

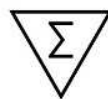
eurobio

SCIENTIFIC

EurobioPlex

HDV qRT-PCR

REF EBX-004



24/48/96 réactions



Français/English/Deutsch

(p 2-19)

(p20-37)

(p38-55)




EurobioPlex

HDV qRT-PCR

Pour la RT-PCR **qualitative et quantitative** en temps réel.

REF EBX-004

 24/48/96 réactions

IVD  0459

Version 2.03 du 25/11/2019

Validé sur :

- **CFX96™ Real Time PCR detection system (Biorad)**
- **Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)**
Pour toute utilisation d'un autre équipement, les résultats ne sont pas garantis

Conditions de stockage:

Conserver tous les réactifs entre -15°C et -22°C jusqu'à utilisation et après première utilisation, sauf **les standards HDV et le RC contrôle qui doivent être conservés entre -75°C et -85°C**



Mode d'emploi

UTILISATION

Le kit Eurobioplex HDV est un kit d'amplification par RT-PCR en temps réel de l'ARN du virus de l'hépatite Delta (HDV) conçu pour la détection qualitative et/ou quantitative de la présence ou de l'absence du virus de l'hépatite delta (HDV) à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum. Le test est indiqué pour déterminer le niveau de la charge virale chez les patients au cours de l'histoire naturelle de la maladie ou sous traitement, et le caractère répliatif ou non de l'infection Delta. Il cible particulièrement les patients infectés par le virus de l'hépatite B. Le test n'est pas destiné au dépistage en banque ou d'organes pour le virus HDV.

INTRODUCTION

L'hépatite D est une infection causée par le virus de l'hépatite Delta (HDV), découvert à la fin des années 70 par Mario Rizzetto. L'HDV est un virus satellite du virus de l'hépatite B (HBV). Il est composé d'un ARN simple brin circulaire, pseudo-double brins, entouré par les deux protéines delta (la petite ou p24 et la grande ou p27), formant la ribonucléoprotéine delta qui est enveloppée par les protéines d'enveloppe de l'HBV ou AgHBs. De ce fait, le virus HDV ne peut infecter que les individus étant infectés de façon chronique par l'HBV.

On distingue la surinfection Delta souvent sévère, survenant chez un patient déjà infecté de façon chronique par l'HBV, de la coïnfection aiguë simultanée par les deux virus, cette dernière forme étant moins grave. Cependant l'HDV est considéré comme le virus responsable de la maladie hépatique la plus grave, responsable de formes fulminantes aiguës et de formes chroniques entraînant une évolution plus rapide vers la cirrhose et l'hépatocarcinome cellulaire que lors de la mono infection HBV.

On estime à environ 10 à 15 millions dans le monde le nombre d'individus infectés par l'HDV. L'HDV est caractérisé par une très grande variabilité génétique. Huit génotypes majeurs (de 1 à 8) ont été décrits avec une répartition géographique caractéristique : le génotype 1 (HDV-1) est ubiquitaire et est le plus fréquemment retrouvé ; HDV-2 et -4 sont retrouvés en Asie ; HDV-3, au nord de l'Amérique du Sud et HDV-5 à -8 en Afrique Subsaharienne. Cependant du fait des migrations de populations, ces différents génotypes peuvent être retrouvés dans de nombreux autres pays.

Contrairement à l'HBV, l'HDV ne possède pas d'enzyme spécifique pour la réplication de son génome, rendant ainsi plus difficile une stratégie thérapeutique efficace contre cette infection. Celle-ci repose actuellement uniquement sur l'utilisation de l'interféron alpha standard à forte dose et surtout sous sa forme pégylée. Actuellement de nouvelles drogues spécifiques anti HDV, notamment les inhibiteurs d'entrée et de la farnésylation (étape clé du cycle viral) sont en cours de développement.

Si le diagnostic de l'infection HDV repose sur la détection des anticorps anti delta, la réplication virale et le suivi de l'évolution naturelle de l'infection ou suite à un traitement antiviral, repose sur la détection et la quantification de la charge virale ARN par la technique de RT-PCR en temps réel dans le sang des patients infectés.

PRINCIPE DE LA DETECTION

Le test *Eurobioplex Hépatite D* est un test d'amplification de l'ARN du virus HDV, ainsi que d'un contrôle ARN d'extraction et d'inhibition, par RT-PCR en temps réel en une seule étape. Le contrôle interne ARN (RC) permet le contrôle de toutes les étapes de la phase d'extraction des ARN à partir des échantillons sanguins (sérum ou plasma) jusqu'à la phase d'amplification par PCR en temps réel, permettant ainsi la mise en évidence éventuelle d'inhibiteurs de PCR ou d'un problème technique.

Le test est réalisé à partir de l'ARN extrait de l'échantillon au moyen d'une réaction unique dans un seul puits/tube. Le virus HDV est détecté à l'aide d'une sonde marquée FAM et le contrôle d'extraction et d'inhibition de PCR est détecté à l'aide d'une sonde marquée HEX. Ces marqueurs émettent une fluorescence spécifique suite à leur hydrolyse au cours de l'élongation du produit d'amplification. La mesure des intensités de fluorescence en temps réel est proportionnelle à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

Ce système d'amplification a été validé sur un ARN standard comportant un insert spécifique du virus HDV (Contrôle positif HDV-QS), ainsi que sur l'étalon international du Paul Erlich Institute (1st WHO international standard for HD virus RNA for NAT testing WHO IS PEI: PEI code 7657/12) et sur un contrôle interne ARN (RC).

DESCRIPTION ET CONTENU DU KIT

Le kit de PCR en Temps réel Hépatite D est prêt à l'emploi pour la détection et quantification spécifique de l'ARN de ce virus. Le kit contient les réactifs et les enzymes nécessaires à l'amplification de l'ARN viral de l'hépatite D, et du contrôle interne ARN (RC) par RT-PCR (tableau 1). La fluorescence est émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR. La détection des fragments amplifiés est réalisée par un fluorimètre en utilisant les canaux indiqués dans le tableau 2:

Tableau 1 : Note : bien centrifuger les tubes avant utilisation

Composé	Tubes -96 réactions	Tubes -48 réactions	Tubes -24 réactions	Description	Conservation
RC	4 tubes (blancs) de 580 µL	2 tubes (blancs) de 580 µL	1 tube (blanc) de 580 µL	Contrôle interne ARN (500 copies/µl) à ajouter au tampon de lyse pour extraction robotisée ou manuelle : 10µL/échantillon pour une élution dans 70 µL (<u>attention</u> : respecter cette proportion suivant le volume d'élution)	[-75°C; -85°C] (ne pas redécongeler)
Amorces/sondes (Oligomix)	4 tubes (oranges) de	2 tubes (oranges) de	1 tube (orange) de	Amorces et sondes	[-15°C; -22°C]


Composé	Tubes -96 réactions	Tubes -48 réactions	Tubes -24 réactions	Description	Conservation
	35 µL	35 µL	35 µL	pour HDV et RC	
HDV-QS (1)	5 tubes (transparentes) de 1 standard de 20 µL	3 tubes (transparentes) de 1 standard de 20 µL	2 tubes (transparentes) de 1 standard de 20 µL	Tube de standard pour quantification avec 1 quantité de matrice synthétique HDV RNA (1.10 ⁷ copies/ 10 µL et 1 quantité de RC (100 copies/µL)	[-75°C; -85°C] (ne pas redécongeler)
Eau biologie moléculaire (CN-H2O)	4 tubes (bleus) de 1.5 mL	2 tubes (bleus) de 1.5 mL	1 tubes (bleu) de 1.5 mL	Eau PCR	[-15°C; -22°C]
Reaction Mix (Enzyme)	4 tubes (rouges) de 370 µL	2 tubes (rouges) de 370 µL	1 tube (rouge) de 370 µL	2x Reaction Mix contenant Taq polymérase, 6 mM Mg-chlorure et dNTPs	[-15°C; -22°C]
Reverse transcriptase (RT)	2 tubes (transparentes) de 13 µL	1 tube (transparent) de 13 µL	1 tube (transparent) de 7 µL	Enzyme Reverse transcriptase	[-15°C; -22°C]
	1	1	1	Mode d'emploi	

Tableau 2 :

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
HDV	FAM	495 nm	520 nm
RNA Contrôle (RC)	HEX	538 nm	555 nm

Pour toute utilisation d'un autre équipement que CFX96™ real-time PCR detection system ou Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System, les résultats ne sont pas garantis
 Alternatives: - Canal **HEX** -> Canal VIC (Systèmes Applied Biosystems ® 7500 Real-Time PCR System, CFX96™ real-time PCR detection system)

Matériel nécessaire non fourni:

- ◇ Hotte biologique
- ◇ Appareil de qPCR CFX96™ real-time PCR detection system ou Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System
- ◇ Centrifugeuse pour microtubes
- ◇ Vortex
- ◇ Plaques / tubes pour réaction de qPCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ Embouts stériles à filtres pour micropipettes
- ◇ Microtubes stériles
- ◇ Gants

CONSERVATION

Tous les réactifs doivent être stockés en accord avec le tableau 1. Une fois préparés les ARN doivent être stockés à -80°C.

Tous les réactifs peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.

Plusieurs cycles de congélation / décongélation (> 3x pour les réactifs entre -15°C et -22°C) doivent être évités, cela pourrait réduire la sensibilité de l'analyse. Ne pas recongeler les réactifs à -75°C ; -85°C.

Conserver tous les réactifs au frais pendant l'expérimentation.

PRECAUTIONS ET NOTES

Lire attentivement ces instructions avant de débiter la procédure.

- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée par du personnel compétent.
- ◇ S'assurer que les instruments ont été installés, calibrés et maintenus en accord avec les recommandations du fabricant
- ◇ Les échantillons cliniques doivent être considérés comme du matériel potentiellement infectieux et doivent être préparés sous une hotte à flux laminaire.
- ◇ Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- ◇ Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée.
- ◇ Eviter les cycles de congélation / décongélation des réactifs, cela peut conduire à une baisse de la sensibilité du test.
- ◇ Une fois les réactifs décongelés, centrifuger brièvement les tubes avant leur utilisation.
- ◇ Définir trois zones de travail distincts : 1) Isolation de l'ARN, 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- ◇ Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces deux zones.
- ◇ Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels. L'utilisation de gants est obligatoire. Des méthodes appropriées de préparation d'ARN pour transcrits cDNA doivent être utilisées.
- ◇ Utiliser toujours des embouts stériles à filtre pour micropipettes.
- ◇ Porter des blouses et des gants distincts dans chaque zone de travail.
- ◇ Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- ◇ Eviter les aérosols.

COLLECTION DES ECHANTILLONS, TRANSPORT ET CONSERVATION

- ◇ Collecter les échantillons dans des tubes stériles contenant l'anticoagulant EDTA pour préparer du plasma ou sans anticoagulant pour du sérum. **L'héparine n'est pas utilisable à cause de ses effets inhibiteurs sur la PCR.**
- ◇ Les échantillons doivent être préparés et extraits immédiatement, ou conservés à +4°C au maximum 6h. Pour préparer le plasma ou le sérum (une fois le sang coagulé), centrifuger le sang 20 minutes à 800 - 1600 g et transférer le plasma ou sérum obtenu dans des tubes stériles. Si les délais sont plus long seuls les plasmas et/ou sérums peuvent être congelés de -20°C (1 semaine maximum) à -80°C (conseillé si conservés au-delà d'une semaine).
- ◇ Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux. Le sang humain doit toujours être considéré comme infectieux et les procédures de protection adéquates doivent être employées.

Effets de paramètres biochimiques: de très fortes concentrations en lipides (9 g/dL) ou bilirubine (110 g/L) n'affectent pas les résultats.

PROCEDURE

I-Extraction d'ARN

Des kits d'extraction d'ARN sont disponibles chez plusieurs fabricants. Vous pouvez utiliser votre propre système d'extraction ou un système commercial adapté en se référant aux instructions du fabricant. Mais les correspondances entre nombre de copies/microl et unités internationales (UI/mL) n'ont été établies que pour le système suivant :

Système extraction automatisé m2000sp Abbott Plasma vol: 500 µL Elution vol: 110 µL PCR sample vol: 10 µL

Le RC (lu sur le canal HEX) ajouté au moment de l'extraction permet de s'assurer qu'un résultat négatif HDV ne peut être dû à un problème d'extraction ou la présence d'inhibiteurs de RT-PCR pour valider le test. La solution de RC est à une concentration de 5000 copies/10 µl.

Nous recommandons l'ajout de 10 µl de stock RC par échantillon à extraire pour un volume d'élution d'environ 70 µl à la fin de l'extraction. Il est possible de rajouter RC au tampon de lyse d'une extraction automatisée afin qu'il soit distribué par le robot (l'équivalent de 16 µL à 500 µL d'échantillon pour un volume d'élution dans 110 µL par exemple pour le système d'extraction automatisé m2000sp, cf. ci-dessus

II- Réalisation de la qRT-PCR

Préparer le Mélange réactionnel comme suit avec un excédent en considérant le nombre de test Nx120%.

	Vol en microl (1 test)
Reaction Mix (Enzyme)	12,5
Reverse Transcriptase (RT)	0,2
Amorces/sondes (Oligomix)	1
Eau (CN-H2O)	1,3

Pour contrôler le bon fonctionnement de la PCR et des étapes d'extraction et d'amplification de RT-PCR en temps réel, il est nécessaire de tester :

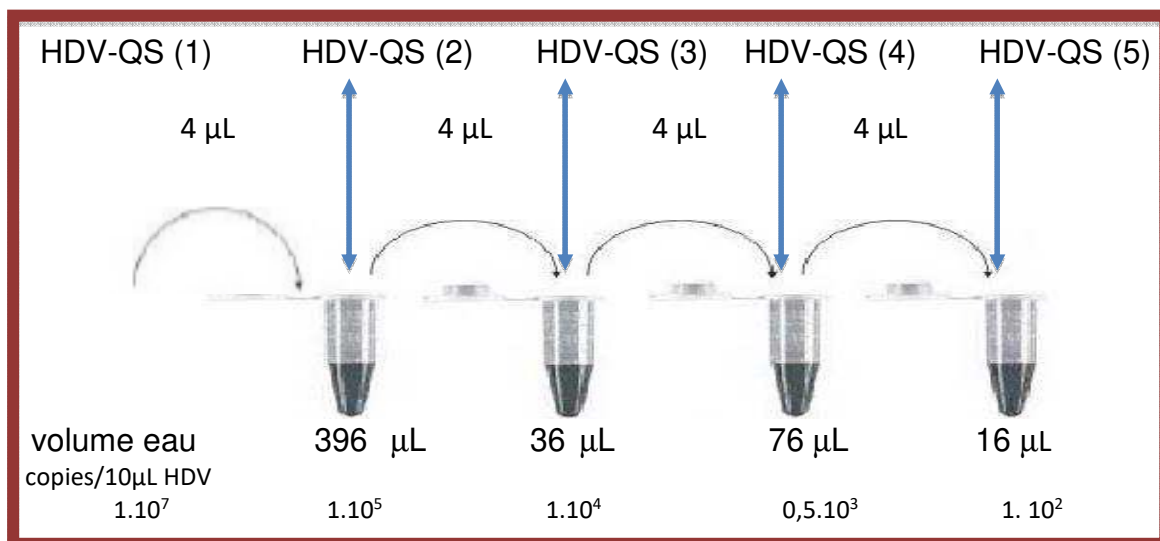
Pour **une analyse qualitative** :

- un contrôle positif hépatite D (CP) : 10 µL de standard HDV-QS
- un contrôle négatif (CN) : 10 µL d'eau PCR
- un contrôle d'extraction et d'amplification par RT-PCR (RC) : 10 µL ayant été rajoutés à chaque échantillon avant extraction (pour une élution de 70 µl).
- un contrôle positif RC (CP-RC) : 1,43 µL RC+ 8,57 µL d'eau PCR

Remarque : Le contrôle positif HDV-QS contient une concentration élevée de matrice. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.

Pour **une analyse quantitative** :

En plus des contrôles pour l'analyse qualitative, il est nécessaire de préparer 4 dilutions en plus du tube standard de HDV-QS fourni. L'eau fournie doit être utilisée comme diluant. Prendre le contrôle positif HDV-QS (10^7 copies/10µL) comme le standard le plus élevé dans le premier tube. Respectivement, pipeter 396 µL d'eau stérile dans le tube 1, 36 µL dans le tube 2, 76 µL dans le tube 3, 16 µL dans le tube 4 et réaliser 4 dilutions comme suit :



Pour générer une courbe standard sur un système de PCR en temps réel, les 5 concentrations de standards doivent être utilisées et définies comme standard pour HDV en spécifiant le nombre de copies/réaction correspondant ou l'équivalent en unité internationale (UI).

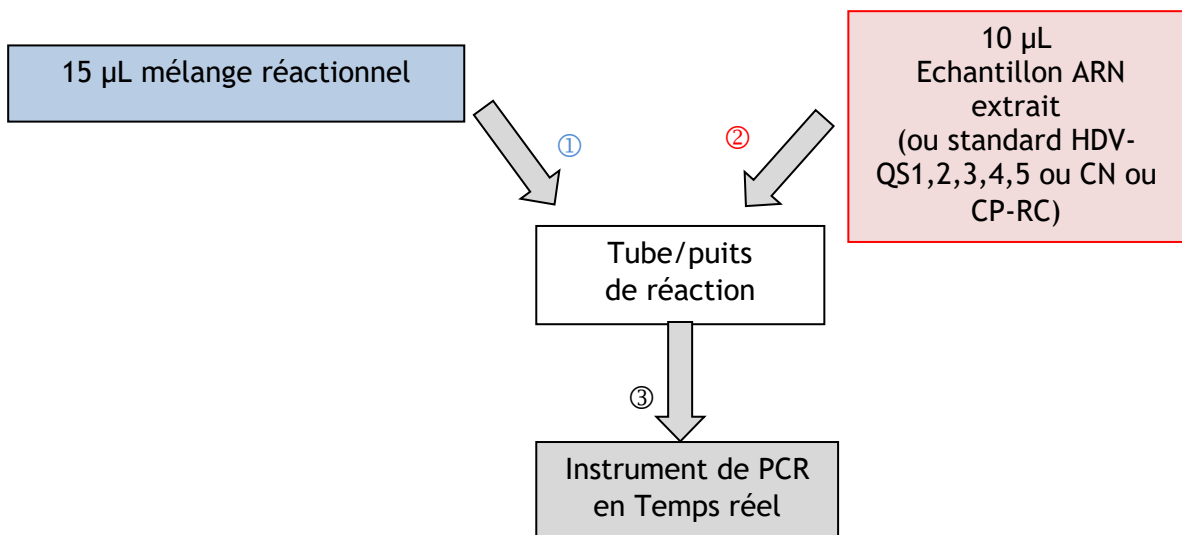
Exemple de plan de plaque pour une analyse quantitative

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HDV-QS1	Ech. 2										
B	HDV-QS2											
C	HDV-QS3											
D	HDV-QS4											
E	HDV-QS5											
F	CN											
G	CP-RC											
H	Ech. 1											

Ech. : Echantillon inconnu d'ARN ; HDV-QS: contrôle positif/standard virus hépatite D; CN : contrôle négatif (eau) ; CP-RC : contrôle positif RC

Protocole de qRT-PCR

- 1) Homogénéiser le Mélange réactionnel et centrifuger brièvement.
- 2) Distribuer les solutions selon le schéma ci-dessous



- 3) Fermer immédiatement avec un film adhésif ou des bouchons dédiés à la PCR en temps réel pour éviter toute contamination.
- 4) Centrifuger brièvement pour collecter le liquide au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 5) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de qPCR.

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
	46 °C	30 min	1	-
	95°C	2 min	1	-
Amplification	95°C	15 sec	45	-
	59°C	1 min		Acquisition de fluorescence

Pour toute utilisation d'un autre équipement que CFX96™ real-time PCR detection system ou Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR System, les résultats ne sont pas garantis

Pour générer une courbe standard sur un système de PCR en temps réel, les 5 standards HDV-QS et de l'eau (HDV=0) doivent être utilisés et définis comme standard en spécifiant le nombre de molécules/réaction correspondant.

Renseigner les concentrations des standards de HDV (canal FAM) lors du paramétrage du thermocycleur. Le logiciel affichera une courbe standard et calculera pour les échantillons directement le nombre de molécules par réaction correspondant. En fonction de votre quantité d'ADN ou de ml de liquide biologique introduit (sérum ou plasma), ce nombre de copies pourra être ramené à un nombre de copies/μg d'ADN ou copies/mL de liquide biologique.

La correspondance entre le nombre de molécules HDV obtenues et l'étalon international a été validé pour le système d'extraction d'ARN automatisé m2000sp Abbott (voir tableau ci-dessous), ce qui permet de renseigner directement sur le thermocycleur le nombre d'UI/ml et ainsi obtenir directement le résultat des patients en UI/mL de sérum ou plasma. Il existe une légère surestimation de la charge virale pour les échantillons sériques par rapport au plasma.

HDV-QS molécules/ 10 microlitres	Système extraction automatisé m2000sp Abbott Plasma vol: 500 μL Elution vol: 110 μL PCR sample vol: 10 μL
	Equivalence UI/ml
1E+07	3,40E+08
1E+05	3,40E+06
1E+04	3,40E+05
5E+02	1,70E+04
1E+02	3,40E+03

VALIDATION DE L'EXPERIMENTATION

Analyse qualitative :

- Contrôle négatif (CN) : aucune amplification visible sur le canal FAM. Sur le canal HEX, aucune amplification mais il est possible de visualiser un faible signal de fluorescence. Dans ce cas la barre de seuil doit être positionnée juste au-dessus du maximum de signal du contrôle négatif.
- Contrôle positif HDV-QS 1 (CP) : signal de PCR sur le canal FAM à 15,8 Ct (+/- 3Ct)
- La valeur de Ct sur le canal HEX du contrôle positif RC doit être ≤ 38 .

Analyse quantitative :

- Contrôle négatif (CN) : aucune amplification visible sur le canal FAM. Sur le canal HEX, aucune amplification mais il est possible de visualiser un faible signal de fluorescence. Dans ce cas la barre de seuil doit être positionnée juste au-dessus du maximum de signal du contrôle négatif.
- Valeurs de la gamme de quantification HDV-QS : Les valeurs de Ct des standards sur le canal FAM doivent être +/- 3 Ct des valeurs du tableau ci-dessous.

HDV-QS molécules/10 microlitres	C(t) FAM
1E+07	15,8
1E+05	21,8
1E+04	24,8
0,5E+03	29,8
1E+02	31,5

- La valeur de Ct sur le canal HEX du contrôle positif RC doit être ≤ 38 .
- L'efficacité de PCR sur le canal FAM doit être supérieure à 90% (équivalent à une « Pente » $> -3,6$)

ANALYSE DES DONNEES ET INTERPRETATION

Analyse du Contrôle interne RC dans les échantillons :

Si RC a été utilisé selon les recommandations de la fiche technique, la valeur de Ct pour le **RC devrait être ≤ 38** .

Deux résultats peuvent être obtenus pour RC :

1/ le test du contrôle RC est positif $Ct \leq 38$: l'ARN a été correctement extrait, et il n'y a pas d'inhibiteurs de RT-PCR. Le résultat peut être validé.

2/ le test du contrôle RC est négatif ou $Ct > 38$: soit l'ARN n'a pas été correctement extrait, soit la RT n'a pas bien fonctionné, soit la présence d'inhibiteurs de PCR inhibe la réaction de PCR. Il est alors recommandé de répéter l'extraction ou de diluer l'échantillon.

(Remarque : si le RC n'a pas été utilisé, aucun signal sur le canal HEX n'est attendu).

Analyse Qualitative pour HDV :

Positif (+) : est pour Ct \leq 45 (exemple courbe a)

Négatif (-) : est pour Ct > 45 (exemple courbe c)

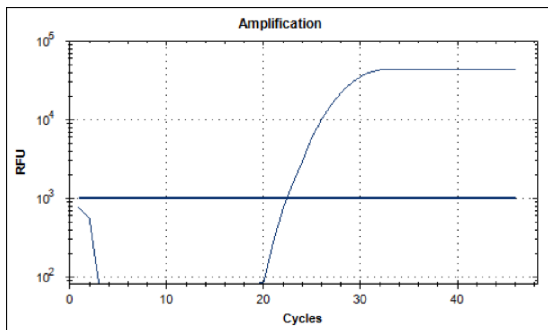
Analyse Quantitative pour HDV :

Positif (+) : est pour Ct \leq 35 (exemple courbe a)

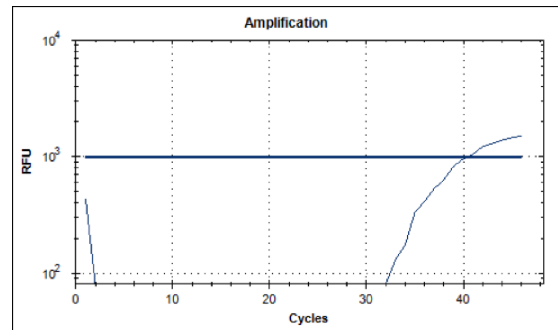
Positif non quantifiable (PNQ): est pour $45 \geq$ Ct >35 => Signe d'une répllication virale très faible inférieure au seuil bas de quantification du test (exemple courbe b)

Négatif (-) : est pour Ct > 45 (exemple courbe c)

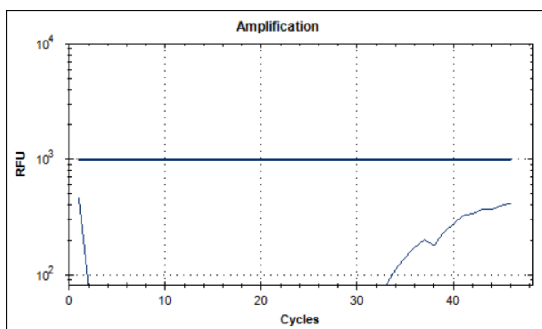
Courbe a : POSITIF



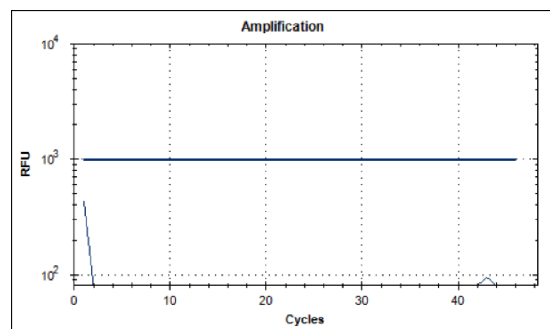
Courbe b : POSITIF FAIBLE non quantifiable (PNQ)



Courbe c : NEGATIF



Ou



En résumé :

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :

RC Ct valide : $Ct \leq 38$

RC Ct non valide : $Ct > 38$

En fonction de la valeur de Ct du RC, les résultats HDV sont utilisables ou non selon que l'analyse est qualitative ou quantitative

Signal PCR		Analyse Qualitative	Analyse Quantitative	Validité du test/commentaire
HDV (FAM)	RC (HEX)	Présence du virus HDV	Quantification possible	
+ $Ct \leq 35$	Ct valide	Oui : Echantillon positif	Oui	Valide pour analyse qualitative et quantitative
+ $45 \geq Ct > 35$	Ct valide	Oui : Echantillon positif	Non : Echantillon PNQ	Valide pour analyse qualitative mais pas quantitative
+ $Ct \leq 35$	Ct non valide	Oui : Echantillon positif	Non	Valide pour analyse qualitative mais pas quantitative *Possible inhibition d'extraction ou de RT-PCR qui empêche la validation de la quantification du HDV
+ $45 \geq Ct > 35$	Ct non valide	Oui : Echantillon positif	Non	Valide pour analyse qualitative mais pas quantitative *Possible inhibition d'extraction ou de RT-PCR qui empêche la validation de la quantification du HDV
- $Ct > 45$	Ct valide	Non : Echantillon négatif	Non : Echantillon négatif	Valide pour analyse qualitative. L'échantillon étant négatif, pas d'analyse quantitative
- $Ct > 45$	Ct non valide	Non interprétable	Non interprétable	Non valide : ni pour analyse qualitative, ni quantitative *Possible inhibition d'extraction ou de RT-PCR

PNQ : faible positif non quantifiable

* Si l'information souhaitée n'est pas obtenue, il est conseillé de diluer 5x l'échantillon ; si le même résultat est obtenu, ré-extraire l'échantillon

ANALYSE DE PERFORMANCES

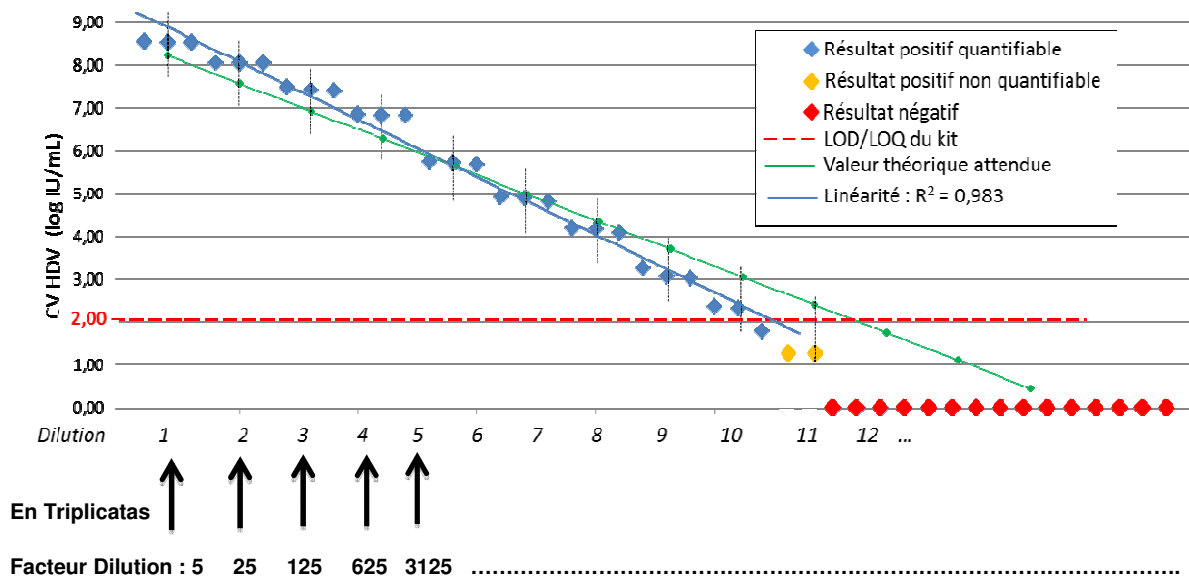
Toutes les expériences ont été réalisées sur thermocycleur CFX96™ real time PCR system (Biorad).

1-Sensibilité analytique et linéarité de quantification:

La sensibilité analytique est définie comme la plus petite quantité de cible qui peut être précisément détectée dans un échantillon. Cette limite de détection analytique en contrepartie de la purification du RNA dans l'échantillon a été déterminée à l'aide d'échantillons cliniques positifs HDV en combinaison avec une méthode d'extraction particulière sur l'automate m2000sp (Abbott Diagnostic avec le kit ARN Abbott Diagnostic suivant le protocole m2000-RNA-Plasma-BA-500-70-V1. Prise d'essai d'échantillon 500 microl et élution dans 110 microl).

La limite de détection est 1^{E+02} IU/ml. L'unité internationale correspond à celle de l'étalon international du Paul Erlich Institute (1st WHO international standard for HD virus RNA for NAT testing WHO IS PEI: PEI code 7657/12).

Sensibilité-Linéarité de quantification : dilutions sériées (1/5^{ème})

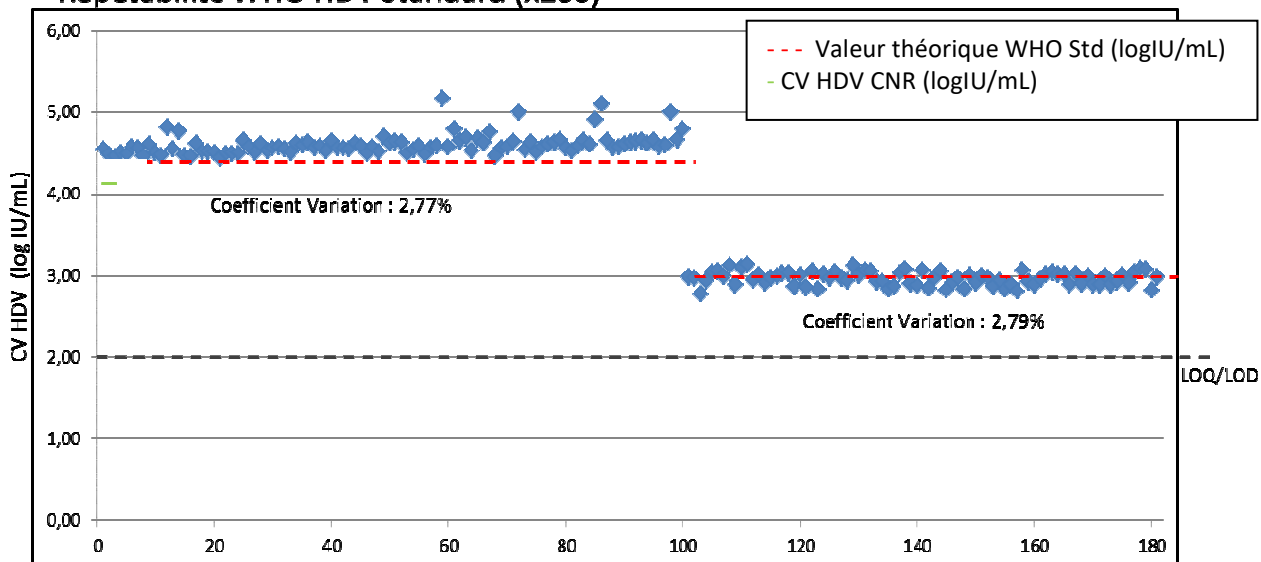


Linéarité de quantification : Le domaine de linéarité de quantification validé est de 1^{E+02} IU/ml à $1^{E+8,3}$ IU/ml sur échantillon clinique.

2- Reproductibilité intra expérience et inter expérience:

N=100 réplicat de 2 concentrations de HDV PEI standard international ($1^{E+04,3}$ UI/ml et 1^{E+03} IU/ml) ont été réalisés. Le Coefficient de Variation intra expérience est de 2,8% sur les valeurs en log pour les 2 concentrations.

Répétabilité WHO HDV Standard (x100)



La reproductibilité inter expérience du standard a été analysé sur thermocycleur CFX96™ Real time PCR system (Biorad) (n=110 mesures): la CV moyen est de 3 %.

HDV-QS molecules/10 microlitres	Median C(t)	C(t) Std. Dev	Coefficient de variation inter runs (%) (n=13)
1^{E+07}	15,74	0,69	4,4
1^{E+05}	21,84	0,75	3,4
1^{E+04}	24,84	0,67	2,7
$0,5^{E+03}$	29,79	0,67	2,2
1^{E+02}	31,30	0,81	2,6

3-Spécificité:

***Spécificité analytique sur échantillons virémiques non-HDV**

Des échantillons de plasma négatif HDV (échantillons négatifs pour la détection des Anticorps totaux anti-HDV) mais virémiques pour d'autres virus hépatotropes ont été analysés pour déterminer la spécificité analytique du Kit Eurobioplex HDV, exprimé sous forme d'un résultat négatif en l'absence de la cible. La spécificité analytique a été évaluée par l'analyse de 105 spécimens représentant les pathogènes viraux suivant : VHB (n=75), le VIH (n=10), le VHC (n=10), le VHA (n=5) ou le VHE (n=5).

Sur les 105 échantillons testés aucune fausse positivité n'a été retrouvée avec les kits Eurobioplex HDV.

4-Spécificité et sensibilité:

***Sensibilité aux différents génotypes d'HDV:**

8 génotypes majeurs (HDV-1 à HDV-8) ont été définis selon une divergence nucléotidique au sein du génome de 20 à 35 %⁷⁻⁸. Chaque génotype viral possède une origine et localisation géographique précise. Considérant que le HDV-1 est omniprésent, HDV-2 se trouve au Japon, Taïwan et en Yakoutie (Russie) ; HDV-3 a été observée exclusivement en Amérique du Sud ; HDV-4 à Taïwan et au Japon et HDV-5 à HDV-8 en Afrique sub-saharienne. Du fait des flux migratoires des populations, tous ces génotypes peuvent aujourd'hui être retrouvés également dans différentes zones du globe⁷⁻⁸. La performance de l'Eurobioplex HDV sur les génotypes HDV a donc été évaluée sur 139 échantillons ARN HDV positif représentant tous les génotypes viraux et 12 échantillons ARN HDV négatif au Laboratoire National de référence Français pour HDV (CNR Delta- FNRL, Emmanuel Gordien, PhD.).

Ont été inclus dans cette partie de l'évaluation 33 HDV-1 Afrique ; 61 HDV-1 Europe/Asie ; 1 HDV-2 ; 1 HDV-3 ; 1 HDV-4 (plasmide contenant une copie de génome complet) ; 22 HDV-5 ; 7 HDV-6 ; 10 HDV-7 et 3 HDV-8. Ces 139 échantillons ont été quantifiés par la technique du CNR Delta et le kit Eurobioplex HDV EBX-004.

Les 12 échantillons négatifs ont bien été retrouvés négatifs sur les 2 techniques.

Onze échantillons de très faibles charges virales (proches des seuils de quantification des techniques) ont été détectés par les 2 techniques (n=3) ou par l'une des 2 techniques Eurobioplex HDV (n=5) ou CNR Delta (n=3).

Tous les autres échantillons ont été détectés et quantifiés de façon équivalente par les deux techniques. Un coefficient de corrélation $R^2=0,8$ a été calculé indiquant l'excellente corrélation des résultats entre les 2 techniques quel que soit le génotype viral. La valeur médiane sur l'ensemble de ces échantillons était très proche avec 5,16 logUI/mL pour le CNR Delta versus 5,05 logUI/mL pour Eurobioplex HDV.

***Sensibilité et spécificité Globale**

Au total 610 échantillons ont permis d'évaluer la spécificité et sensibilité clinique/diagnostique.

		Eurobio	
		Pos	Neg
CNR	Pos	389	9*
	Neg	14*	198

*prélèvements avec une charge virale très faible < 3logUI/mL

Spécificité clinique : $198 / (198+14) = 93,4 \%$
Sensibilité clinique : $389 / (389+9) = 97,7 \%$











BIBLIOGRAPHIE

- (1) Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18: 997-1003.
- (2) Brazas R, Ganem D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science* 1996; 274:90-94.
- (3) Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, Hanslik , Alloui C, De'ny P, Gault E. Quantification of Hepatitis Delta Virus RNA in Serum by Consensus Real-Time PCR Indicates Different Patterns of Virological Response to Interferon Therapy in Chronically Infected Patients. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43: 2363–2369.
- (4) Zachou K, Yurdaydin C, Drebber U, Dalekos GN, Erhardt A, Cakaloglu Y, Degertekin H, Gurel S, Zeuzem S, Bozkaya H, Schlaphoff V, Dienes HP, Bock TC, Manns MP, Wedemeyer H; HDT-1 Study Group. Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis. *Liver Int.* 2010; 30:430-437.
- (5) EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. European Association for the Study of the Liver. *J. Hepat.* 2012; 57: 167–185
- (6) Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, Dény P. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1447-1450.
- (7) Chudy M, Development of the 1st International Standard for Hepatitis D Virus RNA –an update. 24th blood virology meeting, Ljubljana, 8-9 May 2013.
- (8) Manesis EK, Schina M, Le Gal F, Agelopoulou O, Papaioannou C, Kalligeros C, Arseniou V, Manolakopoulos S, Hadziyannis ES, Gault E, Koskinas J, Papatheodoridis G, Archimandritis AJ. Quantitative analysis of hepatitis D virus RNA and hepatitis B surface antigen serum levels in chronic delta hepatitis improves treatment monitoring. *Antivir Ther.* 2007;12: 381-388.
- (9) Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut.* 2000 Mar;46(3):420-6.
- (10) Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anaïs P, Drugan T, Trinchet JC, Roulot D, Tamby M, Milinkovitch MC, Dény P. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *J Virol.* 2004 Mar;78(5):2537-44.
- (11) Castelnau C, Le Gal F, Ripault MP, Gordien E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Pham BN, Maylin S, Bedossa P, Dény P, Marcellin P, Gault E. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology.* 2006 Sep;44(3):728-35.
- (12) Brichler S, Le Gal F, Butt A, Chevret S, Gordien E. Commercial real-time reverse transcriptase PCR assays can underestimate or fail to quantify hepatitis delta virus viremia. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jun;11(6):734-40
- (13) Brichler S, Le Gal F, Neri-Pinto F, Mansour W, Roulot D, Laperche S, Gordien E. Serological and molecular diagnosis of hepatitis delta virus infection: results of a French national quality control study. *J Clin Microbiol.* 2014 May;52(5):1694-7.

ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer tous les déchets conformément à la législation sur les DASRI.

SYMBOLES

	Référence
	Numéro de lot
	Limite supérieure de température de conservation
	Date d'expiration
	Contenu suffisant pour « N » réactions
	Conserver à l'abri de la lumière
	Fabricant
	Produit marqué CE par l'organisme notifié LNE GMED
	In vitro Diagnostic
	Mode d'emploi



eurobio
SCIENTIFIC

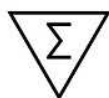
7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
France
+33 1 69 79 64 80



EurobioPlex *HDV qRT-PCR*

For **qualitative and quantitative** real time RT-PCR.

REF EBX-004



24/48/96 reactions



Version 2.03 – 25/11/2019

Validated only on CFX96™ real-time PCR detection system (Biorad) or Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

For any use of other equipment than CFX96 real-time PCR detection system or Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, the results are not guaranteed

Storage conditions: keep all reagents between -15°C and -22°C until use and after first use **except for HDV standards and RC control which must be kept between -75°C an -85°C.**



Instructions for use

INTENDED USE

The HDV Eurobioplex test uses real time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) amplification and is designed for the qualitative and/or quantitative detection of hepatitis delta virus (HDV) from a nucleic acid RNA extract transcribed into cDNA by a reverse transcriptase (RT). The extract can come from plasma or serum of patients. This test is indicated to determine the viral load in patients during the natural history of the disease or treatment, as well as the possible replicative disposition of HDV infection. It especially targets patients infected by hepatitis B virus. The test is not intended for screening of banked blood or organs infected by HDV virus.

INTRODUCTION

Hepatitis D is an infection caused by the hepatitis Delta virus (HDV) which has been discovered at the end of the 70s by Mario Rizzetto. The HDV is a satellite virus of the hepatitis B virus (HBV). The HDV genome consists in a circular single-stranded RNA, pseudo-double strands, surrounded by two delta proteins (small p24 and large p27) forming ribonucleoprotein delta that is wrapped by the HBV envelope proteins or HBsAg. Consequently the HDV virus can only infect individuals being chronically infected with HBV.

HDV infection can manifest as a severe superinfection Delta often occurring in a patient already chronically infected by HBV, or as simultaneous acute co-infection by both viruses, the latter form being less severe. However the HDV is considered to be the virus responsible for the most serious liver disease, which is acute fulminating and chronic forms resulting in a faster progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma than in the mono HBV infection.

Approximately 10-15 million of individuals are infected worldwide by HDV. It is characterized by a very high genetic variability. Eight main genotypes (from 1 to 8) have been described with a characteristic geographical breakdown: the genotype 1 (HDV-1) is ubiquitous and is most frequently found; HDV-2 and -4 are found in Asia; HDV-3 in Northern parts of South America, and HDV-5 to-8 in sub-Saharan Africa. However due to the migration of populations these different genotypes can be found in many other countries.

Unlike HBV, HDV has no specific enzyme for replication of its genome, making an effective therapeutic strategy against this infection more difficult to establish. It is currently based only on the use of interferon alpha at high doses, and especially in its pegylated form. New anti- HDV specific drugs are currently being developed. It includes entry inhibitors and farnesylation inhibitors (key step of the viral cycle).

While the diagnosis of HDV infection is based on the detection of anti-delta antibodies, viral replication and monitoring of natural infection or antiviral treatment is based on the detection and quantification of the viral RNA by the technique of RT-PCR in real time in the blood of infected patients.

PRINCIPLE OF THE DETECTION

The Eurobioplex Hepatitis D test is a test of amplification of the ribonucleic acid (RNA) of the HDV virus as well as a control of RNA extraction and RT-PCR inhibition using one step RT-PCR amplification in real-time. Internal RNA control (RC) allows the control of all steps of the RNA extraction stage from blood samples (serum or plasma) through the stage of amplification by PCR in real time. It allows for checks of possible PCR inhibitors or technical problem.

The test is performed from the RNA extracted from the sample using a single reaction in a single well/tube. HDV virus is detected using a labeled probe FAM. Control of extraction and PCR inhibition is detected using a labeled probe HEX. All emit a specific fluorescence following its hydrolysis during the elongation of the amplification product. The measurement of the intensities of real-time fluorescence correlates with the accumulation of specific amplification products.

This amplification system has been validated on a standard RNA containing a specific HDV virus insert (positive control HDV-QS), on the international standard from Paul Erlich Institute (1st WHO international standard for HD virus RNA for NAT testing WHO IS PEI: PEI code 7657/12), and on an internal RNA control (RC).

DESCRIPTION AND CONTENT OF THE KIT

The qPCR Hepatitis D kit is ready to use for the specific detection and quantification of the RNA of this virus. The kit contains reagents and enzymes for the amplification of Hepatitis D viral RNA and the internal control RNA (RC) by RT-PCR (Table 1). Fluorescence is emitted and recorded through optical measurements during the PCR using a fluorimeter by choosing the wavelength in the Table 2.

Table 1 : Note : well centrifuge the tubes before use

Component	Tubes -96 reactions	Tubes -48 reactions	Tubes -24 reactions	Description	Storage
RC	4 (white) tubes of 580 μ L	2 (white) tubes of 580 μ L	1 (white) tube of 580 μ L	Internal RNA Control (500 copies/ μ L) to add to the lysis buffer. For a manual/automated extraction: 10 μ L/sample for 70 μ L final volume of elution (Respect carefully the proportion depending on the volume of elution)	[-75°; -85°C] (defrost only once)


Component	Tubes -96 reactions	Tubes -48 reactions	Tubes -24 reactions	Description	Storage
Primers/Probes (Oligomix)	4 (orange) tubes of 35 μ L	2 (orange) tubes of 35 μ L	1 (orange) tube of 35 μ L	Primers and probes for <i>HDV</i> and RC	[-15°C ; -22°C]
HDV-QS (1)	5 (transparent) tubes of 1 standard of 20 μ L	3 (transparent) tubes of 1 standard of 20 μ L	2 (transparent) tubes of 1 standard of 20 μ L	Standard tube for quantification with: 1 quantity of <i>HDV</i> RNA synthetic matrix (1.10^7 copies/ 10 μ L) and 1 quantity of RC (100 copies/ μ L)	[-75°C ; -85°C] (defrost only once)
Molecular biology Water (CN-H2O)	4 (blue) tubes of 1.5 mL	2 (blue) tubes of 1.5 mL	1 (blue) tube of 1.5 mL	PCR grade water	[-15°C ; -22°C]
Reaction Mix (Enzyme)	4 (red) tubes of 370 μ L	2 (red) tubes of 370 μ L	1 (red) tube of 370 μ L	2x Reaction Mix containing Taq polymerase, 6 mM Mg-chloride and dNTPs	[-15°C ; -22°C]
Reverse transcriptase (RT)	2 (transparent) tubes of 13 μ L	1 (transparent) tube of 13 μ L	1 (transparent) tube of 7 μ L	Reverse transcriptase Enzyme	[-15°C ; -22°C]
	1	1	1	Instructions for use	

Table 2 :

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
HDV	FAM	495 nm	520 nm
RNA Control (RC)	HEX	538 nm	555 nm

For any use with other equipment than CFX96™ real-time PCR detection system or Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System, the results are not guaranteed

Alternatives:

- Channel **HEX** -> Channel VIC (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, Biorad CFX96™),

Required material not provided:

- ◇ Biological Hood
- ◇ qPCR instrument 96™ real-time PCR detection system or Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System
- ◇ Micro centrifuge
- ◇ Vortex
- ◇ Plates / tubes for qPCR
- ◇ Micropipettes
- ◇ Filter tips for micropipettes
- ◇ Sterile microtubes
- ◇ Gloves

STORAGE

All reagents must be kept according to Table 1. Once prepared ARNs should be stored at -80°C.

All reagents can be used until the expiration date indicated on the kit.

Many freezing/defrosting cycles (> 3x for reagents stored between -15°C und -22°C) must be avoided, and could lead to decrease in sensitivity. Do not refreeze reagents at -75°C; -85°C.

Keep all reagents on ice during the experiment.

CAUTIONS AND NOTES

Read carefully instructions before starting.

- ◇ The experiment must be performed by competent staff.
- ◇ Instruments must have been properly installed, calibrated and maintained according to the manufacturer's recommendations.
- ◇ Clinical samples are potentially infectious and must be processed under a laminar flow hood.
- ◇ The experiment must be performed according to good laboratory practices.
- ◇ Do not use this kit after expiration date.
- ◇ Many freezing/defrosting cycles of the reagents must be avoided, and could lead to decrease in sensitivity.
- ◇ Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- ◇ Define three working areas: 1) Isolation of RNA, 2) Preparation of the reaction mix and 3) Amplification / Detection of amplified products.
- ◇ Pipettes, reagents and other materials must not cross each area.
- ◇ Specific caution is required to preserve the purity of the reagents and reaction mixtures. The use of gloves is mandatory. Appropriate methods of preparation of RNA for cDNA transcripts should be used.
- ◇ Always use filtered tips for micropipettes.
- ◇ Use specific lab coats and gloves in each working area.
- ◇ Do not pipette with mouth and do not eat, drink or smoke in the area.
- ◇ Avoid sprays.

COLLECTION OF SAMPLES, TRANSPORT AND STORAGE

- ◇ Collect samples in sterile tubes containing EDTA anticoagulant for preparing plasma or without anticoagulant for serum. **Heparin is not usable due to its inhibitory effects on the PCR.**
- ◇ The samples must be immediately prepared and extracted or stored at +4°C up to 6h. To prepare the plasma or serum (once blood is coagulated), centrifuge blood 20 minutes at 800-1600 g and transfer the plasma or serum obtained in sterile tubes. If delays are longer only plasma and/or serum may be frozen from -20°C (1 week maximum) to -80°C (recommended if kept beyond one week).
- ◇ Transport of clinical samples must obey local regulations for this type of infectious agents. Human blood must always be considered as infectious and adequate protection procedures must be used.

Effects of biochemical parameters: very high concentrations of lipids (9 g/dL) or bilirubin (110 g/L) do not affect the results.

PROCEDURE

I- Extraction of RNA

RNA extraction kits are available from several manufacturers. You can use your own extraction homemade technique or a suitable commercial system by referring to the manufacturer's instructions. However, the equivalence between number of copies/microl and international units (IU/mL) have only been established for the following system:

m2000sp Abbott Automated extraction System Plasma vol: 500 µL Elution vol: 110 µL PCR sample vol: 10 µL

RC (read on the HEX channel) added upon extracting ensures that a negative result is not due to an extraction problem or due to the presence of too much inhibitors of RT-PCR. The RC solution concentration is 5000 copies/10 µL.

We recommend adding 10 µL of RC stock per sample to be extracted for a final elution volume of 70 µL. It is possible to add RC to lysis buffer for an automated extraction. Consequently, it will be distributed by the robot (the equivalent of 16 µL to 500 µL of sample per 110 µL elution volume for example with m2000sp automated extraction system, see above).

II- qRT-PCR

Prepare the reaction mix as follows with a surplus: number of test Nx120%.

	Vol (μL ; 1 test)
Reaction Mix (Enzyme)	12,5
Reverse Transcriptase (RT)	0,2
Primers/Probes (Oligomix)	1
Water (CN-H ₂ O)	1,3

To control that the PCR and extraction and real-time RT-PCR amplification steps worked properly, it is necessary to test:

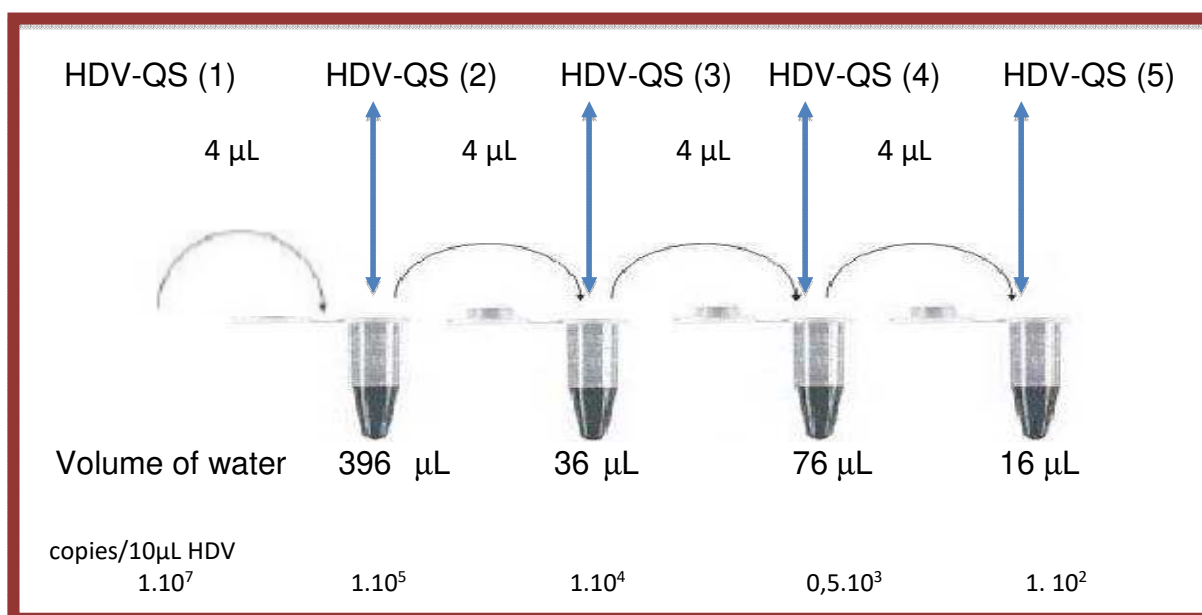
For **qualitative analysis**:

- Hepatitis D positive control (CP): 10 μL of HDV-QS standard
- Negative control (CN): 10 μL of PCR water
- The control of extraction and amplification by RT-PCR (RC): 10 μL previously added to each sample before extraction (for a 70 μL elution)
- A positive control RC (CP-RC): 1.43 μL of RC + 8.57 μL of PCR water

Note: HDV-QS positive control contains a high concentration of matrix. Handling must be done carefully to avoid contamination.

For **quantitative analysis**:

In addition to the controls for qualitative analysis, it is necessary to prepare 4 additional dilutions of HDV-QS standard in addition to the tube supplied. The water supplied must be used as diluent. Assign the positive control HDV-QS supplied (10^7 copies/10 μL) as the highest standard in the first tube. Pipet 396 μL of sterile water in the tube 1, 36 μL in tube 2, 76 μL in tube 3, 16 μL in tube 4 and dilute as follows:



To generate a standard curve on a real-time PCR System, the 5 concentrations of standards must be used and defined as standard for HDV by specifying the corresponding number of copies/reaction or equivalent international unit (IU).

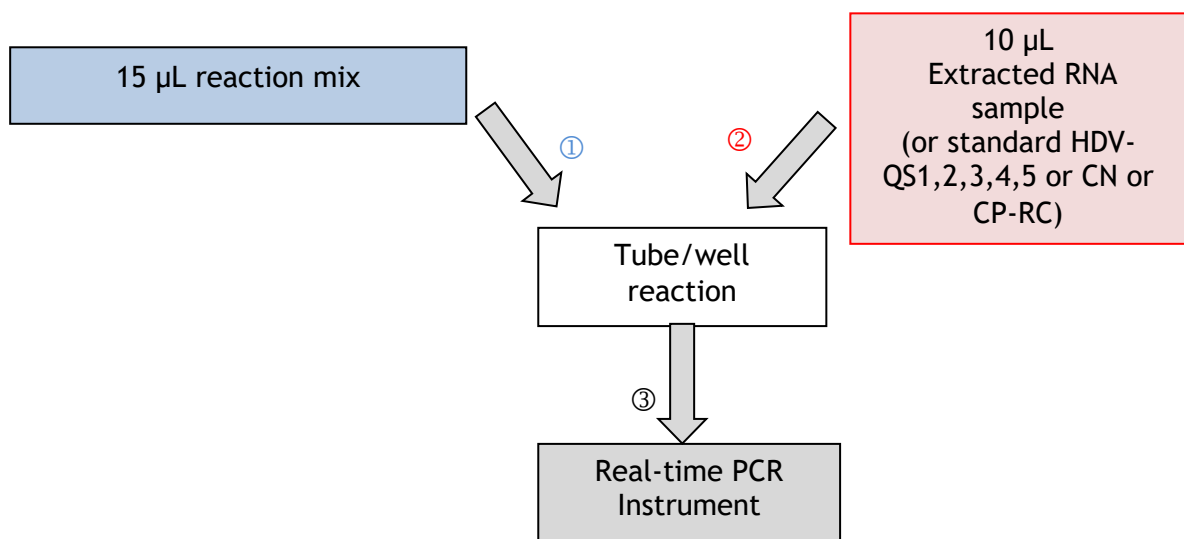
Example of plate layout for quantitative analysis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HDV-QS1	Sample. 2										
B	HDV-QS2											
C	HDV-QS3											
D	HDV-QS4											
E	HDV-QS5											
F	CN											
G	CP-RC											
H	Sample. 2											

Sample: unknown RNA sample; HDV-QS: positive control/standard hepatitis D virus; CN: negative control (water); CP-RC: positive control RC

Protocole of qRT-PCR

- 1) Homogenize the Reaction Mix and centrifuge briefly.
- 2) Distribute the solutions according to the diagram below :



- 3) Close immediately with an adhesive film or caps to avoid contamination.
- 4) Centrifuge briefly to collect all the PCR reaction mix at the bottom of the tubes or plate.
- 5) Program the qPCR instrument as follows:

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
	46 °C	30 min	1	-
	95°C	2 min	1	-
Amplification	95°C	15 sec	45	-
	59°C	1 min		Fluorescence Acquisition

For any use with other equipment than CFX96™ real-time PCR detection system or Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System, the results are not guaranteed

To generate a standard curve on a real-time PCR System, 5 HDV-QS standards and water (HDV=0) must be used and defined as a standard by specifying the corresponding number of molecules/reaction.

Input the concentrations of the HDV standards (FAM channel) during the setting of the thermocycler. The software will display a standard curve and will directly calculate the corresponding number of molecules by reaction. Depending on your quantity of DNA or biological fluid (ml) introduced (serum or plasma), this number of copies can be translated into a number of copies/μg of DNA or copies/mL of biological fluid.

The equivalence between the number of molecules HDV and the international standard has been validated for an RNA extraction systems (see table below). Thus, the number of IU/ml is directly posted on the thermocycler and the result in IU/mL of serum or plasma of patients is instantly calculated. There is a slight overestimation of the viral load for serum samples compared to plasma.

HDV-QS molecules/ 10 microlitres	m2000sp Abbott Automated extraction System Plasma vol: 500 μL Elution vol: 110 μL PCR sample vol: 10 μL
	Equivalence UI/ml
1E+07	3,40E+08
1E+05	3,40E+06
1E+04	3,40E+05
5E+02	1,70E+04
1E+02	3,40E+03

VALIDATION OF THE EXPERIMENT

Qualitative analysis:

- Negative control (CN): no amplification detected on the FAM channel. On the HEX channel, no amplification but it is possible to visualize a weak fluorescence signal. In this case the threshold bar must be positioned just above the maximum of the negative control signal.
- Positive control HDV-QS 1 (CP): PCR signal (FAM) at 15,8 Ct (+/- 3Ct)
- RC positive control: Ct on the HEX channel for the must be ≤ 38 .

Quantitative analysis:

- Negative control (CN): no amplification detected on the FAM channel. On the HEX channel, no amplification but it is possible to visualize a weak fluorescence signal. In this case the threshold bar must be positioned just above the maximum of the negative control signal.
- Ct values of HDV-QS standards on the FAM channel must be +/- 3 Ct of the values from the following table.

HDV-QS molecules/10 microlitres	C(t) FAM
1E+07	15,8
1E+05	21,8
1E+04	24,8
0,5E+03	29,8
1E+02	31,5

-- RC positive control: Ct on the HEX channel for the must be ≤ 38 .

- The efficiency of PCR on the FAM channel must be greater than 90% (equivalent to a "slope" $> -3,6$).

DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION

Analysis of internal control RC in the samples :

If RC has been used according to the recommendations of the technical document, the expected value of Ct for the **RC should be ≤ 38** .

Two results can be obtained for RC:

1/ the RC control test is positive with $Ct \leq 38$: RNA has been properly extracted, and there is no inhibitor of RT-PCR. The result can be validated.

2/ the RC control test is negative or $Ct > 38$: either RNA was not properly extracted, or the RT did not function properly, or the presence of PCR inhibitors inhibits the PCR reaction. Then it is recommended to repeat the extraction or dilute the sample.

(Note: If the RC has not been used, no signal on the HEX channel is expected).

Qualitative analysis for HDV :

Positive (+): for Ct ≤ 45 (example curve a)

Negative (-): for Ct > 45 (example curve c)

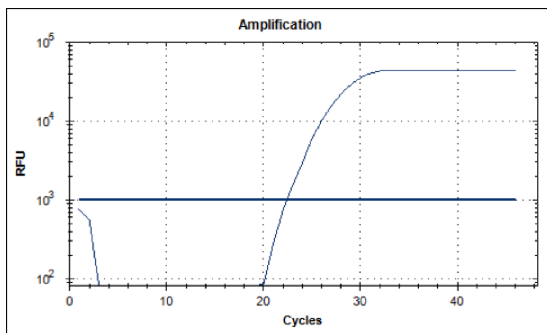
Quantitative analysis for HDV :

Positive (+): for Ct ≤ 35 (example curve a)

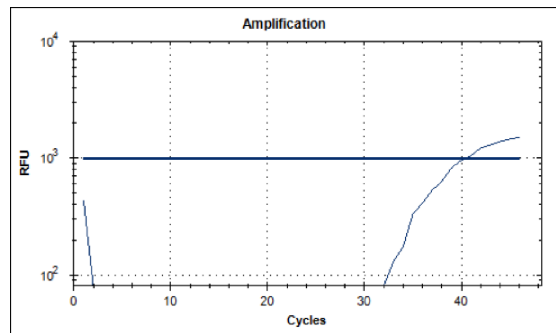
Positive not quantifiable (PNQ): for $45 \geq Ct > 35 \Rightarrow$ indicates of a very low viral replication below the low threshold of quantification of the test (example curve b)

Negative (-): for Ct > 45 (example curve c)

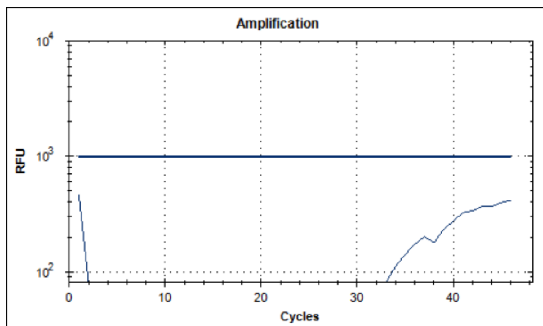
Curve a : POSITIVE



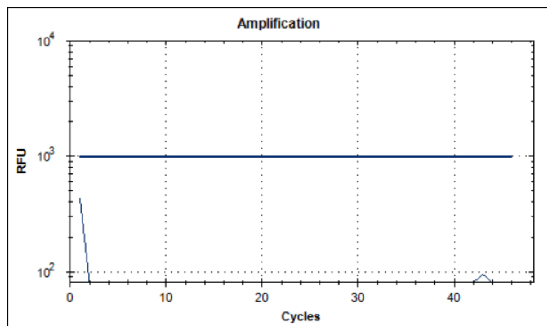
Curve b : WEAKLY POSITIVE not quantifiable (PNQ)



Curve c : NEGATIVE



Or



In summary:

Possible results for clinical samples :

RC Ct valid : Ct≤38

RC Ct invalid : Ct>38

Depending on the value of RC Ct and the type of analysis (qualitative or quantitative), the HDV results will be usable or not

PCR Signal		Qualitative Analysis	Quantitative Analysis	Test validity/ comment
HDV (FAM)	RC (HEX)	Presence of HDV virus	Possible Quantification	
+ Ct≤35	Ct valid	Yes : positive sample	Yes	Valid for qualitative and quantitative analysis
+ 45≥Ct>35	Ct valid	Yes : positive sample	No : PNQ sample	Valid for qualitative but not quantitative analysis
+ Ct≤35	Ct invalid	Yes : positive sample	No	Valid for qualitative but not quantitative analysis * Possible inhibition of extraction or RT-PCR that prevents validation of the HDV quantification
+ 45≥Ct>35	Ct invalid	Yes : positive sample	No	Valid for qualitative but not quantitative analysis * Possible inhibition of extraction or RT-PCR that prevents validation of the HDV quantification
- Ct>45	Ct valid	No : negative sample	No : negative sample	Valid for qualitative analysis. No quantification since sample is negative
- Ct>45	Ct invalid	No possible interpretation	No possible interpretation	Not Valid for qualitative, nor quantitative analysis * Possible inhibition of extraction or RT-PCR

PNQ: weakly positive non-quantifiable

* If the expected information is not obtained, dilute 5x the sample. If the same result is obtained extract the sample again.

PERFORMANCE ANALYSIS

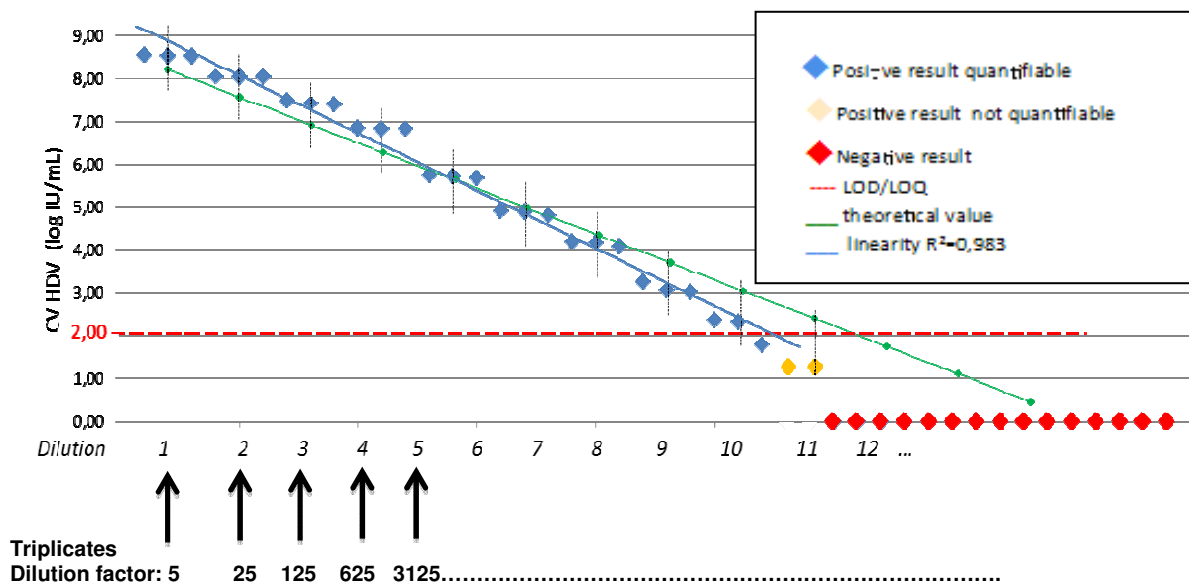
All experiments presented below were conducted on CFX96™ real-time PCR detection system (Biorad).

1- Analytical sensitivity and linearity for quantification:

The analytical sensitivity is defined as the smallest amount of target that can be precisely detected in a sample. This analytical detection limit was determined using HDV positive clinical samples in combination with a specific extraction method on the m2000sp automaton (Abbott Diagnostics with the RNA kit Abbott Diagnostic, m2000-RNA-Plasma-BA-500-70-V1 Protocol. Test sample of 500 microl and elution in 110 microl).

The detection limit is 1^{E+02} IU/ml. The number of International Units is derived from the HDV International Standard from Paul Erlich Institute (1st WHO international standard for HD virus RNA for NAT testing WHO IS PEI: PEI code 7657/12)

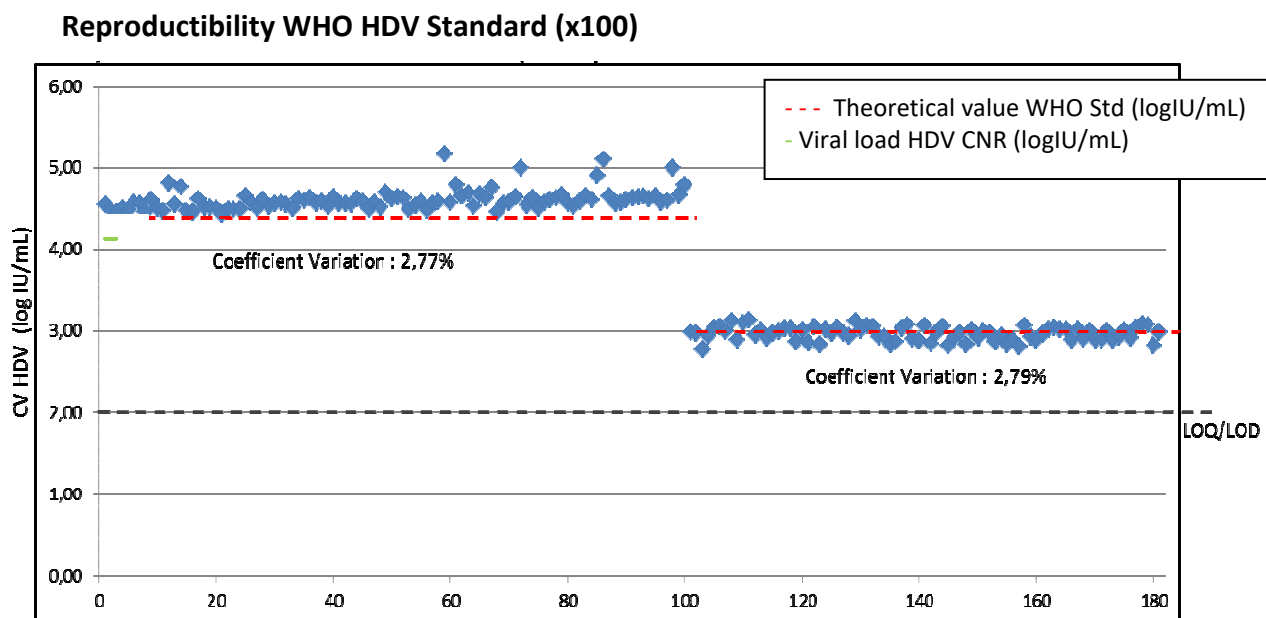
Sensitivity-Linearity of quantification: dilution series (1/5)



Linearity for quantification: validated from 1^{E+02} IU/ml to 1^{E+8,3} IU/ml for clinical sample.

2- Reproducibility within an experiment and between experiments :

N = 100 replicata for 2 concentrations of HDV international standard PEI ($1^{E+04,3}$ IU/ml and 1^{E+03} IU/ml) were carried out. The Coefficient of Variation within an experiment is 2.8% on log values for the 2 concentrations.



Reproducibility between experiments of the standard has been analyzed on the CFX96™ real-time PCR detection system (Biorad) (n = 110 measures): the median CV is 3%.

HDV-QS molecules/10 microlitres	Median C(t)	C(t) Std. Dev	Coefficient of variation inter runs (%) (n=13)
1^{E+07}	15,74	0,69	4,4
1^{E+05}	21,84	0,75	3,4
1^{E+04}	24,84	0,67	2,7
$0,5^{E+03}$	29,79	0,67	2,2
1^{E+02}	31,30	0,81	2,6

3-Specificity:

***Analytical specificity on non-HDV viremic samples:**

HDV negative plasma samples (negative samples for the detection of anti-HDV total antibodies) but viremic for other hepatotropic viruses were analyzed to determine the analytical specificity of the Kit Eurobioplex HDV, expressed as a negative result in the absence of the target. The analytical specificity was assessed on 105 specimens representing the following pathogenic viruses: HBV (n = 75), HIV (n = 10), HCV (n = 10), HAV (n = 5) or HEV (n=5).

No false positivity was found with the Eurobioplex HDV kits on the 105 samples tested.

4- Specificity and sensitivity :

***Sensitivity to the different HDV genotypes :**

8 major genotypes (HDV-1 to HDV-8) have been defined according to a nucleotide divergence within the genome of 20-35 %⁷⁻⁸. Each viral genotype emerged from a region and has now a defined geographic location. HDV-1 is ubiquitous, HDV-2 hits in Japan, Taiwan and in Yakutia (Russia); HDV-3 is exclusively observed in South America; HDV-4 in Taiwan and Japan, and HDV-5 to HDV-8 in sub-Saharan Africa. Owing to the migratory flows all these genotypes can potentially be found anywhere⁷⁻⁸. The performance of the HDV Eurobioplex has therefore been evaluated on 139 HDV positive RNA samples representing all viral genotypes and on 12 HDV negative RNA samples tested by the French reference national laboratory for HDV (CNR Delta-FNRL, Emmanuel Gordien, PhD.).

The following samples have been included in this part of the study: 33 HDV-1 Africa; 61 HDV-1 Europe/Asia; 1 HDV-2; 1 HDV-3; 1 HDV-4 (plasmid containing a copy of complete genome); 22 HDV-5; 7 HDV-6; 10 HDV-7 et 3 HDV-8. These 139 samples were quantified by the technique of CNR Delta and the kit Eurobioplex HDV EBX-004.

The 12 negative samples have been found negative using both techniques.

Eleven samples of very low viral loads (close to the thresholds of quantification) were detected by the 2 techniques (n = 3) or by one of the 2 techniques Eurobioplex HDV (n = 5) or CNR Delta (n = 3)

All other samples were detected and quantified equivalently by the two techniques. A coefficient of correlation $R^2=0,8$ was calculated indicating the excellent correlation of results between the 2 techniques whatever the viral genotype. The median value on all these samples was very close with 5.16 logUI/mL for the CNR Delta versus 5.05 logUI/mL for Eurobioplex HDV.

*** Global Sensitivity and specificity**

610 samples in total were used to assess the clinical/diagnostic sensitivity and specificity.

n=610		<i>Eurobio</i>	
		Pos	Neg
<i>CNR</i>	Pos	389	9*
	Neg	14*	198

* samples with very low viral load < 3logUI/mL

Clinical specificity : $198 / (198+14) = 93,4 \%$

Clinical sensitivity : $389 / (389+9) = 97,7 \%$
--

BIBLIOGRAPHY

- (1) Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18: 997-1003.
- (2) Brazas R, Ganem D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science* 1996; 274:90-94.
- (3) Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, Hanslik , Alloui C, De´ny P, Gault E. Quantification of Hepatitis Delta Virus RNA in Serum by Consensus Real-Time PCR Indicates Different Patterns of Virological Response to Interferon Therapy in Chronically Infected Patients. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43: 2363–2369.
- (4) Zachou K, Yurdaydin C, Drebber U, Dalekos GN, Erhardt A, Cakaloglu Y, Degertekin H, Gurel S, Zeuzem S, Bozkaya H, Schlaphoff V, Dienes HP, Bock TC, Manns MP, Wedemeyer H; HDT-1 Study Group. Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis. *Liver Int.* 2010; 30:430-437.
- (5) EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. European Association for the Study of the Liver. *J. Hepat.* 2012; 57: 167–185
- (6) Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, Dény P. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1447-1450.
- (7) Chudy M, Development of the 1st International Standard for Hepatitis D Virus RNA –an update. 24th blood virology meeting, Ljubljana, 8-9 May 2013.
- (8) Manesis EK, Schina M, Le Gal F, Agelopoulou O, Papaioannou C, Kalligeros C, Arseniou V, Manolakopoulos S, Hadziyannis ES, Gault E, Koskinas J, Papatheodoridis G, Archimandritis AJ. Quantitative analysis of hepatitis D virus RNA and hepatitis B surface antigen serum levels in chronic delta hepatitis improves treatment monitoring. *Antivir Ther.* 2007;12: 381-388.
- (9) Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut.* 2000 Mar;46(3):420-6.
- (10) Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anaïs P, Drugan T, Trinchet JC, Roulot D, Tamby M, Milinkovitch MC, Dény P. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *J Virol.* 2004 Mar;78(5):2537-44.
- (11) Castelnau C, Le Gal F, Ripault MP, Gordien E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Pham BN, Maylin S, Bedossa P, Dény P, Marcellin P, Gault E. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology.* 2006 Sep;44(3):728-35.
- (12) Brichler S, Le Gal F, Butt A, Chevret S, Gordien E. Commercial real-time reverse transcriptase PCR assays can underestimate or fail to quantify hepatitis delta virus viremia. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jun;11(6):734-40
- (13) Brichler S, Le Gal F, Neri-Pinto F, Mansour W, Roulot D, Laperche S, Gordien E. Serological and molecular diagnosis of hepatitis delta virus infection: results of a French national quality control study. *J Clin Microbiol.* 2014 May;52(5):1694-7.

WASTE ELIMINATION

Be in accordance with the law on the elimination of waste of clinical infectious material.

SYMBOLS



Reference



Batch number



Highest storage temperature



Expiration date



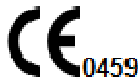
Content sufficient for « N » reactions



Keep protected from light



Manufacturer



CE marked product CE by the French notified body LNE GMED



In vitro Diagnostic



Instructions for use



eurobio
SCIENTIFIC
7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
France
+33 1 69 79 64 80

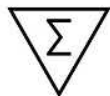


eurobio
SCIENTIFIC

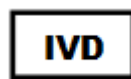
EurobioPlex *HDV qRT-PCR*

Für **qualitative und quantitative** RT-PCR.

REF EBX-004



24/48/96 Reaktionen



Version 2.03 – 25/11/2019

Nur für das CFX96™ Real-Time PCR-Nachweissystem (Biorad) oder das 7500 Real-Time PCR-System von Applied Biosystems® validiert.

Bei Verwendung auf anderen Geräten als auf dem CFX96 Real-Time PCR-Nachweissystem oder dem 7500 Real-Time PCR-System von Applied Biosystems, besteht keine Garantie für die Ergebnisse.

Lagerung: alle Reagenzien bis zum erstmaligen Gebrauch und danach bei -15°C und -22°C, **ausgenommen HDV-Standards und RC-Kontrollen, die bei -75°C und -85°C zu lagern sind**



Gebrauchsanleitung

VERWENDUNGSZWECK

Der HDV-Test von Eurobioplex bedient sich der Amplifikation mittels reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) und ist für den qualitativen und/oder quantitativen Nachweis des Hepatitis-Delta-Virus (HDV) aus einer mittels reverser Transkriptase (RT) in cDNA transkribierte Nukleinsäure-RNA bestimmt. Der Extrakt kann aus dem Plasma oder Serum von Patienten stammen. Mit diesem Test kann die Viruslast bei Patienten während des Krankheitsverlaufs oder während der Behandlung ebenso bestimmt werden wie eine mögliche replikative Disposition einer HDV-Infektion. Dieser Test ist speziell für Patienten bestimmt, die mit dem Hepatitis-B-Virus infiziert sind. Dieser Test eignet sich nicht für das Screening von Blutkonserven oder mit HDV infizierter Organe.

EINLEITUNG

Hepatitis D ist eine Infektionskrankheit, verursacht durch das Hepatitis-Delta-Virus (HDV), das Ende der 1970er Jahre von Mario Rizzetto entdeckt wurde. Bei HDV handelt es sich um ein Satellitenvirus des Hepatitis-B-Virus (HBV). Das HDV-Genom besteht aus einer ringförmigen, einzelsträngigen RNA, Pseudo-Doppelsträngen, die von zwei Delta-Proteinen umgeben sind (dem kleinen p24 und dem großen p27), die ein Ribonukleoprotein-Delta bilden, das von HBV-Hüllproteinen oder HBsAG umhüllt ist. Folglich kann das HDV-Virus nur Personen infizieren, die bereits unter einer chronischen HBV-Infektion leiden.

Eine HDV-Infektion kann sich bei Patienten, die bereits chronisch mit HBV infiziert sind, als schwere Delta-Superinfektion manifestieren oder als gleichzeitige, akute Ko-Infektion beider Viren auftreten, wobei letztere Form weniger schwer ist. HDV gilt als das für die schwersten Lebererkrankungen verantwortliche Virus und kann zu akut fulminanten und chronischen Formen führen, die eine schnellere Krankheitsprogression zur Zirrhose sowie zu hepatozellulärem Karzinom zur Folge haben als Mono-HBV-Infektionen. Weltweit sind etwa 10-15 Millionen Menschen mit HDV infiziert. Das Virus zeichnet sich durch eine hohe genetische Variabilität aus. Es bestehen acht Haupt-Genotypen (von 1 bis 8) mit charakteristischer geographischer Aufteilung: Genotyp 1 (HDV-1) kommt weltweit und am häufigsten vor; HDV-2 und -4 sind in Asien zu finden; HDV-3 in den nördlichen Teilen Südamerikas und HDV-5 bis -8 in Subsahara-Afrika. Angesichts der Migration von Teilen der Bevölkerung können diese unterschiedlichen Genotypen allerdings auch in vielen anderen Ländern auftreten.

Anders als HBV besitzt HDV kein spezifisches Enzym für die Replikation seines Genoms, wodurch eine wirksame therapeutische Strategie gegen diese Infektion schwieriger zu etablieren ist. Derzeit beruht die Behandlung auf der Gabe von Interferon Alpha in hohen Dosen und insbesondere in pegylierter Form. Neue spezifische HDV-Medikamente befinden sich derzeit in Entwicklung. Dazu zählen Entry-Inhibitoren sowie Inhibitoren der Farnesylierung (wichtiger Schritt im Virus-Zyklus).

Während die Diagnose der HDV-Infektion auf dem Nachweis von Anti-Delta-Antikörpern beruht, basiert die virale Replikation, die Überwachung der Infektion oder der antiviralen Behandlung auf dem Nachweis und der Quantifizierung viraler RNA im Blut infizierter Patienten mittels RT-PCR in Echtzeit.

NACHWEISPRINZIP

Der Hepatitis D-Test von Eurobioplex ist ein Test zur Amplifikation der Ribonukleinsäure (RNA) des HD-Virus und sowie auch eine Kontrolle der RNA-Extraktion und der RT-PCR-Inhibition, wobei er sich der RT-PCR-Amplifikation in Echtzeit bedient. Die interne RNA-Kontrolle (RC) ermöglicht die Kontrolle aller Schritte der RNA-Extraktion in den Blutproben (Serum oder Plasma) bis zur Amplifikation durch PCR in Echtzeit. Damit können auch mögliche PCR-Inhibitoren oder technische Probleme ermittelt werden.

Durchgeführt wird der Test an der aus einer Probe extrahierten RNA, wobei diese Extraktion in einer Reaktion in einem Well/Probenröhrchen stattfindet. Das HDV-Virus wird unter Anwendung einer FAM-markierten Sonde nachgewiesen. Die Kontrolle sowie PCR-Inhibition wird mit einer HEX-markierten Sonde nachgewiesen. Diese Marker emittieren nach der Hydrolyse während der Elongation des Amplifikationsprodukts eine spezifische Fluoreszenz. Die Intensität der Echtzeit-Fluoreszenz korreliert mit der Ansammlung spezifischer Amplifikationsprodukte.

Dieses Amplifikationssystem wurde mit Standard-RNA validiert, die ein spezifisches HDV-Virus-Insert enthält (Positivkontrolle HDV-QS), mit dem internationalen Standard des Paul-Ehrlich Instituts (erster internationaler WHO-Standard für NAT-Tests der HD-Virus-RNA WHO IS PEI: PEI code 7657/12) und an einer internen RNA-Kontrolle.

BESCHREIBUNG UND PACKUNGSIHALT DES KITS

Das qPCR Hepatitis D-Kit ist gebrauchsfertig und für den spezifischen Nachweis und die Quantifizierung der RNA dieses Virus bestimmt. Im Kit enthalten sind Reagenzien und Enzyme für die Amplifikation der viralen RNA des Hepatitis-D-Virus sowie die RNA der internen Kontrolle (RC) für die RT-PCR (Tabelle 1). Während der PCR wird unter Verwendung eines Fluorimeters und der Anwendung der in Tabelle 2 angeführten Wellenlängen die emittierte Fluoreszenz mit optischen Messungen bestimmt und dokumentiert.

Tabelle 1 : Anmerkung: Probenröhrchen vor der Verwendung gut zentrifugieren

Bestandteil	Probenröhrchen -96 Reaktionen	Probenröhrchen -48 Reaktionen	Probenröhrchen -24 Reaktionen	Beschreibung	Lagerung
RC	4 (Weiße) Probenröhrchen 580 µl	2 (Weiße) Probenröhrchen 580 µl	1 (Weiße) Probenröhrchen 580 µl	Interne RNA-Kontrolle (500 Kopien/ µl) für die Hinzugabe zum Lysepuffer. Für die manuelle /automatisierte Extraktion: 10µl/Probe für 70µl Elutionsvolumen. (Abhängig vom Elutionsvolumen das Verhältnis genau einhalten.	[-75°C; -85°C] (nur einmal auftauen)


Bestandteil	Probenröhrchen -96 Reaktionen	Probenröhrchen -48 Reaktionen	Probenröhrchen -24 Reaktionen	Beschreibung	Lagerung
Primer/Sonden (Oligomix)	4 (orange) Probenröhrchen 35 µl	2 (orange) Probenröhrchen 35 µl	1 (orange) Probenröhrchen 35 µl	Primer und Sonden für HDV und RC	[-15°C; -22°C]
HDV-QS (1)	5 (transparente) Probenröhrchen 1 Standard 20 µl	3 (transparente) Probenröhrchen 1 Standard 20 µl	2 (transparente) Probenröhrchen 1 Standard 20 µl	Standard-Probenröhrchen für die Quantifizierung mit: 1 Einheit synthetischer HDV RNA-Matrix (1.10 ⁷ Kopien/ 10 µl) und 1 Einheit RC (100 Kopien/µl)	[-75°C; -85°C] (nur einmal auftauen)
Mikrobiologisch reines Wasser (CN-H ₂ O)	4 (blaue) Probenröhrchen 1,5 ml	2 (blaue) Probenröhrchen 1,5 ml	1 (blaue) Probenröhrchen 1,5 ml	PCR-geeignetes Wasser	[-15°C; -22°C]
Reaktionsgemisch (Enzyme)	4 (rote) Probenröhrchen 370 µl	2 (rote) Probenröhrchen 370 µl	1 (rote) Probenröhrchen 370 µl	2x Reaktionsgemisch mit Taq- Polymerase, 6 mM Mg-Chlorid und dNTPs	[-15°C; -22°C]
Reverse Transkriptase (RT)	2 (transparente) Probenröhrchen 13 µl	1 (transparente) Probenröhrchen 13 µl	1 (transparente) Probenröhrchen 7 µl	Reverse Transkriptase Enzym	[-15°C; -22°C]
	1	1	1	Gebrauchs-anleitung	

Tabelle 2 :

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
HDV	FAM	495 nm	520 nm
RNA-Kontrolle (RC)	HEX	538 nm	555 nm

Bei Verwendung auf anderen Geräten als dem CFX96 Real-Time PCR-Nachweissystem oder dem 7500 Real-Time PCR-System von Applied Biosystems, besteht keine Garantie für die Ergebnisse.

Alternativen:

- Channel **HEX** -> Channel VIC (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, Biorad CFX96™),

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien:

- ◇ Abzug
- ◇ qPCR-Instrument 96™ Real-time PCR-Nachweissystem oder 7500 Real-Time PCR-System von Applied Biosystems®
- ◇ Mikrozentrifuge
- ◇ Vortex
- ◇ Platten / Probenröhrchen für qPCR
- ◇ Mikropipetten
- ◇ Filterspitzen für Mikropipetten
- ◇ Sterile Mikro-Probenröhrchen
- ◇ Handschuhe

LAGERUNG

Sämtliche Reagenzien sind gemäß der Angaben in Tabelle 1 zu lagern. Vorbereitete RNA bei -80°C lagern.

Sämtliche Reagenzien können bis zu dem auf dem Kit angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. Zu häufiges Einfrieren/Auftauen (> 3x bei Reagenzien, die bei -15°C und -22°C zu lagern sind) ist zu vermeiden, da dies zu einer Verminderung der Sensitivität führen könnte. Reagenzien, die bei -75°C; -85°C zu lagern sind, nicht wieder einfrieren.

Während der Testdurchführung alle Reagenzien auf Eis lagern.

VORSICHTS- UND WARNHINWEISE

Vor Beginn die Anleitungen sorgfältig durchlesen.

- ◇ Der Test darf nur von qualifiziertem Personal durchgeführt werden.
- ◇ Die Instrumente sind gemäß den Empfehlungen der Hersteller ordnungsgemäß zu installieren, zu kalibrieren und zu warten.
- ◇ Klinische Proben sind potentiell infektiös und müssen unter einem Laminar-Flow-Abzug bearbeitet werden.
- ◇ Der Test muss gemäß den Bestimmungen der guten Laborpraxis durchgeführt werden.
- ◇ Kits nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- ◇ Häufiges Einfrieren/Auftauen der Reagenzien ist zu vermeiden, da dies zu einer Verminderung der Sensitivität führen könnte.
- ◇ Nach dem Auftauen die Reagenzien vor dem Gebrauch kurz zentrifugieren.
- ◇ Drei getrennte Arbeitsbereiche definieren: 1) Isolierung von RNA, 2) Vorbereitung des Reaktionsgemischs und 3) Amplifikation/Nachweis der amplifizierten Produkte.
- ◇ Pipetten, Reagenzien und andere Arbeitsmaterialien nur im jeweiligen definierten Arbeitsbereich verwenden.
- ◇ Besondere Vorsicht ist erforderlich, um die Reinheit der Reagenzien und Reaktionsgemische zu bewahren. Es müssen Arbeitshandschuhe getragen werden. Geeignete Methoden zur Vorbereitung der RNA für cDNA-Transkripte sind anzuwenden.
- ◇ Stets Filterspitzen für Mikropipetten verwenden.
- ◇ In jedem Arbeitsbereich eigene Labormäntel und Handschuhe tragen.
- ◇ Nicht mit dem Mund pipettieren und in den jeweiligen Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen.

- ◇ Keine Aerosole verwenden.

PROBENENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

- ◇ Proben in sterilen Probenröhrchen sammeln. Zur Vorbereitung von Plasma Probenröhrchen mit EDTA verwenden oder für Serum Röhrchen ohne Antikoagulans. **Aufgrund seiner hemmenden Wirkung auf die PCR darf kein Heparin verwendet werden.**
- ◇ Die Proben müssen sofort vorbereitet und extrahiert werden oder können bei +4°C bis zu 6 Stunden gelagert werden. Zur Vorbereitung von Plasma oder Serum (wenn das Blut koaguliert ist), Blut 20 Minuten bei 800-1600 g zentrifugieren und das gewonnene Plasma oder Serum in sterile Probenröhrchen geben. Im Falle längerer Verzögerungen können nur Plasma und/oder Serum bei Temperaturen von -20°C (maximal 1 Woche) bis -80°C (empfohlen bei einer Lagerungsdauer von über 1 Woche) aufbewahrt werden.
- ◇ Beim Transport klinischer Proben sind die lokalen Bestimmungen für diese Art von infektiösem Material zu beachten. Menschliches Blut ist stets als infektiös zu betrachten, weswegen angemessene Verfahren zur Anwendung kommen müssen.

Auswirkungen biochemischer Parameter: sehr hohe Konzentrationen von Lipiden (9 g/dl) oder Bilirubin (110 g/l) haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

TESTDURCHFÜHRUNG

I- Extraktion der RNA

Kits zur Extraktion von RNA sind von verschiedenen Herstellern erhältlich. Sie können Ihr eigenes Extraktionssystem verwenden oder ein geeignetes handelsübliches System, wobei Sie den Anweisungen des Herstellers folgen. Dennoch ist die Übereinstimmung zwischen der Anzahl der Kopien/ µl und internationalen Einheiten (IU/ml) nur mit dem folgenden System gewährleistet:

**m2000sp - automatisches
Extraktionssystem von Abbott**
Plasma-Vol: 500 µl
Elutions-Vol: 110 µl
PCR-Probenvol.: 10 µl

Die während der Extraktion hinzugegebene RC (Ableseung am HEX-Kanal) gewährleistet, dass ein negatives Resultat nicht auf ein Extraktionsproblem oder die Anwesenheit zu vieler Inhibitoren der RT-PCR zurückzuführen ist. Die Konzentration der RC-Lösung beträgt 5000 Kopien/10 µl.

Wir empfehlen die Zugabe von 10 µl RC pro zu extrahierender Probe, um ein Elutionsvolumen von 70 µl zu erreichen. Für eine automatische Extraktion ist es möglich, RC dem Lysepuffer hinzuzufügen, wobei die Verteilung dann durch den Laborautomaten erfolgt (z.B. das Äquivalent von 16 µl zu 500 µl Probe für 110 µl Elutionsvolumen mit dem oben erwähnten Extraktionssystem m2000sp).

II- qRT-PCR

Das Reaktionsgemisch wie folgt mit Überschuss vorbereiten: Anzahl der Tests Nx120%.

	Vol (μl ; 1 Test)
Reaktions-gemisch (Enzyme)	12,5
Reverse Transkriptase (RT)	0,2
Primer/Sonden (Oligomix)	1
Wasser (CN-H ₂ O)	1,3

Zur Kontrolle der ordnungsgemäßen Funktion von PCR und Extraktion sowie der RT-PCR-Amplifikation, sind folgende Tests notwendig:

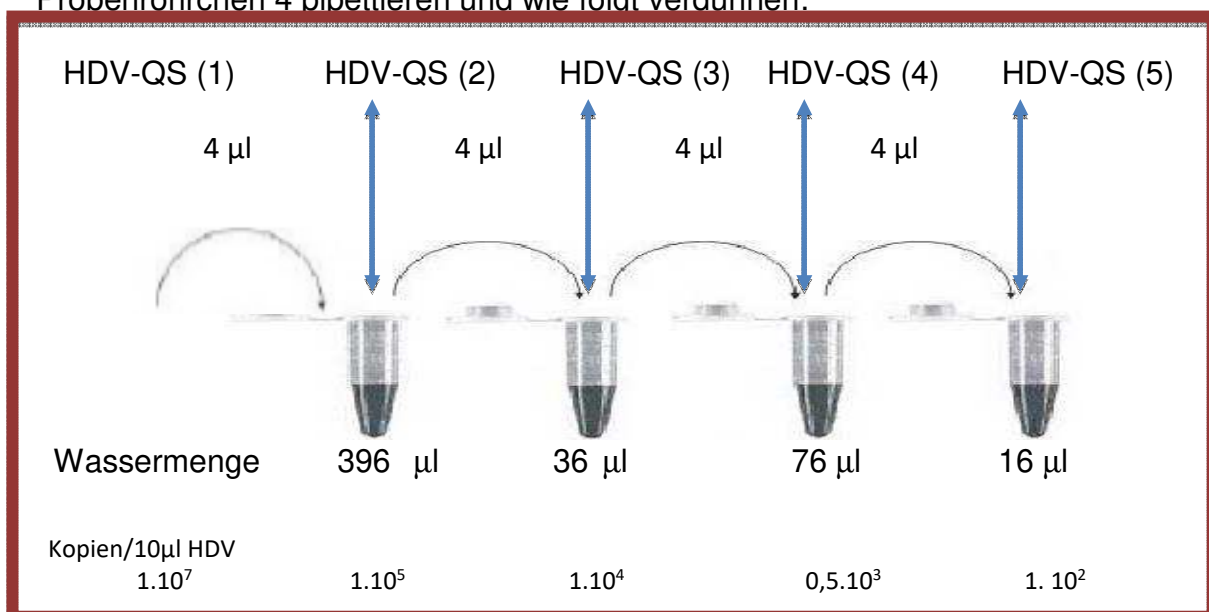
Für die **qualitative Analyse**:

- eine Hepatitis-D-Positivkontrolle (CP): 10 μl HDV-QS-Standard
- eine Negativkontrolle (CN): 10 μl PCR-geeignetes Wasser
- eine Extraktions- und Amplifikationskontrolle der RT-PCR (RC): 10 μl vor der Extraktion jeder Probe hinzugefügt (für 70 μl Elutionsvolumen)
- Eine Positivkontrolle RC (CP-RC): 1,43 μl RC + 8,57 μl PCR-geeignetes Wasser

Anmerkung: Die HDV-QS-Positivkontrolle enthält eine hohe Konzentration an Matrix. Der Umgang damit muss sehr sorgfältig erfolgen, um eine Kontamination zu vermeiden.

Für die **quantitative Analyse**:

Zusätzlich zu den Kontrollen für die qualitative Analyse ist es notwendig, zusätzlich zu dem im Kit enthaltenen HDV-QS-Standard 4 Verdünnungen herzustellen. Als Verdünnungsmittel ist das im Kit enthaltene Wasser zu verwenden. Die im Kit enthaltene Positivkontrolle HDV-QS (10^7 Kopien/10 μl) ist als der höchste Standard im ersten Probenröhrchen zu verwenden. Anschließend 396 μl steriles Wasser in Probenröhrchen 1, 36 μl in Probenröhrchen 2, 76 μl in Probenröhrchen 3, 16 μl in Probenröhrchen 4 pipettieren und wie folgt verdünnen:



Um auf einem Real-Time-PCR-System eine Standardkurve zu generieren, müssen die 5 Konzentrationen verwendet und unter Angabe der entsprechenden Anzahl von Kopien/Reaktion oder der entsprechenden internationalen Einheit (IU) als Standard für HDV definiert werden.

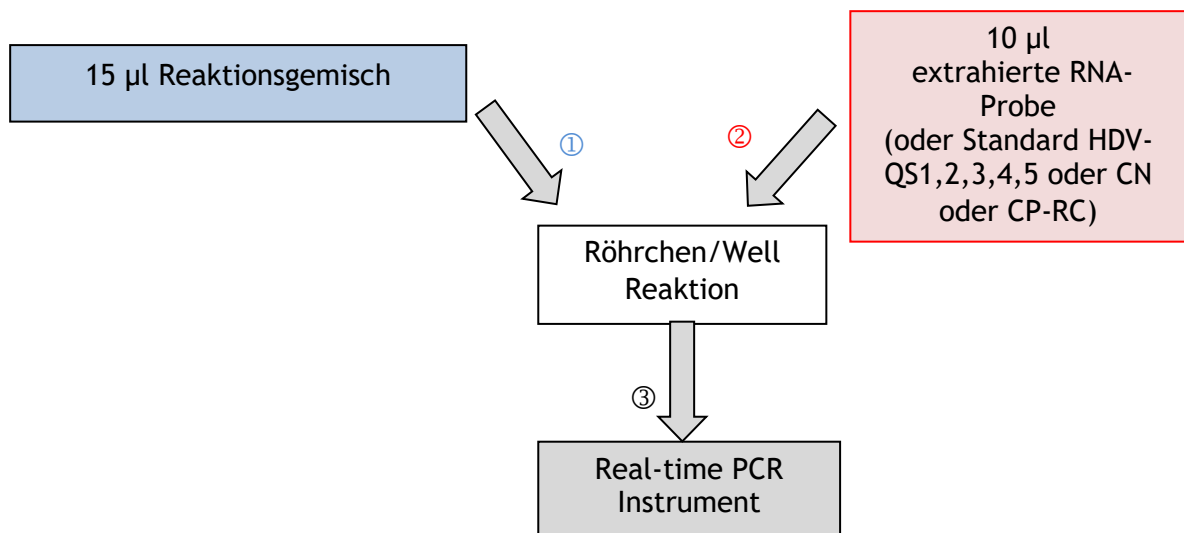
Beispiel eines Platten-Layouts für die quantitative Analyse

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HDV-QS1	Probe. 2										
B	HDV-QS2											
C	HDV-QS3											
D	HDV-QS4											
E	HDV-QS5											
F	CN											
G	CP-RC											
H	Probe. 1											

Probe: unbekannte RNA-Probe; HDV-QS: Positivkontrolle/Standard Hepatitis D Virus; CN: Negativkontrolle (Wasser); CP-RC: Positivkontrolle RC

Ablauf der qRT-PCR

- 3) Das Reaktionsgemisch homogenisieren und kurz zentrifugieren.
- 4) Mit den Lösungen wie folgt verfahren :



- 6) Sofort mit Klebefolie oder Kappen verschließen, um eine Kontamination zu vermeiden.
- 7) Kurz zentrifugieren, um das gesamte PCR-Reaktionsgemisch am Boden der Probenröhrchen oder Platte zu sammeln.
- 8) Am qPCR-Instrument folgende Einstellungen vornehmen:

Programm	Temperatur	Dauer	Zyklus (Zyklen)	
	46 °C	30 min	1	-
	95°C	2 min	1	-
Amplifikation	95°C	15 sec	45	-
	59°C	1 min		Fluoreszenz-Erfassung

Bei Verwendung auf anderen Geräten als dem CFX96 Real-Time PCR-Nachweissystem oder dem 7500 Real-Time PCR-System von Applied Biosystems, besteht keine Garantie für die Ergebnisse.

Um auf einem Real-Time-PCR-System eine Standardkurve zu generieren, müssen die 5 HDV-QS-Standards und Wasser (HDV=0) verwendet und unter Angabe der entsprechenden Anzahl an Molekülen/Reaktion als Standard definiert werden.

Die jeweiligen Konzentrationen der HDV-Standards (FAM-Kanal) in den Einstellungen des Thermocyclers eingeben. Die Software zeigt eine Standardkurve an und berechnet direkt die entsprechende Zahl an Molekülen der entsprechenden Reaktion. In Abhängigkeit von der Menge der eingebrachten DNA oder der biologischen Flüssigkeit (Serum oder Plasma), kann die Zahl der Kopien in die Zahl der Kopien/µg DNA oder Kopien/ml biologischer Flüssigkeit umgerechnet werden.

Die Entsprechung der Zahl der Moleküle HDV in internationalen Standardeinheiten wurde für ein RNA-Extraktionssystem validiert (siehe nachstehende Tabelle). Die Zahl der IU/ml erscheint direkt auf dem Thermocycler und das Ergebnis in IU/ml Serum oder Plasma wird umgehend berechnet. Hinsichtlich der Viruslast besteht ein leicht höherer Wert für Serum-Proben als für Plasmaproben.

HDV-QS Moleküle/ 10 Mikroliter	m2000sp Abbott Automatisches Extraktionssystem Plasma-Vol: 500 µl Elutionsvol: 110 µl PCR-Probenvol.: 10 µl
	Entsprechung IU/ml
1E+07	3,40E+08
1E+05	3,40E+06
1E+04	3,40E+05
5E+02	1,70E+04
1E+02	3,40E+03

VALIDIERUNG DES TESTS

Qualitative Analyse:

- Negativkontrolle (CN): keine nachgewiesene Amplifikation auf dem FAM-Kanal. Auf dem HEX-Kanal keine Amplifikation, doch ein schwaches Fluoreszenzsignal ist sichtbar. In diesem Fall muss der Schwellenwert gerade über dem Maximum des Signals der Negativkontrolle angesetzt werden.
- Positivkontrolle HDV-QS 1 (CP): PCR-Signal (FAM) bei 15,8 Ct (+/- 3Ct)
- RC Positivkontrolle: Ct auf dem HEX-Kanal muss ≤ 38 sein.

Quantitative Analyse:

- Negativkontrolle (CN): keine nachgewiesene Amplifikation auf dem FAM-Kanal. Auf dem HEX-Kanal keine Amplifikation, doch ein schwaches Fluoreszenzsignal ist sichtbar. In diesem Fall muss der Schwellenwert gerade über dem Maximum des Signals der Negativkontrolle angesetzt werden.
- Ct-Werte von HDV-QS-Standards auf dem FAM-Kanal müssen +/-3 Ct der Werte in der folgenden Tabelle liegen.

HDV-QS-Moleküle/10 Mikroliter	C(t) FAM
1E+07	15,8
1E+05	21,8
1E+04	24,8
0,5E+03	29,8
1E+02	31,5

- RC Positivkontrolle: Ct auf dem HEX-Kanal muss ≤ 38 sein.
- Die Effizienz der PCR auf dem FAM-Kanal muss über 90 % liegen (entsprechend einer Senkung $>-3,6$).

DATENANALYSE UND INTERPRETATION

Analyse der internen Kontrolle RC in den Proben:

Wurde RC entsprechend der Empfehlungen dieser Anleitung angewendet, sollte der CT-Wert der **RC ≤ 38 betragen**.

Zwei Ergebnisse sind für RC möglich:

1/ Der RC Kontrolltest ist positiv mit einem Ct von ≤ 38 : die RNA wurde korrekt extrahiert und es besteht kein Inhibitor der RT-PCR. Das Ergebnis kann validiert werden.

2/ Der RC Kontrolltest ist negativ oder der CT ist > 38 : entweder wurde die RNA nicht korrekt extrahiert oder die RT funktionierte nicht einwandfrei oder PCR-Inhibitoren hemmen die PCR-Reaktion. In diesem Fall wird empfohlen, die Extraktion zu wiederholen oder die Probe zu verdünnen.

(Anmerkung: Wurde keine RC verwendet, ist auf dem HEX-Kanal kein Signal zu erwarten).

Qualitative Analyse für HDV :

Positiv (+): Ct ≤ 45 (Beispiel Kurve a)

Negativ (-): Ct > 45 (Beispiel Kurve c)

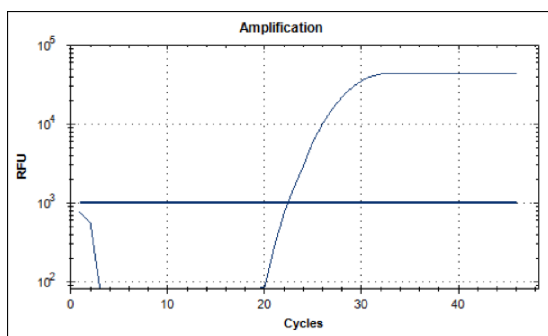
Quantitative Analyse für HDV :

Positiv (+): Ct ≤ 35 (Beispiel Kurve a)

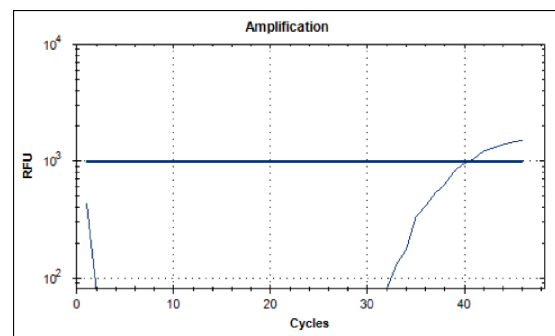
Positiv nicht quantifizierbar (PNQ): $45 \geq Ct > 35 \Rightarrow$ zeigt eine sehr geringe Virusreplikation unter der Quantifizierungsgrenze des Tests an (Beispiel Kurve b)

Negativ (-): Ct > 45 (Beispiel Kurve c)

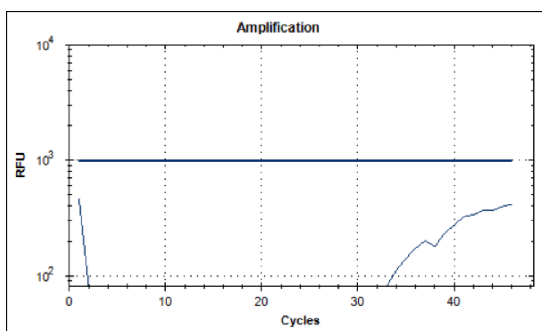
Kurve a : POSITIV



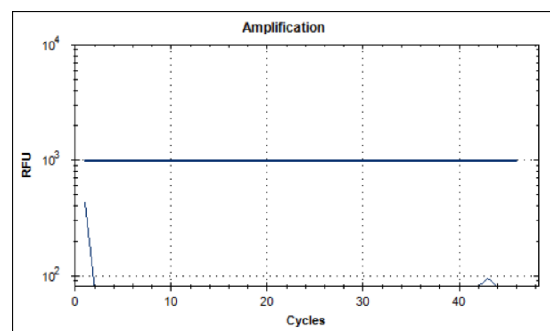
Kurve b : SCHWACH POSITIV nicht quantifizierbar (PNQ)



Kurve c : NEGATIV



oder



Zusammenfassung:

Mögliche Ergebnisse für klinische Proben:

RC Ct gültig: Ct≤38

RC Ct ungültig: Ct>38

In Abhängigkeit vom Wert des RC Ct und der Art der Analyse (qualitativ oder quantitativ), sind die HDV-Ergebnisse verwertbar oder nicht

PCR-Signal		Qualitative Analyse	Quantitative Analyse	Gültigkeit des Tests/ Kommentar
HDV (FAM)	RC (HEX)	Anwesenheit des HDV-Virus	Quantifizierung möglich	
+ Ct≤35	Ct gültig	Ja : positive Probe	Ja	Gültig für die qualitative und quantitative Analyse
+ 45≥Ct>35	Ct gültig	Ja : positive Probe	Nein: PNQ Probe	Gültig für die qualitative aber nicht für die quantitative Analyse
+ Ct≤35	Ct ungültig	Ja : positive Probe	Nein	Gültig für die qualitative aber nicht für die quantitative Analyse * Mögliche Inhibition der Extraktion oder RT- PCR, die eine Validierung der HDV- Quantifizierung verhindert
+ 45≥Ct>35	Ct ungültig	Ja : positive Probe	Nein	Gültig für die qualitative aber nicht für die quantitative Analyse * Mögliche Inhibition der Extraktion oder RT- PCR, die eine Validierung der HDV- Quantifizierung verhindert
- Ct>45	Ct gültig	Nein: negative Probe	Nein: negative Probe	Gültig für die qualitative Analyse. Keine Quantifizierung, da Probe negativ ist
- Ct>45	Ct ungültig	Interpretation nicht möglich	Interpretation nicht möglich	Weder für qualitative noch quantitative Analyse gültig * Mögliche Inhibition der Extraktion oder RT-PCR

PNQ: schwach positiv, nicht quantifizierbar

* Wenn die erwartete Information nicht aufscheint, die Probe 5x verdünnen. Erhält man das gleiche Ergebnis erneut, die Probe nochmals extrahieren.

LEISTUNGSMERKMALE

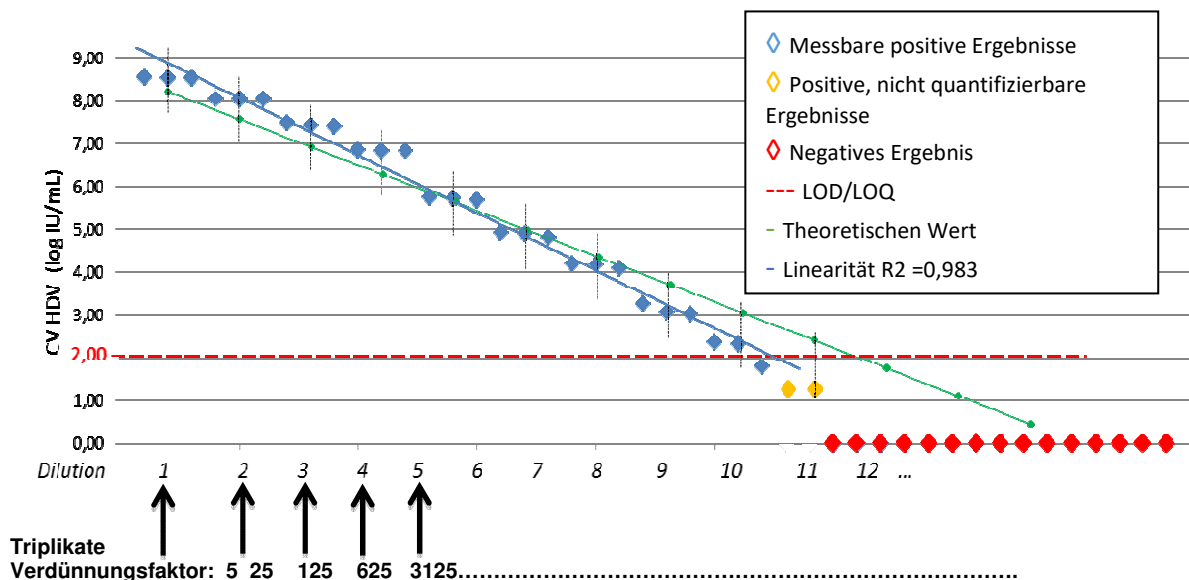
Alle nachfolgend beschriebenen Test wurden auf dem CFX96™ Real-Time PCR-Nachweissystem (Biorad) durchgeführt.

1- Analytische Sensitivität und Linearität der Quantifizierung:

Die analytische Sensitivität ist definiert als die kleinste Menge einer Zielsubstanz, die in einer Probe genau nachgewiesen werden kann. Bestimmt wurde die analytische Nachweisgrenze unter Anwendung positiver klinischer HDV-Proben in Kombination mit einer spezifischen Extraktionsmethode auf dem m2000sp-Gerät (Abbott Diagnostics, mit dem RNA-Kit von Abbott Diagnostic, gemäß Protokoll m2000-RNA-Plasma-BA-500-70-V1. Probengröße 500 Mikroliter und Elutionsvolumen 110 Mikroliter).

Die Nachweisgrenze beträgt 1^{E+02} IU/ml. Der Wert in internationalen Einheiten wurde vom Internationalen HDV-Standardwert des Paul Ehrlich-Instituts abgeleitet (erster internationaler WHO-Standard für NAT-Tests der HD-Virus-RNA WHO IS PEI: PEI code 7657/12)

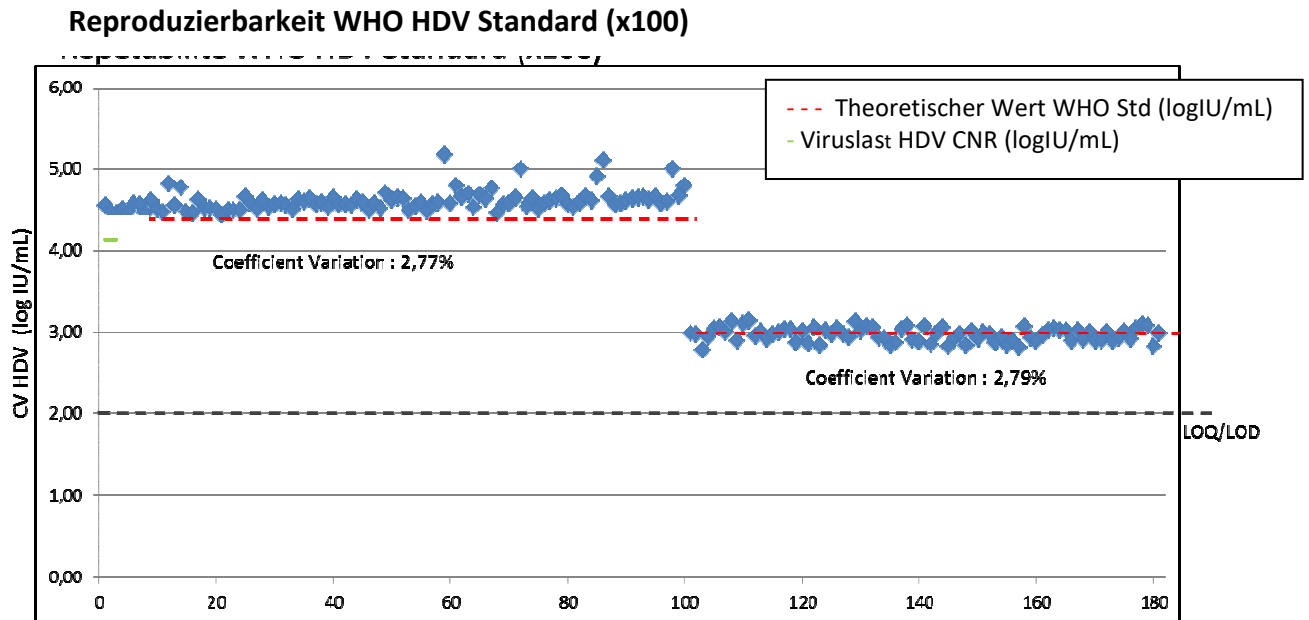
Sensitivität-Linearität der Quantifizierung: Verdünnungsreihen (1/5)



Linearität der Quantifizierung: validiert von 1^{E+02} IU/ml bis $1^{E+8,3}$ IU/ml für klinische Proben.

2- Reproduzierbarkeit innerhalb eines Tests und zwischen Tests :

Durchgeführt wurden N = 100 Replikate für 2 Konzentrationen des internationalen HDV-Standard PEI ($1^{E+04,3}$ IU/ml und 1^{E+03} IU/ml). Der Variationskoeffizient innerhalb des Tests beträgt 2,8% der log-Werte der 2 Konzentrationen.



Die Reproduzierbarkeit des Standards zwischen den Tests wurde auf dem CFX96™ Real-time PCR-Nachweissystem (Biorad) untersucht; (n = 110 Messungen): der mediane VK beträgt 3 %.

HDV-QS Moleküle/10 Mikroliter	Median C(t)	C(t) Std. Abw.	Variationskoeffizient zwischen den Tests (%) (n=13)
1^{E+07}	15,74	0,69	4,4
1^{E+05}	21,84	0,75	3,4
1^{E+04}	24,84	0,67	2,7
$0,5^{E+03}$	29,79	0,67	2,2
1^{E+02}	31,30	0,81	2,6

3-Spezifität:

***Analytische Spezifität virämischer Proben ohne HDV:**

Zur Bestimmung der analytischen Spezifität des HDV-Kits von Eurobioplex (als Ausdruck eines negativen Ergebnisses in Abwesenheit des Targets) wurden HDV-negative Plasmaproben (negativ hinsichtlich des Nachweises der Gesamtzahl an Anti-HDV-Antikörpern, jedoch mit anderen hepatotropen Viren), untersucht. Die analytische Spezifität wurde anhand von 105 Proben bestimmt, die folgende pathogene Viren enthielten: HBV (n = 75), HIV (n = 10), HCV (n = 10), HAV (n = 5) oder HEV (n=5).

Die 105 mit den Eurobioplex HDV-Kits getesteten Proben ergaben keine falsch positiven Ergebnisse.

4- Spezifität und Sensitivität :

***Sensitivität gegenüber den verschiedenen HDV-Genotypen:**

Aufgrund von Abweichungen in den Nukleotiden innerhalb des Genoms (20-35 %) wurden 8 unterschiedliche Genotypen (HDV-1 bis HDV-8) definiert⁷⁻⁸. Jeder virale Genotyp stammte aus einer Region und wird mittlerweile einem definierten geographischen Gebiet zugeordnet. HDV-1 ist weltweit verbreitet, HDV-2 findet man in Japan, Taiwan und Jakutien (Russland); HDV-3 kommt ausschließlich in Südamerika vor; HDV-4 in Taiwan und Japan, und HDV-5 bis HDV-8 in Subsahara-Afrika. Aufgrund von Migrationsbewegungen können diese Genotypen potenziell überall auftreten⁷⁻⁸. Die Leistung des HDV-Kits von Eurobioplex wurde an 139 HDV-positiven RNA-Proben mit allen viralen Genotypen sowie anhand von 12 HDV-negativen RNA-Proben bestimmt, wobei diese Untersuchungen vom nationalen französischen Referenzlabor für HDV durchgeführt wurden (CNR Delta-FNRL, Emmanuel Gordien, PhD.).

Die folgenden Proben wurden in diese Studie aufgenommen: 33 HDV-1 Afrika; 61 HDV-1 Europa/Asien; 1 HDV-2; 1 HDV-3; 1 HDV-4 (Plasmid, das ein vollständiges Genom enthält); 22 HDV-5; 7 HDV-6; 10 HDV-7 und 3 HDV-8. Die Quantifizierung dieser 139 Proben wurde mittels CNR Delta-Methode und dem HDV EBX-004-Kit von Eurobioplex vorgenommen.

Die 12 negativen Proben waren bei beiden Methoden negativ.

Elf Proben mit sehr geringer Viruslast (nahe der Quantifizierungsgrenze) konnten mit 2 Methoden (n = 3) oder mit einer der beiden Methoden nachgewiesen werden - Eurobioplex HDV (n = 5) sowie CNR Delta (n = 3)

Bei allen anderen Proben erfolgte Nachweis und Quantifizierung mittels beider Methoden. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von $R^2=0,8$ errechnet, wodurch die ausgezeichnete Korrelation zwischen den Ergebnissen ungeachtet des viralen Genotyps bestätigt wird. Die Medianwerte beider Methoden lagen mit 5,16 logUI/ml für CNR Delta und 5,05 logUI/ml für Eurobioplex HDV sehr nahe aneinander.

*** Gesamt-Sensitivität und Spezifität**

Insgesamt wurden 610 Proben zur Bestimmung der klinischen/diagnostischen Sensitivität und Spezifität untersucht.

n=610		<i>Eurobio</i>	
		Pos	Neg
<i>CNR</i>	Pos	389	9*
	Neg	14*	198

* Proben mit sehr geringer Viruslast < 3logUI/mL

Klinische Spezifität : $198 / (198+14) = 93,4 \%$

Klinische Sensitivität : $389 / (389+9) = 97,7 \%$

LITERATUR

- (1) Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, Verme G. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18: 997-1003.
- (2) Brazas R, Ganem D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: implications for viral replication and evolution. *Science* 1996; 274:90-94.
- (3) Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, Hanslik , Alloui C, Dény P, Gault E. Quantification of Hepatitis Delta Virus RNA in Serum by Consensus Real-Time PCR Indicates Different Patterns of Virological Response to Interferon Therapy in Chronically Infected Patients. *J. Clin. Microbiol* 2005; 43: 2363–2369.
- (4) Zachou K, Yurdaydin C, Drebber U, Dalekos GN, Erhardt A, Cakaloglu Y, Degertekin H, Gurel S, Zeuzem S, Bozkaya H, Schlaphoff V, Dienes HP, Bock TC, Manns MP, Wedemeyer H; HDT-1 Study Group. Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis. *Liver Int.* 2010; 30:430-437.
- (5) EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. European Association for the Study of the Liver. *J. Hepat.* 2012; 57: 167–185
- (6) Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, Dény P. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1447-1450.
- (7) Chudy M, Development of the 1st International Standard for Hepatitis D Virus RNA –an update. 24th blood virology meeting, Ljubljana, 8-9 May 2013.
- (8) Manesis EK, Schina M, Le Gal F, Agelopoulou O, Papaioannou C, Kalligeros C, Arseniou V, Manolakopoulos S, Hadziyannis ES, Gault E, Koskinas J, Papatheodoridis G, Archimandritis AJ. Quantitative analysis of hepatitis D virus RNA and hepatitis B surface antigen serum levels in chronic delta hepatitis improves treatment monitoring. *Antivir Ther.* 2007;12: 381-388.
- (9) Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, Schalm SW. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut.* 2000 Mar;46(3):420-6.
- (10) Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anaïs P, Drugan T, Trinchet JC, Roulot D, Tamby M, Milinkovitch MC, Dény P. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *J Virol.* 2004 Mar;78(5):2537-44.
- (11) Castelnau C, Le Gal F, Ripault MP, Gordien E, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Pham BN, Maylin S, Bedossa P, Dény P, Marcellin P, Gault E. Efficacy of peginterferon alpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up. *Hepatology.* 2006 Sep;44(3):728-35.
- (12) Brichler S, Le Gal F, Butt A, Chevret S, Gordien E. Commercial real-time reverse transcriptase PCR assays can underestimate or fail to quantify hepatitis delta virus viremia. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jun;11(6):734-40
- (13) Brichler S, Le Gal F, Neri-Pinto F, Mansour W, Roulot D, Laperche S, Gordien E. Serological and molecular diagnosis of hepatitis delta virus infection: results of a French national quality control study. *J Clin Microbiol.* 2014 May;52(5):1694-7.

ABFALLENTSORGUNG

Die Entsorgung des Abfalls hat gemäß der gesetzlichen Bestimmungen für die Beseitigung von klinisch infektiösem Material zu erfolgen.

SYMBOLE

	Bestellnummer
	Chargennummer
	Höchste Lagertemperatur
	Verwendbar bis
	Inhalt reicht für « N » Reaktionen
	Vor Licht schützen
	Hersteller
	Produkt mit CE-Kennzeichnung von der französischen benannten Stelle LNE GMED
	In-vitro-Diagnostik
	Gebrauchsanleitung



eurobio
SCIENTIFIC
7, avenue de Scandinavie
91940 Les Ulis Cedex
FRANCE
+33 1 69 79 64 80