cada persona infectada. Cada vez hay más pruebas que demuestran que la historia natural del virus y la respuesta al tratamiento pueden variar en función del genotipo del VHB que causa la infección. No obstante, no se conoce del todo la correlación real entre el genotipo y el resultado de la enfermedad. La infección por el virus de la hepatitis B es un problema mundial de salud pública que afecta a 350 millones de personas en todo el mundo. Puede evolucionar hacia la cronicidad (HBC) y causar enfermedades hepáticas o carcinoma hepatocelular (CHC). En la actualidad, algunos estudios han demostrado que la fortaleza de la respuesta inmunitaria del huésped modula la gravedad de la lesión hepática durante la infección. De acuerdo con esto, se pueden identificar dos tipos de infección: aguda y crónica.

En la infección aguda por VHB, las muestras de suero presentan niveles detectables de antígeno de *superficie* de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos IgM del antígeno *nuclear* de la hepatitis B (HBcIgM) y antígeno (HBeAg); sin embargo, los niveles de ALT no aumentan hasta que la infección está bien establecida. Los niveles de ADN del VHB suelen ser muy elevados, de entre 200 millones UI/ml y 200.000 millones UI/ml.

La infección crónica por VHB puede presentar 5 fases:1) Tolerancia inmunológica (niveles elevados de HBeAg, HBsAg y ADN de VHB, alta tasa de replicación viral); 2) Inmunorreactividad (HBeAg/HBsAg positivo, niveles de ADN de VHB altos o bajos si se trata de infección perinatal o de adultos, fluctuación de ALT); 3) Estado de portador inactivo (seroconversión de HBeAg en HBeAb, HBsAg positivo, ALT normal, ADN de VHB muy bajo o imperceptible <3 log); 4) Hepatitis crónica con pruebas positivas para HBeAg (HBeAg negativo/HBeAb positivo o reversión a HBeAg positivo, niveles variables de ADN de VHB, aumento o variación de ALT. En esta fase, la ausencia de HBeAg en algunos pacientes se asocia con una mutación del genoma del VHB. ;5) Infección previa (HBsAb positivo, HBsAg negativo, ALT normal, niveles de ADN de VHB negativos o muy bajos <2,3 log).

El diagnóstico y el control clínico de la infección por VHB se basan en la detección de marcadores serológicos inmunológicos y del genoma del virus circulante (ADN de VHB), como se indica arriba. Como los niveles de ADN del VHB reflejan la replicación viral y la capacidad infectante del virus, la cuantificación de la carga viral del VHB es importante en la evaluación y el tratamiento de los pacientes con infección crónica por VHB. Las nuevas directrices de EASL recomiendan utilizar la carga viral del VHB para determinar los pacientes crónicos que deben someterse a tratamiento y la terapia que se debe aplicar (interferón o similar a NUC-nucleoside). El objetivo principal de todas las terapias es reducir los niveles de ADN del VHB por debajo de 2,3 log para contrarrestar la evolución a cirrosis hepática o CHC.

C. PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El equipo HBVDNAQT.CE utiliza la tecnología de PCR en tiempo real para detectar y cuantificar el ADN del VHB en muestras clínicas de plasma.

La especificidad del ensayo se garantiza en primera instancia mediante la elección de cebadores y sondas específicos y la selección de condiciones de reacción estrictas.

El **ADN del VHB** recuperado de la muestra de plasma se extrae y amplifica junto con la secuencia no relacionada (**IC**) que se incorpora a cada muestra al principio del proceso de preparación de las muestras. Este IC sirve para comprobar la realización correcta de todo el proceso en cada muestra.

El producto amplificado se detecta y cuantifica comparándolo con la curva estándar, utilizando una sonda con tinte indicador fluorescente específica para la secuencia del VHB. La construcción de la curva estándar permite determinar la carga viral.

El ensayo está normalizado según la 2ª Norma Internacional para el virus de la Hepatitis B (NIBSC código 97/750) de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los resultados se expresan en unidades por mililitro (UI/ml) o copias/ml.

Este ensayo no debe utilizarse como prueba de detección del VHB, ni como prueba diagnóstica para confirmar la existencia de infección por VHB.

D. COMPONENTES

El formato estándar del producto (código HBVDNAQT.CE) contiene reactivos suficientes para realizar 50 pruebas.

Componente	Etiquetado y contenido	HBVDNAQT.CE 50 reacciones
A CÓDIGO: ALL/MM Color: azul	Mezcla maestra	N.º 2 / 0,40 ml
B CÓDIGO: HBV/CB Color: amarillo	Cebadores/sondas liofilizados	N.º 2 (Disolver con el ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
C CÓDIGO: ALL/C Color: rojo	Agua de grado molecular	Viales n.º 3 / 1,5 ml
NTC CÓDIGO: ALL/NTC Color: blanco	Control negativo	Viales n.º 1 / 1,5 ml
STD CÓDIGO: HBV/STD Color: rojo	Calibrador de curva estándar liofilizado (2,0 E+05 UI/µl)	N.º 4 (Disolver con el ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
IC CÓDIGO: ALL/IC Color: verde	Control interno liofilizado	N.º 2 (Disolver con el ALL/C indicado en la etiqueta del vial)
Manual de instrucciones	Instrucciones de uso	N.º 1

Nota importante: Dia.Pro puede suministrar reactivos para 25, 100 y 150 reacciones bajo pedido, como se indica en la tabla:

Componente	Vial n.º 1 / 0,4 ml	Viales n.º 4 / 0,4 ml	Viales n.º 6 / 0,4 ml
Componente A	Vial n.º 1	Viales n.º 4	Viales n.º 6
Componente B	Vial n.º 2 / 1,5 ml	Viales n.º 3 / 1,5 ml	Viales n.º 5 / 1,5 ml
Componente C	Vial n.º 1 / 1,5 ml	Viales n.º 1 / 1,5 ml	Viales n.º 1 / 1,5 ml
NTC	Vial n.º 1	Viales n.º 4	Viales n.º 6
IC	Vial n.º 2	Viales n.º 4	Viales n.º 6
STD	Vial n.º 1	Viales n.º 4	Viales n.º 6
Manual instrucc.	n.º 1	n.º 1	n.º 1
Número de pruebas	25	100	150
Código	HBVDNAQT.CE.25	HBVDNAQT.CE.100	HBVDNAQT.CE.150

E. ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO

El equipo con código HBVDNAQT.CE debe guardarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C.

Una vez que se disuelven, el componente B (código HBV/CB) y el componente I.C. (código ALL/IC) son estables durante 30 días a temperatura de -20 °C, mientras que el componente STD (código HBV/STD) es estable durante 15 días a esta temperatura. Los componentes disueltos solo deben descongelarse una vez.

F. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas calibradas (0,5 µl <volumen<1000 µl)
2. Equipo de extracción de ADN
3. MG EtOH
4. Bloque térmico
5. Agitador térmico
6. Microcentrifuga
7. Tubo y racks para tubos de 2 ml y 1,5 ml
8. Puntas filtradas estériles con barrera contra aerosoles
9. Microtubos de 0,2 ml recomendados por los fabricantes de los instrumentos PCR en tiempo real
10. Guantes desechables, sin polvo
11. Termociclador Real-Time PCR (*)
12. Papel absorbente
13. Vórtex o similar

(*) **Atención:** Es necesario realizar una calibración válida de los tintes puros (archivo del componente del espectro puro) y del fondo (archivo del componente de fondo) cuando se ponen en funcionamiento los instrumentos.

G. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. El equipo solo debe usarse por personal técnico adecuadamente entrenado, bajo la supervisión de un médico responsable del laboratorio.
2. El personal técnico debe tener una amplia formación en el uso de termocicladores Real-Time, en la manipulación de reactivos para biología molecular y en los protocolos de amplificación de PCR en tiempo real.
3. El equipo debe utilizarse en un laboratorio certificado y homologado por la autoridad nacional en este campo (Ministerio de Sanidad o entidad similar) para realizar este tipo de análisis.
4. Todo el personal que participe en la realización de los ensayos deberá llevar la indumentaria protectora adecuada de laboratorio, guantes sin talco y gafas. Evitar el uso de objetos cortantes (cuchillas) o punzantes (agujas). Todo el personal involucrado debe tener formación en procedimientos de bioseguridad, como recomienda el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y como ha publicado el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Todo el personal involucrado en el manejo de muestras debe estar vacunado contra VHB y VHA, para lo cual existen vacunas disponibles, seguras y eficaces.
6. Se debe controlar el entorno del laboratorio para evitar la contaminación por polvo o agentes microbianos en el aire al abrir los viales del equipo y los componentes, así como durante la realización del ensayo.
7. Los componentes A y B son sensibles a la luz. Protegerlos de la exposición a la luz intensa.
8. Prestar **especial atención** durante la disolución de los tubos liofilizados y verificar que el polvo presente en las paredes del tubo esté incluido en el volumen de agua utilizado en la disolución, en caso de que la centrifugación fuese insuficiente.
9. Una disolución incorrecta del tubo liofilizado podría comprometer el resultado.
10. Evitar vibraciones de la superficie de la mesa de trabajo donde se realiza la prueba.
11. Tras la recepción, conservar el equipo a temperaturas entre 2-8 °C, en un refrigerador con temperatura regulada o en una cámara de refrigeración.
12. No intercambiar componentes de lotes de equipos distintos ni tampoco de dos equipos del mismo lote.
13. Comprobar que los reactivos estén claros y no contengan partículas pesadas visibles ni agregados. Si no es así, informar al supervisor del laboratorio para realizar el procedimiento pertinente para reemplazar el equipo.
14. La fase de extracción es muy importante para obtener el resultado correcto. Seguir con atención las instrucciones recomendadas en la guía del usuario.

15. Algunos pasos del proceso de extracción son decisivos, mientras que la centrifugación es un paso clave en el procedimiento de purificación. Es importante que el precipitado y el sobrenadante obtenidos no estén turbios. Además, la siguiente resuspensión completa del precipitado es vital para garantizar la recuperación máxima de ácidos nucleicos.

16. La aplicación de una velocidad de centrifugación incorrecta puede dar lugar a la formación del precipitado, que se resuspenderá con dificultad. La disolución incorrecta del precipitado puede provocar un error de cuantificación. En este caso, consultar "Optimización de la centrifugación" en el manual del usuario.

17. Tener precaución para evitar la contaminación cruzada entre muestras usando puntas desechables y cambiándolas después de cada uso.

18. Utilizar puntas desechables y cambiarlas cada vez para evitar la contaminación cruzada de los reactivos del equipo.

19. No usar el producto después de la fecha de caducidad indicada en las etiquetas internas (viales) y las etiquetas del envase externo.

20. Tratar todas las muestras como potencialmente infecciosas. Las muestras de plasma humano deben ser manipuladas al nivel 2 de bioseguridad, según ha sido recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Estados Unidos, y publicado por el Instituto Nacional de Salud: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.

21. Almacenar y extraer los materiales positivos (muestras, controles y amplicones) separados de los demás reactivos, y usar un espacio separado para su manipulación.

22. Disolver los reactivos liofilizados con la cantidad correcta de agua de grado molecular (componente C, código ALL/C), indicada en las etiquetas, que se suministra con el equipo.

23. Llevar a cabo todas las operaciones lo más rápido posible.

24. El flujo de trabajo en el laboratorio debe ser unidireccional, comenzando en la zona de extracción y avanzando hasta la zona de amplificación y de análisis de datos. No devolver las muestras, los equipos o los reactivos a la zona donde se hayan realizado las fases anteriores.

25. Se recomienda utilizar material plástico desechable para preparar los componentes líquidos o transferir los componentes a los equipos automatizados a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

26. Los desechos producidos durante el uso del equipo deben eliminarse según lo establecido por las directivas nacionales y las leyes relacionadas con el tratamiento de los residuos químicos y biológicos de laboratorio. En particular, los desechos líquidos procedentes del procedimiento de lavado o de restos de controles y muestras deben ser tratados como material potencialmente infeccioso y deben ser inactivados. No poner los desechos de la extracción en contacto con lejía.

27. En caso de derrame accidental de algún producto, se debe utilizar papel absorbente embebido en lejía y, posteriormente, en agua. El papel debe eliminarse en contenedores designados para este fin en hospitales y laboratorios.

28. Los demás materiales de desecho que se generan durante la utilización del equipo (por ejemplo, puntas usadas para las muestras) deben manipularse como potencialmente infecciosos y deben eliminarse de acuerdo con las directivas y leyes nacionales sobre los residuos de laboratorio.

29. Inspeccionar el laboratorio para detectar la presencia de producto de amplificación. Se recomienda supervisar la contaminación de las superficies del laboratorio y el equipo.

H. MUESTRA: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

1. Extraer la sangre asépticamente por punción venosa y preparar el plasma según las técnicas estándar de preparación de muestras para laboratorios de análisis clínicos.

2. Las muestras de sangre periférica entera para extracción de ADN deben recogerse en EDTA, de acuerdo con el procedimiento del laboratorio, y transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un período máximo de 3 días. No congelar las muestras de sangre periférica entera para evitar lisis celular y pérdida de carga viral.

3. No se ha detectado ninguna influencia en la preparación de la muestra con citrato, EDTA.

Atención: La heparina (≥ 10 IU/ml) afecta a las reacciones de PCR. Las muestras recogidas en tubos que contienen heparina como anticoagulante no deben usarse. Tampoco deben usarse las muestras de pacientes heparinizados.

4. Evitar cualquier adición de conservantes a las muestras.

5. Las muestras deben ser identificadas claramente mediante códigos de barras o nombres a fin de evitar una interpretación errónea de los resultados.

6. Las muestras hemolizadas (color rojo) y visiblemente hiperlipémicas (aspecto lechoso) deben descartarse para evitar falsos resultados, al igual que aquellas que contengan restos de fibrina, partículas pesadas o filamentos y organismos microbianos.

7. Las muestras de plasma con gran cantidad de lípidos pueden impedir la recuperación de los ácidos nucleicos o causar una recuperación insuficiente de ácidos nucleicos. En este caso, el precipitado será escaso o inexistente. Extraer una muestra reciente y seguir las instrucciones de la guía de solución de problemas del manual del usuario.

8. Si no se usa inmediatamente, el plasma debe almacenarse en alícuotas a una temperatura de -20 °C a -80 °C tras la extracción. Las muestras pueden almacenarse congeladas a una temperatura de -20 °C a -80 °C durante varios meses. Las muestras congeladas no se deben descongelar más de una vez, ya que podría afectar al resultado de la prueba.

9. Las muestras de plasma para extracción de ADN deben recogerse de acuerdo con los procedimientos comunes del laboratorio, y transportarse y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C durante un período máximo de 4 horas. Las muestras de plasma pueden almacenarse congeladas a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos. Evitar los ciclos de congelación/descongelación repetidos.

10. Para un almacenamiento óptimo de las muestras, recomendamos dividir las en varias alícuotas (volumen mínimo 500 µl, el necesario durante una única sesión de extracción) y almacenarlas a -20 °C durante un período máximo de 30 días, o a -70 °C durante períodos más largos.

11. **Recordar el tratamiento preanalítico de la muestra de plasma. Todas las muestras deben diluirse en una proporción 1:2 en una solución amortiguadora de fosfato (500 µl de muestra + 500 µl de PBS) antes de la extracción.**

12. La omisión del paso anterior da lugar a un error de cuantificación.

13. Al utilizar muestras congeladas, descongelar las muestras justo antes de la extracción para evitar posibles causas de degradación de los ácidos nucleicos.

I. PREPARACIÓN DE LOS COMPONENTES Y PRECAUCIONES

Mezcla maestra:

Componente A listo para el uso. Mezclar bien con un vórtex antes de usar.

ADVERTENCIA: El componente A es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Cebadores/Sondas:

Componente B

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 12000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver el componente B liofilizado de forma homogénea con el volumen de agua (componente C con código ALL/C) que se indica en la etiqueta del vial.
- Mantener la disolución en la mesa de trabajo durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C).
- Agitar brevemente evitando que se forme espuma.

ADVERTENCIA: El componente B es sensible a la luz. Protegerlo de la exposición a la luz intensa.

Agua de grado molecular:

Componente C listo para el uso

NTC o control negativo:

ALL/NTC listo para el uso

Curva estándar:

Componente STD

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 12000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.

- Disolver el componente HBV/STD liofilizado de forma homogénea con el volumen correcto de agua (componente C con código ALL/C) que se indica en la etiqueta del vial.
- Mantener la disolución en la mesa de trabajo durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C).
- Agitar brevemente evitando que se forme espuma.
- Preparar 5 tubos libres de nucleasa para la preparación de la curva estándar.
- Preparar una dilución en serie con proporción 1:10 en el **componente C** (agua de grado molecular) para obtener la curva estándar de la tabla siguiente:

Preparación de la curva estándar		
STD	Calibrador 200000 (UI/µl)	Volumen de componente C (agua de grado molecular) indicado en la etiqueta del vial
STD 1	20000 (UI/µl)	10 µl (STD) + 90 µl componente C (agua de grado molecular)
STD 2	2000 (UI/µl)	10 µl (STD) + 90 µl Componente C (agua de grado molecular)
STD 3	200 (UI/µl)	10 µl (STD) + 90 µl Componente C (agua de grado molecular)
STD 4	20 (UI/µl)	10 µl (STD) + 90 µl Componente C (agua de grado molecular)
STD 5	2 UI/µl	10 µl (STD) + 90 µl Componente C (agua de grado molecular)

Control interno:

Componente IC

- Centrifugar el vial durante 1 minuto a 12000 rpm.
- Abrir con cuidado la tapa del vial evitando la dispersión del polvo.
- Disolver el componente IC liofilizado de forma homogénea con el volumen de agua (componente C con código ALL/C) que se indica en la etiqueta del vial.
- Mantener la disolución en la mesa de trabajo durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente (15 °C < RT < 25 °C).
- Agitar brevemente evitando que se forme espuma.

L. INSTRUMENTOS Y EQUIPAMIENTO UTILIZADOS EN COMBINACIÓN CON EL EQUIPO

1. **Micropipetas:** Deben calibrarse para dispensar correctamente el volumen requerido en el ensayo y someterse a descontaminación periódica de las partes que pudieran entrar accidentalmente en contacto con la muestra (alcohol, lejía al 10%, desinfectantes de calidad hospitalaria). Además, deben revisarse regularmente para mantener una precisión del 1% y una exactitud de +/- 5%. También se debe llevar a cabo de forma regular la descontaminación de derrames o residuos de los componentes del equipo.
2. **Dispositivo de extracción:** El equipo HBVDNAQT.CE está diseñado para utilizarse con el equipo QIAamp UltraSense virus con código 53706 (QIAGEN). Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso suministradas por el fabricante.
3. **Termocicladores Real-Time:** El equipo HBVNAQT.CE ha sido diseñado para usarse solo con los termocicladores Real Time ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) con software SDS versión

1.3.1, y MX3000P® con software MxPro versión 4.01 (Stratagene™).

Los usuarios finales deben seguir estrictamente las instrucciones de uso de los instrumentos suministradas por los fabricantes.

M. OPERACIONES Y CONTROLES PREVIOS AL ENSAYO

1. Comprobar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta externa de la caja del equipo. No usar si ha caducado.
2. Comprobar que los componentes líquidos no estén contaminados con partículas o agregados visibles a simple vista. Comprobar que haya un agregado bien formado en los viales de los componentes liofilizados. Comprobar que no se hayan producido roturas ni derrames de líquido dentro de la caja durante el transporte.
3. Disolver los componentes liofilizados con la cantidad adecuada de componente C (agua de grado molecular) como se indica en la etiqueta del vial.
4. Encender los termocicladores, comprobar la configuración y asegurarse de que se usa el protocolo de ensayo correcto.
5. Seguir estrictamente los manuales de los instrumentos suministrados por los fabricantes para configurar los termocicladores Real-Time de forma correcta.
6. Comprobar que las micropipetas estén ajustadas en el volumen requerido.
7. Asegurarse de que el resto del equipamiento esté disponible y listo para el uso.
8. En caso de que surja algún problema, detener el ensayo y avisar al responsable.

N. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

El ensayo debe realizarse de acuerdo con lo indicado a continuación.

N.1 Extracción de ADN viral

La fase de extracción de ADN genómico del VHB debe realizarse exclusivamente en combinación con los siguientes equipos:

Material	Descripción	Código del equipo	Fabricante
Plasma	QIAamp UltraSense virus®	53706	Qiagen™

1. Antes de empezar, preparar el mismo número de tubos que la cantidad de muestra que vayan a extraerse.
2. Añadir 500 µl de solución amortiguadora de fosfato (PBS) estéril a cada tubo.
3. Añadir 500 µl de la muestra hasta que el volumen total sea de 1 ml.
4. Añadir 10 µl de ALL/IC. El IC se añade en esta fase para determinar si la extracción de DNA se ha realizado correctamente.
5. Continuar con la extracción como se indica en la guía del usuario.
6. El volumen de elución recomendado es de 70 µl.
7. El ADN se debe aislar conforme a las instrucciones del fabricante y a nuestras indicaciones (consultar el apartado H).
8. En la tabla siguiente se resume el proceso preanalítico.

Proceso preanalítico				
Código de muestra	Volumen de PBS	Volumen de muestra	Volumen de ALL/IC	Volumen total
Código definido asignado	500 µl	500 µl	10 µl	1010 µl

El ADN extraído de la muestra que no se ha usado en la serie debe almacenarse congelado (de -20 °C a -80 °C).

N.2 Configuración de la reacción

El equipo HBVDNAQT.CE ha sido diseñado para usarse solo con los termocicladores Real Time ABI PRISM 7500 estándar (Applied

Biosystems) con software SDS versión 1.3.1, y MX3000P® con software MxPro versión 4.01 (Stratagene™).

N.2.1 Preparación de PCR

Importante: En el apartado O se incluye un ejemplo de esquema de dispensación. Consultar este esquema antes de leer las instrucciones siguientes.

- Preparar los componentes como se describe en el apartado I.
- Preparar el número requerido de tubos de reacción o una placa de reacción de 96 pocillos para las muestras en evaluación y para la curva estándar (preparada como se describe en la sección I).

Nota importante: Usar solo los tubos ópticos o las microplacas sugeridos por los fabricantes de los termocicladores Real-Time.

- Tener en cuenta que las muestras deberían analizarse por duplicado o triplicado, siempre que sea posible.
- Incluir al menos 1 tubo para el NTC (control negativo).
- Preparar la **mezcla de amplificación** para las **muestras, el NTC y la curva estándar** como se indica a continuación:

Tab 1-Control interno (IC) como control de amplificación

Preparación de la mezcla de amplificación

Número de reacciones		1 reacción	10 reacciones
A	Mezcla maestra	12,5 µl	125 µl
B	Cebadores/Sondas	2 µl	20 µl
IC	Control interno	0,5 µl	5 µl
Vol. total		15 µl	150 µl

Tab 2-Control interno (IC) como control de extracción y amplificación

Preparación de la mezcla de amplificación

Número de reacciones		1 reacción	10 reacciones
A	Mezcla maestra	12,5 µl	125 µl
B	Cebadores/Sondas	2 µl	20 µl
ALL/C	Agua de grado molecular	0,5 µl	5 µl
Vol. total		15 µl	150 µl

En este caso (Tab 2), el control interno (IC) todavía está incluido en la muestra antes de la extracción.

N.2.2 Procedimiento de amplificación

- Dispensar 15 µl de la mezcla de amplificación en cada tubo de reacción o pocillo de la microplaca.
- Añadir 10 µl de las **muestras, el NTC y la curva estándar** a los tubos de reacción.
- Centrifugar brevemente los tubos de reacción a 2000 rpm.
- No dejar los tubos de reacción a temperatura ambiente (RT) durante más de 30 minutos y expuestos a la luz.
- Cubrir bien los tubos.
- Cargar los tubos en el soporte del bloque térmico del termociclador Real-Time.

- Tras las operaciones de configuración descritas en el apartado N3 (Programación del instrumento), iniciar la serie del termociclador.

Nota importante: El componente liofilizado tras la disolución en componente C (agua de grado molecular) no estará estable más de 3 horas a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

Al final de la jornada laboral, desechar adecuadamente los materiales sobrantes de los puntos de dilución STD.

El volumen no utilizado de los componentes B, STD e IC puede dividirse en alícuotas y congelarse a -20 °C. Las alícuotas solo deben descongelarse una vez y deben utilizarse como se indica en el apartado E.

N.3 Programación del instrumento

Para programar los equipos, consulte los manuales de instrucciones (directrices de cuantificación absoluta) suministrados por los fabricantes.

Nota importante: En el caso de Mx3000P (Stratagene), prestar atención para configurar "Ajuste de ganancia del filtro" como se indica a continuación.

ROX =x1;FAM=x8; JOE=x1

N.3.1 Perfil térmico

El perfil térmico aparece en la siguiente tabla:

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

NOTA IMPORTANTE: (*) Fase para la adquisición de datos en tiempo real

Advertencia: Prestar atención para ajustar el termociclador Real-Time con el perfil térmico correcto siguiendo las instrucciones del manual de los instrumentos suministrado por el fabricante.

N.3.2 Selección de los detectores

Siguiendo los manuales de instrucciones de los termocicladores Real-Time sugeridos (ABI 7500 y MX3000P®), seleccionar los detectores indicados en la siguiente tabla:

Detección	Indicador	Templador
VHB	FAM	Inexistente
Control interno (IC)	JOE	Inexistente
Referencia pasiva	ROX	Inexistente

O. ESQUEMA DEL ENSAYO

A continuación se ofrece un ejemplo del esquema de dispensación para análisis cuantitativo:

Microplaca/Tubos

	1	2	3		
A	STD 1				
B	STD 2				
C	STD 3				
D	STD 4				
E	STD 5				
F	NTC				
G	Muestra 1				
H	Muestra 2				

Leyenda: NTC = Control negativo STD 1,2,3,4,5 = Curva estándar de ADN de VHB, Muestra 1,2, = Muestras en evaluación

P. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

P.1 Configuración previa al análisis

Antes de empezar a interpretar los datos:

- Ajustar la "línea de base" (nivel de fluorescencia del fondo) como se indica en la siguiente tabla:

"Línea de base"	
ABI™ PRISM 7500SDS	Línea de base manual: Inicio ciclador=3 Fin ciclador=10
MX3000P® (Stratagene™)	Línea de base adaptable Nota importante: <i>No usar el algoritmo Mx4000 v1.00 a v3.00.</i>

- Ajustar manualmente el "umbral" de fluorescencia de FAM/JOE.

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

P.2 Análisis de datos

Se realiza una comprobación en el calibrador STD 1 cada vez que se usa el equipo para verificar si su valor Ct es el esperado e indicado en la siguiente tabla.

Comprobar FAM	ABI7500SDS; Mx3000P
STD1 (20.000 UI/μl)	19≤C(ciclo umbral)≤22

Además, los valores de pendiente y R² se comprueban para verificar la calidad de la serie. Se deben cumplir los siguientes requisitos.

Comprobar FAM	Requisitos
Pendiente	-3,1 < Pendiente < -3,9

Comprobar FAM	Requisitos
Eficiencia	R ² > 0,98

Q. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Para cada muestra, se asume la fluorescencia FAM (valor Ct positivo/negativo) y la fluorescencia JOE del control interno para validar la detección de VHB como se describe en la siguiente tabla:

FAM VHB	JOE del control interno	Resultado del ensayo
MUESTRA POSITIVA	+	CORRECTO
	-	CORRECTO**
MUESTRA NEGATIVA	Ct<42	CORRECTO
	Ct>42 o indeterminado	NO VÁLIDO***

NOTA IMPORTANTE:

(**) Una concentración inicial alta de ADN del VHB en la muestra (señal FAM positiva) puede dar lugar a una señal de fluorescencia REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.

(***) En este caso, han aparecido problemas durante la fase de amplificación (amplificación ineficiente o ausente) o durante la fase de extracción (presencia de inhibidores) que podrían generar resultados incorrectos y falsos negativos. Por consiguiente, es preciso repetir la extracción con una nueva muestra reciente.

A cada muestra positiva sometida a extracción y detectada por el equipo con código HBVDNAQT.CE se puede aplicar una cuantificación correcta de la carga viral del VHB, como se indica en la tabla siguiente:

ABI™ PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P®	
Datos de la serie de la muestra de VHB (UI/ml)	Carga viral de VHB (UI/ml)
Cantidad > 2,0 E+07	Carga viral de VHB >2,0 E+07
5,0 E+01 < Cantidad < 2,0 E+07	CUANTIFICACIÓN
Cantidad < 5,0 E+01	Carga viral de VHB < 5,0 E+01

NOTA IMPORTANTE: Para la cuantificación de las muestras, consultar el apartado R.

Los resultados obtenidos con este producto deben interpretarse teniendo en cuenta el cuadro clínico y otros marcadores de laboratorio inherentes al paciente.

Son posibles los siguientes resultados:

Tabla de solución de problemas

FAM	JOE	Resultado	COMPROBAR
+	+/-	RESULTADO CORRECTO <u>Positivo</u>	<p>¡IMPORTANTE! Una concentración inicial alta de ADN del VHB (señal FAM positiva) puede dar lugar a una señal de fluorescencia REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.</p>
-	-	Inhibición, error en el procedimiento o no funcionamiento de los instrumentos	<p>1. Los componentes se han preparado correctamente. 2. No se han cometido errores en el procedimiento de ensayo. 3. Los tintes de detección seleccionados son correctos: FAM para la detección de VHB y JOE para la detección de IC. 4. El análisis se ha realizado con la configuración correcta del instrumento. 5. El equipo se ha almacenado correctamente. 6. Ningún inhibidor PCR potencial ha contaminado el tubo. 7. Los procedimientos de extracción se han realizado correctamente, como se indica en el apartado N.</p>
-	+	RESULTADO CORRECTO <u>Negativo</u>	

STD	+	+/-	RESULTADO CORRECTO	<p>¡IMPORTANTE! Una concentración inicial alta de ADN del VHB (señal FAM positiva) puede dar lugar a una señal de fluorescencia REDUCIDA o AUSENTE del control interno (IC) debido a la competencia de reactivos.</p>
STD	+	+/-	RESULTADO CORRECTO	<p>1. Los componentes se han preparado correctamente. 2. No se han cometido errores en el procedimiento de ensayo. 3. Los tintes de detección seleccionados son correctos: FAM para la detección de VHB y JOE para la detección de IC. 4. El análisis se ha realizado con la configuración correcta del instrumento. 5. El equipo se ha almacenado correctamente. 6. Ningún inhibidor PCR potencial ha contaminado el tubo.</p>
STD	-	-	POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	<p>¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento</p>
STD	-	+	POSIBILIDAD DE: Error en el pipeteado o en el procedimiento	<p>1. Los componentes se han preparado correctamente. 2. No se han cometido errores en el procedimiento de ensayo. 3. Los tintes de detección seleccionados son correctos: FAM para la detección de VHB y JOE para la detección de IC. 4. El análisis se ha realizado con la configuración correcta del instrumento. 5. El equipo se ha almacenado correctamente.</p>
NTC	-	+	RESULTADO CORRECTO	COMPROBAR

NTC	+	+	<p>¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Contaminación</p>	<p>1. Los componentes se han preparado correctamente. 2. No se han cometido errores en el procedimiento de ensayo. 3. El lugar de trabajo y los instrumentos se han descontaminado a intervalos regulares. 4. El equipo se ha almacenado correctamente.</p>
NTC	+	-	<p>¡ATENCIÓN! POSIBILIDAD DE: Contaminación</p>	<p>1. Los componentes se han preparado correctamente. 2. No se han cometido errores en el procedimiento de ensayo. 3. El lugar de trabajo y los instrumentos se han descontaminado a intervalos regulares. 4. El equipo se ha almacenado correctamente.</p>

Si los resultados del ensayo coinciden con los requisitos de **RESULTADO CORRECTO** anteriores, continuar con la siguiente sección.

Si surgen uno o varios de los problemas descritos en la tabla anterior, realizar una comprobación e informar al supervisor de cualquier problema residual para tomar las medidas pertinentes.

R. CUANTIFICACIÓN

Los calibradores STD se consideran muestras purificadas y se usa el mismo volumen de 10 µl.

Para generar una curva estándar es preciso utilizar y definir los cinco calibradores estándar como estándar con una concentración específica.

Todos los calibradores STD se definen como UI/µl.

Para calcular la **concentración inicial** de las muestras analizadas en el ensayo tiene que utilizarse la siguiente ecuación:

$$\text{Resultado (UI/ml)} = \frac{\text{Resultado obtenido (UI/}\mu\text{l)} \times \text{volumen de elución (}\mu\text{l)}}{\text{volumen de muestra (ml)}}$$

Nota importante:

***Como se indica en los apartados H y N, el volumen de muestra inicial es de 0,5 ml.**

****La cuantificación de las muestras puede aparecer en UI/ml y copias/ml. El factor de conversión es 2,5 (1 UI/ml = 2,5 copias/ml).**

Ejemplo:

Volumen de muestra empleado en la extracción = 0,5 ml

Resultado obtenido (UI/µl) = 20

Volumen de elución = 70 µl

$$\text{Resultado (UI/ml)} = \frac{20 \text{ (UI/}\mu\text{l)} \times 70 \text{ (}\mu\text{l)}}{0,5 \text{ (ml)}}$$

Resultado (UI/ml) = 2800

Resultado (copias/ml) = Resultado (UI/ml) x 2,5 = 2800 x 2,5 = 7000

Notas importantes:

1. La interpretación de los resultados debe hacerse bajo la supervisión del responsable del laboratorio para reducir el riesgo de errores de juicio e interpretación.
2. Cuando se transmiten los resultados de la prueba del laboratorio a un centro informático, debe prestarse mucha atención para evitar la transferencia de datos erróneos.

S. RENDIMIENTO

La evaluación del rendimiento se ha realizado según lo establecido en las Especificaciones Técnicas Comunes (ETC) (Art. 5, Capítulo 3 de la Directiva IVD 98/79/CE).

La evaluación del rendimiento se llevó a cabo en laboratorios DiaPro con materiales suministrados por la Fondazione Irccs Cà Granda-Ospedale Ospedale Maggiore Policlinico de Milán, Italia.

S.1 SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica de un método molecular cuantitativo hace referencia a la cantidad más pequeña del marcador diana que puede detectarse de forma correcta.

En el contexto de las ETC puede expresarse como **límite de detección** o **límite de cuantificación**:

Límite de detección (LOD): Es la **concentración** mínima del marcador diana que puede detectarse con una probabilidad del 95%.

En el equipo con código HBVDNAQT.CE, el **LOD** se determinó probando diluciones en serie de la curva estándar con concentración límite que se prepararon en plasma negativo para VHB.

Se realizó una extracción y amplificación de cada dilución. Se evaluó un total de 24 réplicas (una de cada dilución) en tres series distintas.

Los resultados se analizaron con la versión 1.63 del programa PriProbit para obtener la **concentración de ADN del VHB detectada con una probabilidad del 95%**. Como el equipo HBVDNAQT.CE se puede utilizar con instrumentos diferentes, definimos el LOD correspondiente a cada uno de ellos. Los valores se muestran a continuación:

Límite de detección (LOD)	
ABI™ PRISM® 7500 SDS	10 UI/ml
(Stratagene™) MX3000P®	30 UI/ml

S.1.1 Rango dinámico y linealidad

El **límite de cuantificación** se determina en función de la **linealidad** o el **rango dinámico**.

La **linealidad** indica la medida en que una curva estándar se aproxima a la línea recta y está representada por un valor de **pendiente**.

El **rango dinámico** es el intervalo de concentraciones de los puntos estándar en el que el valor de salida final (ciclo umbral Ct) del sistema es directamente proporcional a la concentración de cada uno de ellos.

Los límites del rango de medición son los límites inferior y superior de cuantificación (**límite de cuantificación**).

Para determinar la linealidad (medición analítica), en el equipo con código HBVDNAQT.CE se analizaron diferentes concentraciones de la curva estándar con valores de entre 2,0 E+08 UI/µl y 6.24E-0.2 UI/µl

en tres réplicas. Las series de dilución se calibraron según la 2ª Norma Internacional para el virus de la Hepatitis B de la OMS (código 97/750). En la tabla 1 de proporcionan los datos de cada instrumento:

Tab 1

Límite de cuantificación (medición analítica)		
instrumento	superior	inferior
ABI™ PRISM® 7500 SDS	2,0+08 UI/μl	2,5 E-0,1 UI/μl
(Stratagene™) MX3000P®	2,0+08 UI/μl	2,5 E-0,1 UI/μl

Asimismo, en la determinación de los límites superior e inferior de cuantificación se tuvo en cuenta la fase de purificación con el equipo QIAamp Ultrasense virus. Primero se prepararon puntos de dilución en serie de la curva estándar en un grupo de muestras de plasma negativas con valores de 2,0 E+07 UI/ml a 5,0 E+01 UI/ml; cada dilución se analizó con dos lotes. En segundo lugar se analizó el panel de cuantificación de ADN del VHB (Acrometrix) de la misma forma.

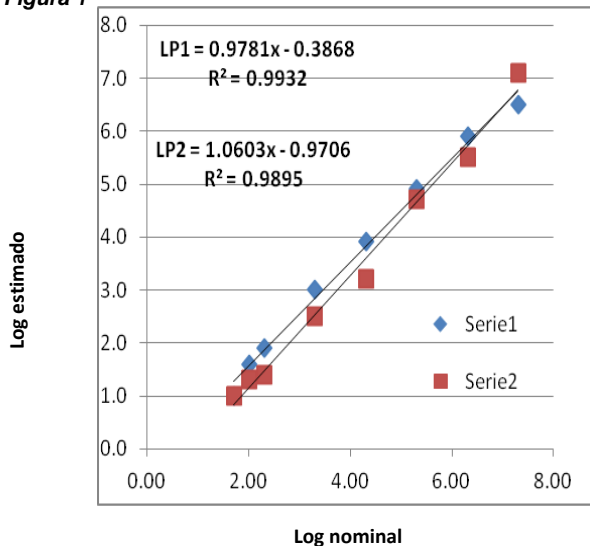
Los límites de cuantificación se indican en la tabla 2:

Tab 2

Límite de cuantificación		
Instrumento	Límite superior	Límite inferior
ABI™ PRISM® 7500 SDS	2,0+07 UI/ml	5,0 E+01 UI/ml
(Stratagene™) MX3000P®		

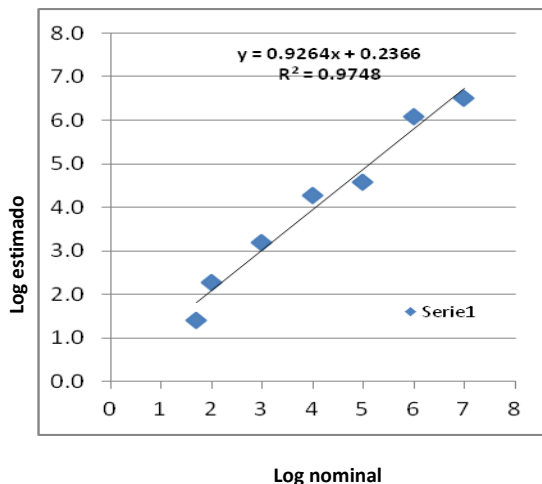
La figura 1 siguiente está relacionada con el instrumento ABI 7500SDS y la curva estándar de la muestra de plasma negativa:

Figura 1



La figura 2 siguiente hace referencia al instrumento Mx3000P y al panel de cuantificación de ADN del VHB (Acrometrix).

Figura 2



El coeficiente R² muestra una buena correlación. Con el otro instrumento se obtuvo un resultado similar.

El **límite superior de cuantificación para muestras positivas** es 7,3 log (2,0+07 UI/ml), mientras que el límite inferior es 1,69 log (5,0+01 UI/ml).

S.2 ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

La especificidad analítica es la capacidad de un método de detectar y cuantificar solo el marcador diana.

La especificidad analítica del ensayo de ADN del VHB se ha estudiado del siguiente modo:

1. El juego de cebador/sonda se ha elegido analizando la secuencia diana del genoma con un software adecuado (Primer Express v.3.0 suministrado por Applied Biosystem Inc.).
2. El juego de cebador/sonda y la secuencia diana del genoma se han controlado mediante el software "BLAST" para comprobar si alguna de las secuencias nucleótidas depositadas en los bancos genómicos mundiales tiene alguna homología con el VHB; también se ha utiliza el software "ClustalX" para comparar las secuencias diana del genoma de los distintos genotipos del VHB.
3. La especificidad se mejoró mediante la selección de condiciones de reacción estrictas.
4. La Fondazione Irccs Cà Granda-Ospedale Ospedale Maggiore Policlinico de Milán, Italia, proporcionó las muestras de plasma de pacientes infectados con organismos potencialmente interferentes que se emplearon.

Los resultados se indican en la tabla siguiente:

Número de muestras	Organismo	Resultado
12	VIH	negativo
10	VHC	negativo
7	CMV	negativo
1	Enterovirus	negativo
1	VZV	negativo
1	HH6	negativo
1	HSV1	negativo
1	HSV2	negativo
1	EBV	negativo

S.3 ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DIAGNÓSTICAS

S.3.1 Especificidad diagnóstica

La especificidad diagnóstica es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado negativo en ausencia del marcador diana. Así, la muestra **negativa verdadera** es una muestra conocida como negativa para el marcador diana y clasificada correctamente por el dispositivo.

NEGATIVOS VERDADEROS	100
FALSOS POSITIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	100
ESPECIFICIDAD %	100

De acuerdo con los resultados obtenidos, la **especificidad diagnóstica de HBVDNAQT.CE es del 100%**, por lo que el sistema cumple los criterios de aceptación ($\geq 99,5\%$).

S.3.2 Sensibilidad diagnóstica

La **sensibilidad diagnóstica** es la probabilidad de que el dispositivo dé un resultado positivo en presencia del marcador diana. Así, la muestra **positiva verdadera** es una muestra conocida como positiva para el marcador diana y clasificada correctamente por el dispositivo. En el equipo con código HBVDNAQT.CE, las muestras de plasma positivas para ADN del VHB suministradas por la Fondazione Irccs Cà Granda-Ospedale Ospedale Maggiore Policlinico de Milán, Italia, se

analizaron en la misma serie y luego se calculó el porcentaje (%) de muestras positivas con el fin de estudiar este parámetro. Las muestras positivas dieron un resultado positivo con el equipo utilizado (**Abbott Real Time HBV**) en el laboratorio que las suministró.

Muestras positivas de ADN del VHB

POSITIVOS VERDADEROS	100
FALSOS NEGATIVOS	0
TOTAL MUESTRAS	100
SENSIBILIDAD %	100

Asimismo, se comprobó la sensibilidad diagnóstica del ensayo mediante el uso del panel QCMD (HBVDNA08, HBVDNA10A, HBVDNA11A) por duplicado en series diferentes. Se obtuvieron los resultados previstos.

Tomando como base los resultados obtenidos, la sensibilidad diagnóstica del sistema se ha calculado en el 100%.

Sensibilidad diagnóstica	100 %
Especificidad diagnóstica	≥99.5 %

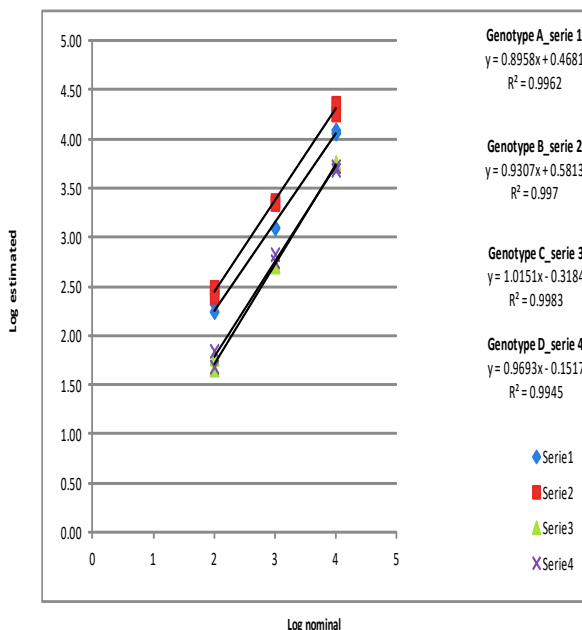
T. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GENOTIPO DEL VHB

La detección de genotipos y la eficacia de cuantificación del equipo con código HBVDNAQT.CE se determinó de acuerdo con las ETC. Para realizar el análisis se comprobaron los genotipos incluidos en los paneles de genotipificación QCMD 2010 (HBVGT10) y 2011 (HBVGT11).

El equipo con código HBVDNAQT.CE es capaz de detectar todos los genotipos incluidos en los paneles, excepto el **genotipo H** (la detección fue menos eficiente de lo esperado).

También se evaluó la dilución de los genotipos pertinentes (A, B, C y D) de 10000 copias/ml (4000 IU/ml) a 100 copias/ml (40 IU/ml) del equipo con código HBVDNAQT.CE.

En el gráfico se muestra el análisis de regresión con los resultados.



Como se muestra, el coeficiente de correlación está comprendido entre 0,994 y 0,998.

U. PRECISIÓN

La precisión muestra el grado de fiabilidad del sistema. Cada procedimiento de medición tiene una variación aleatoria inherente denominada "error aleatorio". El error aleatorio no tiene un valor

numérico, sino que se determina por dispersión de la medición como desviación estándar (DevST) y variación de coeficiente (CV%). Normalmente, la precisión de un ensayo se refiere a la concordancia entre mediciones repetidas del mismo material.

En el equipo con código HBVDNAQT.CE, la **precisión** se expresó como variabilidad intraensayo y variabilidad interensayo. Los 5 puntos de la curva estándar se comprobaron en 8 réplicas de cada uno en la misma serie (intraensayo) y en tres series distintas (interensayo). A continuación, se calcularon la variabilidad intraensayo y la variabilidad interensayo.

En ausencia de parámetros establecidos en las ETC de la Directiva IVD europea, hemos identificado el siguiente valor de aceptabilidad para el ADN del VHB:

Variación de coeficiente intraensayo (CV%) ≤ 10%

Variación de coeficiente interensayo (CV%) ≤ 10%

V. LIMITACIONES








1. Uso exclusivo para diagnóstico in vitro.
2. Antes de utilizar este equipo se recomienda leer atentamente y entender las instrucciones.
3. El seguimiento estricto del protocolo es fundamental para obtener unos resultados fiables.
4. Para que los resultados de la prueba sean óptimos, es preciso obtener, almacenar, transportar y manipular las muestras y los reactivos de forma adecuada.
5. El equipo está diseñado para utilizarse solamente con muestras de plasma según nuestras indicaciones.
6. El entorno de laboratorio, el equipo, los instrumentos y los reactivos deben controlarse mediante buenas prácticas de laboratorio para evitar la contaminación durante todas las fases, desde la extracción hasta la amplificación. La contaminación cruzada durante el procesamiento de muestras con alto número de copias de ADN puede generar un resultado positivo de bajo nivel. En cualquier caso, se necesita un incremento de 1 log para que surta efecto en el tratamiento del paciente según las pautas de tratamiento.
7. Además, según estas pautas, deben producirse dos mediciones altas consecutivas antes de cambiar el tratamiento del paciente.
8. Aplicar un flujo de trabajo con dispensación exacta de las muestras/reactivos y ajuste adecuado del termociclador.
9. Tener cuidado al introducir la concentración de los puntos estándar durante la preparación del ensayo. Es aconsejable expresar las concentraciones en UI/μl como se indica en el apartado I.
10. Los resultados positivos tienen amplias repercusiones médicas, sociales, psicológicas y económicas.
11. Se recomienda considerar la confidencialidad, el asesoramiento y la evaluación médica apropiados un aspecto esencial de la secuencia de prueba.

Z. BIBLIOGRAFÍA

1. The new EASL guidelines for the management of chronic hepatitis B infection adapted for Swiss physicians. *Florian Bihl, Mahnaz Alaei, Francesco Negro*. Swiss med wkly 2010 ;140(11-12)154-159
2. DNA-guided hepatitis B treatment, viral load is essential, but not sufficient. *Rafael Bárcena Marugán, Silvia Garcia Garzon*. World J Gastroenterology 2009;28:15(4):423-430
3. Ruolo degli acidi nucleici e marcatori immunologici nella diagnosi e gestione del portatore cronico di virus epatitici maggiori (B,C,D). *Ferruccio Bonino, Maurizia Rossana*. Ligand assay 11 (4) 2006:319-32M
4. Real time-PCR HBV-DNA Analysis: Significance and first experience in armed forces. *Col GS Chopra, sm*, Lt Col PK Gupta+, Col AC Anand, vsm#, Col PP Varma, vsm**, Col V Nair, vsm++Lt Gen Ramji rai, avsm, vsm, phs#*. MJAFI 2005;65:234-237
5. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real time fluorescence PCR assay. *R.Jardi, F.Rodriguez, M.Buti, X. Costa, M.Cotrino, A.valdes, R.Galimany, R.Esteban and J.Guardia*. Journal of Viral hepatitis 2001,8,465-471
6. Treatment of chronic hepatitis B: recommendations from an Italian workshop. *Carosi G., Rizzetto M*. Gig Liver Dis. 2008;40:603-317
7. Efficacy of lamivudine in patient with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Tassopoulos NC, Volpes R., Pastore G., Heathcote J., Buti M., Goldin RD,*

- Hawley S., Barber J., Condreay L., Gray DF: Hepatology 1999;29:889-896
8. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. Ganem D, Prince AM, N Engl J Med 2004;350-1118-1129
 9. Viral determinas and host immune response in pathogenesis of HBV infection. Rapicetta M, Ferrari C, Levrero M. J Med Virol 2002;67:454-457
 10. World-wide epidemiology of HbeAg negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variant. Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS. J Viral Hepat. 2002;9:52-61
 11. Hepatitis B virus concentrations in serum determined by sensitive quantitative assays in patients with established chronic hepatitis delta virus infection. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Yamashiro T, Maeshiro T, Kinjo F, Saito A, Zukeran H. J Med Virol. 2001 Nov;65(3):478-84.
 12. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system. Keith R. Loeb, Keith R. Jerome, James Goddard, Meei-Li Huang, Anne Cent, Lawrence Corey. Hepatology:2000;32:3:626-629
 13. Sensitive and accurate quantitation of hepatitis B virus DNA using a kinetic fluorescence detection system (TaqMan PCR). Klaus M. Weinberger, Elisabeth Wiedenmann, Stephan Bohm, Wolfgang Jilg. Journal of Virological Methods 2000;85:75-82
 14. Real-Time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus Genotype A to G. Tania M. Wezel, Wendell J. Miley, Thomas L. parks, James J. Goedert, Denise Whitby, Betty A.Ortiz-Conde. Journal fo Clinical Microbiology 2006;44:3325-3333

Z.1 SÍMBOLOS

LEYENDA			
REF	Código del producto		Temperatura de almacenamiento
IVD	Dispositivo para diagnóstico in vitro		Consultar las instrucciones de uso
LOT	N.º de lote		Fabricante
	Fecha de caducidad		Número de pruebas
	Marca de conformidad CE		Fecha de fabricación

Todos los productos de diagnóstico in vitro fabricados por la empresa son controlados por un sistema certificado de control de calidad aprobado por un organismo notificado para el mercado CE. Cada lote se somete a un control de calidad y se libera al mercado únicamente si se ajusta a las especificaciones técnicas y criterios de aceptación de la CE.

