

BIOLOGIA MOLECOLARE

NLM 7119

VER 03/06/2014

TOTALE PAGINE 20

REF AC004/24

24 TEST

CND W01050203

AMPLIFICAZIONE: AA910/48 o AA896/48.
ESTRAZIONE: AA1318 NON COMPRESA

GEN-C 2.0

Ibridazione inversa su striscia

CE

0459

IVD



NUCLEAR LASER MEDICINE S.r.l.

UFFICI OPERATIVI: Viale delle Industrie, 3 – 20090 SETTALA MI (Italy)

Tel (+39) 02/95. 24. 51 - Fax (+39) 02/95. 24. 52. 37

SITO INTERNET: www.nlm.it – E-MAIL: info@nlm.it

⇒ UTILIZZO

Gen-C 2.0 è un saggio ad ibridazione inversa su striscia che permette la genotipizzazione del virus dell'epatite C. Il test consente di genotipizzare i genotipi e sottotipi virali più comuni, identificandoli sulla base delle variazioni trovate nelle regioni 5' non tradotta (5' UTR) e Core del genoma di HCV.

Il kit prevede l'utilizzo di campioni amplificati con i dispositivi cod. NLM AA910/48 , AA896/48.

Al fine di ottenere risultati ottimali utilizzare esclusivamente campioni con titolo compreso tra 5×10^3 e 8×10^6 (se necessario diluire il plasma dei campioni con titolo $> 8 \times 10^6$ prima dell'estrazione di RNA)

Sulla base di analisi *in silico* il saggio è in grado di distinguere i genotipi 1, 2, 3,4 e 6, e i sottotipi 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g,f,q, 6m e 7a.

I risultati ottenuti con il presente kit devono essere intesi come guida nella selezione di tipologia e durata della terapia antivirale in soggetti con infezione cronica da HCV. Il dispositivo pertanto non va utilizzato come test di screening per la presenza di HCV RNA o come test di conferma per la diagnosi di infezione da HCV.

⇒ INTRODUZIONE

Un elevato numero di pazienti affetti da HCV sviluppa un'epatite cronica che spesso progredisce in cirrosi epatica e talvolta in carcinoma epatocellulare (1). Il genoma di HCV è a singolo filamento di RNA comprendente circa 9400 nucleotidi. I domini Core, Envelope e Non Strutturale costituiscono la regione codificante del genoma fiancheggiata in corrispondenza delle estremità 5' e 3' da regioni non tradotte (UTR) altamente conservate.

L'eterogeneità delle regioni codificanti e non, determina la classificazione del virus in diversi genotipi (2-3); la nomenclatura prevede la classificazione di HCV in genotipi, che differiscono del 31-33% a livello nucleotidico, e sottotipi, che differiscono del 20-25%.

Questa nomenclatura, internazionalmente riconosciuta e definita secondo Simmonds (4), definisce i seguenti tipi e sottotipi: dall'1a all'1c, dal 2a al 2d, dal 3a al 3k (che in passato corrispondeva al genotipo 10a), dal 4a al 4k, 5a, 6a-q e 7a. La regione 5'UTR contiene regioni variabili tra i diversi genotipi che possono fornire informazioni precise sulla genotipizzazione dei tipi 1-5, 6a-b e 7a, ma non distingue in modo accurato i sottotipi 6g,f,q, 6m e 1a e 1b. Sono stati aggiunti elementi della regione Core alla 5'UTR in modo tale da identificare i genotipi 6g,f,q e migliorare l'accuratezza della distinzione tra 1a e 1b (10-11).

Trattamento con interferone alfa

Diversi studi clinici hanno dimostrato che i vari genotipi di HCV rispondono in modo differente alla terapia interferonica. In particolare le infezioni da HCV di genotipi 1b mostrano una percentuale di non responder molto alta (90%), mentre i genotipi 1a, 2a, 2b e 3a hanno una più alta percentuale di risposta a lungo termine, che va dal 50 all'80% dei casi. Al genotipo 1b viene inoltre associata una più rapida evoluzione della malattia da epatite cronica attiva a cirrosi ed epatocarcinoma (5, 6).

Il buon esito della terapia è influenzato anche da altri fattori quali l'età, il sesso e la durata della malattia (6). L'impiego di nuovi farmaci (Ribavirina), congiuntamente all'Interferone alfa, ha incrementato la percentuale di successi terapeutici (7-9).

Da queste premesse si evince come la genotipizzazione di HCV sia uno dei parametri diagnostici utili ad una corretta e più efficace impostazione dei protocolli terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

1. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 2011 vol.55: 245-264.
2. Nizar N. Zein. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2000, p.223-235.
3. Verbeeck J., et al. Use of a Commercially Available Line Probe Assay for Genotyping of Hepatitis C Virus 5a Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, Dec. 2005, p.6117-6119
4. Simmonds et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, vol. 42, n° 4, 2005.
5. Hino K, Yamaguchi Y, Fujiwara D, Katoh Y, Korenaga M, Okazak, Ohuda M, Okita K. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study. *J Viral Hepat* 2000; 7:36-42.
6. Khan MH, Farrell GC, Byth K, Lin R, Weltman M, George J et al. Which patients with hepatitis C develop liver complications. *Hepatology* 2000; 31:513-520.
7. Guideline on clinical evaluation of medicinal products for the treatment of chronic hepatitis C. *European Medicines Agency*. Jan. 2011
8. Hadziyannis SJ. Why and how treat chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol* 2000; 14 suppl B:45B-48B
9. Griso D., Rivanera D, Lilli D., Macri A., Biolcati G., Piunno M., Misogano N., Lozzi M.A., Mancini C.. Role of viral hepatitis infection in Italian patients with sporadic and familial porphyria cutanea tarda. Millenium meeting on porphyrins and porphyrias 2000. Institut Pasteur Paris – France. September 10-13, 2000.
10. P.T. Hraber et al. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology Journal* 2006, 3:103
11. M. A. Ansari et al. HCV-Core Region: Its Significance in HCV-Genotyping and Type Dependent Genomic Expression. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2012 Mar 15; 5(1):30-39.

PRINCIPIO DEL METODO

Il test si basa sul principio dell'ibridazione inversa su striscia. Gli amplificati biotinilati, ottenuti dalla retrotrascrizione e amplificazione delle regioni 5'UTR e Core di HCV RNA, sono ibridati alle sonde specifiche legate al supporto di nitrocellulosa attraverso una coda di poliT. Gli ibridi biotinilati sono successivamente rivelati utilizzando la streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina, mentre gli amplificati non ibridati vengono rimossi in seguito a lavaggi. In seguito il substrato (BCIP/NBT) reagisce con il complesso streptavidina-fosfatasi alcalina formando un precipitato scuro e colorando le bande specifiche sulla striscia.

COMPOSIZIONE DEL PRODOTTO

REAGENTI (2-8°C)	CODICE NLM	QUANTITA'	N° VIAL
Strisce Membrana di nitrocellulosa rivestite con oligonucleotidi	KC029	24	1
DNAT R36/38* Soluzione denaturante contenente NaOH	KA107	1 ml	1
Ibridazione Soluzione salina contenente conservanti	KA102	60 ml	1
Lavaggio Stringente Soluzione salina contenente detergenti e conservanti	KA573	175 ml	1
Lavaggio B Soluzione salina contenente conservanti	KA105	175 ml	1
Coniugato Soluzione contenente streptavidina marcata con fosfatasi alcalina, stabilizzanti e conservanti	KA574	60 ml	1
Sviluppatore di colore Soluzione contenente 5-bromo-4-cloro3-indolil-fosfato e 4-nitro blu di tetrazolio	AA564	60 ml	1
Vaschette Supporti in plastica	DC000	3	
Tabella interpretativa Foglio che fornisce le tipologie di bande per l'identificazione dei genotipi		1	
Mascherina interpretativa Foglio utilizzato per individuare le bande positive su una striscia		1	

*Irritante per gli occhi e la pelle

⇒ MODULARITÀ

La modularità prevista è di massimo 3 sedute.

L'esecuzione di un minor numero di test per seduta comporta l'insufficienza dei reagenti per poter effettuare tutti i test previsti.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

- Tutti i reagenti chiusi o aperti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati alla temperatura indicata.
- Alla fine di ogni seduta riporre i reagenti alla corretta temperatura.
- Tenere il kit lontano da fonti di contaminazione quali RNA, cDNA o DNA amplificato.
- Le strisce sviluppate devono essere protette dall'esposizione alla luce solare e tenute a temperatura ambiente (+15/+30°C).
- La DNAT deve essere chiusa immediatamente dopo l'uso.

PRECAUZIONI

- La procedura va eseguita da personale competente, utilizzando le buone pratiche di laboratorio ed i comuni dispositivi di protezione individuale.
- Tutti i consumabili (puntali e provette) utilizzati nella fase di amplificazione devono essere sterili. In presenza di campioni di DNA o prodotti di PCR utilizzare puntali con filtro per evitare la contaminazione delle pipette.
- Eliminare il materiale monouso utilizzato, i guanti indossati e tutti i reattivi come rifiuti speciali.
- Le vaschette possono essere riutilizzate al massimo 2 volte, se ben lavate con candeggina e poi acqua al termine della rivelazione.
- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree preposte all'esecuzione del test.
- Se vi è esposizione di occhi, cute o mucose alle sostanze utilizzate, lavare abbondantemente con acqua e contattare al più presto un medico.
- Non utilizzare reagenti scaduti.
- Le strisce non utilizzate sono stabili fino alla data di scadenza se tenute a +2/+8°C e protette dall'esposizione alla luce.
- Non mischiare reagenti di lotti diversi.
- Tenere i reagenti separati da possibili acidi nucleici contaminanti (campioni e prodotti di amplificazione).
- Prestare attenzione alla modularità del dispositivo. L'utilizzo del kit con una modularità inferiore determina l'insufficienza dei reagenti per poter eseguire tutti i test previsti.
- Si consiglia di eseguire l'analisi in tre aree separate:
 - Area 1: pre-PCR (manipolazione dei campioni ed estrazione)
 - Area 2: preparazione della Master Mix
 - Area 3: post PCR (PCR e rivelazione)
- Frasi di rischio associate ad alcuni componenti:
 - R36/38: irritante per gli occhi e la pelle
- Non utilizzare il kit se la scatola è danneggiata; contattare il fornitore.
- **E' opportuno assicurare una temperatura il più possibile costante ed uniforme in laboratorio ed evitare di posizionare gli strumenti in prossimità di fonti di calore/raffreddamento che possano comprometterne il corretto funzionamento.**
- **Utilizzare la mascherina interpretativa del lotto corrispondente**

CONSERVAZIONE DEGLI AMPLIFICATI

Gli amplificati ottenuti con i dispositivi AA910/48 ver. 2.0 o AA896/48 ver. 2.0 devono essere congelati a -15/-25°C se non utilizzati in giornata, altrimenti possono essere riposti a +2/+8°C.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Bagnomaria con coperchio inclinato, agitazione (50-100 rpm) e programmabile a 46°C ± 0,5°C o **Tecan ProfiBlot 48 con software ver. 1.xx**
- Termometro calibrato
- Acqua distillata o deionizzata
- Puntali e pipette dedicate
- Pinzette pulite per maneggiare le strisce
- Sistema di aspirazione

PROCEDIMENTO

⇒ RIVELAZIONE IN MANUALE

- Regolare il livello dell'acqua nel bagnomaria in modo che raggiunga circa 2/3 dell'altezza della vaschetta.
- Impostare la temperatura a **46°C** e verificare che rientri nell'intervallo indicato ($46^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) utilizzando un termometro calibrato.
- Preriscaldare l'Ibridazione ed il Lavaggio Stringente a **46°C**; assicurarsi che il precipitato eventualmente presente sia completamente sciolto prima dell'utilizzo.
- Lasciar equilibrare a temperatura ambiente il DNAT, il Coniugato, il Lavaggio B e lo Sviluppatore di colore.
- Prelevare una striscia per ciascun campione utilizzando le pinzette (non toccare mai le strip senza guanti) e contrassegnarla utilizzando una matita (non usare penne a sfera, etc).
Attenzione: non far seccare le strisce durante l'intera procedura.

Ibridazione (46°C)

- Dispensare in ciascuna vaschetta del vassoio **10 µl** di **DNAT**.
Attenzione: non utilizzare il DNAT se non si presenta di colore blu.
- Per ciascun campione aggiungere **10 µl** di **amplificato** e miscelare bene con la pipetta: la soluzione rimarrà blu.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.
- Aggiungere ad ogni campione **1 ml** di **Ibridazione** (preriscaldata a 46°C) ed agitare leggermente: il colore blu scompare.
- Immergere completamente ciascuna striscia nella lane della vaschetta contenente il rispettivo amplificato. Fare attenzione a mettere le strisce con le marker lines rivolte verso l'alto.
- Incubare per **30 minuti** a **46°C** nel bagnomaria mantenendo le strisce in agitazione (50 rpm circa). Tenere il bagnomaria chiuso con un coperchio per evitare variazioni di temperatura.

Lavaggio Stringente (46°C)

- Rimuovere il vassoio dal bagnomaria; inclinarlo leggermente ed aspirare l'Ibridazione utilizzando una pipetta o un sistema di aspirazione a vuoto. Aspirare il liquido cercando di non danneggiare le strisce.
- Aggiungere ad ogni campione **1 ml** di **Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 46°C) ed agitare a mano per qualche secondo.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 46°C).
- Incubare per **15 minuti** a **46°C** nel bagnomaria in agitazione (50 rpm circa).
Attenzione: riporre il Lavaggio Stringente nel bagnomaria durante l'incubazione.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio Stringente** (preriscaldato a 46°C).
- Incubare per **15 minuti** a **46°C** nel bagnomaria in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare la soluzione.

Sviluppo del colore (temperatura ambiente)

Tutte le successive incubazioni vengono effettuate a temperatura ambiente e con agitazione. Poiché l'acqua del bagnomaria impiega troppo tempo a scendere da 46°C alla temperatura ambiente, utilizzare la sola funzione di agitazione isolando le vaschette dall'acqua ad esempio adagiando una tavoletta di polistirolo sul coperchio del bagnomaria.

- Aggiungere **1 ml** di **Coniugato**.
- Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente mantenendo le strisce in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare il liquido, aggiungere **1 ml** di **Lavaggio B** ed agitare a mano per qualche secondo.
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio B**.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Lavaggio B**.
- Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa).
- Aspirare ed aggiungere **1 ml** di **Sviluppatore di colore**.
- Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente in agitazione (50 rpm circa) al riparo dalla luce.
- Aspirare e lavare le strisce diverse volte con acqua distillata.
- Lasciare asciugare bene le strisce su carta assorbente al riparo dalla luce prima di procedere con l'interpretazione dei risultati.

⇒ RIVELAZIONE IN AUTOMATICO

La rivelazione può essere eseguita in automatico (*Tecan ProfiBlot 48 con software ver. 1.xx*), richiamando il programma “**Tipizza P**”: in questo caso prevedere l'utilizzo di **10 µl di amplificato + 10 µl di DNAT** e 1,5 ml di ciascun reagente per ogni campione.

RISULTATI

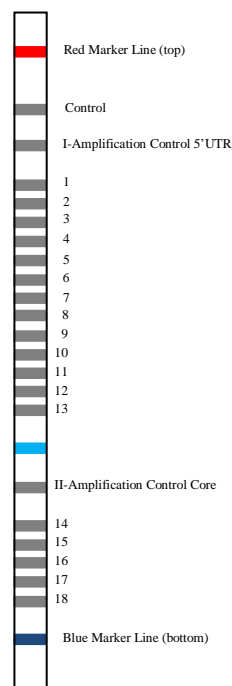
Validazione

La prima linea (controllo del coniugato) verifica la corretta esecuzione di rivelazione. Questa linea deve sempre essere positiva e deve avere approssimativamente la stessa intensità su ogni striscia della seduta. L'intensità di colorazione tra le altre linee di una striscia può variare da una linea all'altra, questo non interferisce con una corretta interpretazione di risultati.

Interpretazione dei risultati

- La prima linea sulla striscia è il controllo del coniugato (controllo di rivelazione) che deve essere allineata con la linea di controllo del coniugato sulla mascherina interpretativa.
- Le linee I e II (controlli di amplificazione, rispettivamente: I- della regione 5'UTR e II- della regione Core) accertano l'aggiunta del materiale amplificato per l'ibridazione e quando positive indicano l'avvenuta amplificazione della regione corrispondente; queste linee sono infatti positive quando è presente il prodotto di PCR biotinilato amplificato specifico per la regione corrispondente. La negatività di queste linee indica l'assenza di tale amplificato.
- Identificare tutti i numeri delle linee positive sulla striscia ed individuare il genotipo utilizzando le tabelle di interpretazione (vedere anche paragrafo sulla sensibilità diagnostica per approfondimenti sui genotipi).

⇒ Schema striscia:



La parte A della tabella di interpretazione mostra le possibili combinazioni di risultati ottenibili sulla base della regione 5'UTR; la parte B mostra invece le possibili combinazioni di risultati ottenibili sulla base della regione Core.

- Se per la regione 5'UTR il campione rientra nelle combinazioni dei genotipi **2,3,4,5, 6a-b o 7a** non vi è la necessità di proseguire con l'analisi della regione Core. E' possibile che si osservi positività sulle linee Core **14-18**, ma queste **non** devono essere prese in considerazione nell'interpretazione dei risultati.
- Se invece per la regione 5'UTR il campione rientra nelle combinazioni dei genotipi **1 o 6c-q**, bisogna proseguire con l'interpretazione dei risultati sulle bande della regione Core e refertare **esclusivamente** il risultato associato alla tipologia indicata dal risultato della regione Core (es. se un campione risulta genotipo 1b nella regione 5'UTR, ma **1a nel Core, va refertato come 1a**).

In presenza dei genotipi 2,3,4,5 e 7 è possibile non vedere nessun segnale sulle sonde della regione Core oppure vedere dei segnali che non vanno però in alcun modo interpretati:

Sonde Core	Genotipi che possono dare un segnale
14	4, 5a
15	/
16	2c, 4a, 5a
17	3
18	2, (3), 5a

PROBLEMI

- 1. Segnali falsi negativi o eccessivamente deboli eccetto la linea del controllo del coniugato.**
 - Un segnale debole sulla striscia può essere dovuto sia a campioni troppo concentrati ($>8 \times 10^6$) (nel caso di alti titoli il DNA in eccesso inibisce la PCR: è necessario quindi diluirli), sia a campioni con titoli inferiori alla sensibilità del test.
 - Segnali più deboli in tutta la seduta (tranne la linea del controllo del coniugato) e reazioni false negative con le sonde possono essere causate da temperature troppo alte durante l'ibridazione e il lavaggio stringente. Controllare attentamente la temperatura del bagnetto.
 - Ibridazione e lavaggio stringente non sono stati scaldati o miscelati adeguatamente. Le soluzioni rimanenti nei contenitori devono essere eliminate. Ripetere il test utilizzando soluzioni nuove.
- 2. Segnali falsi positivi**
 - Si possono ottenere segnali aspecifici sulla striscia se la temperatura dell'acqua era troppo bassa durante l'ibridazione e il lavaggio stringente.
 - Ibridazione e lavaggio stringente non sono stati scaldati o miscelati adeguatamente. Le soluzioni rimanenti nei contenitori devono essere eliminate. Ripetere il test utilizzando soluzioni nuove.
 - Se si vede lo stesso segnale aspecifico su tutte le strisce, corrispondente a un dato genotipo, ripetere l'intera procedura con nuovi reagenti. In caso di contaminazione infatti è importante scoprirne l'origine: estrazione, RT e PCR o contaminazioni derivanti da altri amplificati. L'utilizzo di controlli negativi e positivi di HCV possono essere utili nel trovare la causa di contaminazione.
- 3. Decolorazione e macchie bianche al centro della striscia o colorazione non omogenea.**

La velocità di agitazione durante la rivelazione è troppo bassa. Ripetere lo sviluppo della colorazione sulle stesse strisce aumentando la velocità e assicurandosi che le strisce siano completamente sommerse nel liquido.
- 4. Comparsa di bande differenti dal modello presentato sulla lista di tipizzazione**
 - Sono positive le sonde di due diversi genotipi/sottotipi: indicare il campione come co-infezione.
 - Altri risultati: contattare il distributore. In rari casi infatti possono generarsi combinazioni di bande non interpretabili. Ciò può essere dovuto all'eterogeneità del genoma di HCV ed alla facilità di ricombinazioni (ceppi ricombinanti).

⇒ CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Specificità diagnostica

La specificità del kit Gen-C 2.0 è stata determinata analizzando 103 campioni di plasma negativo per HCV provenienti da amplificati con i kit di riferimento. Non sono stati ottenuti risultati falsi positivi. In accordo con tali dati la specificità del kit è pari al 100%.

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica del kit Gen-C 2.0 è stata valutata utilizzando campioni di plasma provenienti da soggetti HCV-positivi ed amplificati con i kit NLM cod. AA910/48 ver. 2.0 .

Come riportato nella tabella interpretativa, dal punto di vista dell'analisi delle sequenze il dispositivo è in grado di distinguere i genotipi 1, 2, 3, 4, 6, ed i sottotipi 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g, 6f-q, 6m e 7a.

La validazione del kit è stata effettuata con i seguenti campioni reali: 1a, 1b, 2a/2c, 3, 3a, 4, 4c/4d, 5a e 6a. I titoli virali erano compresi tra 2×10^3 e 1×10^7 UI/ml.

La capacità del test Gen-C 2.0 di genotipizzare correttamente i campioni è stata valutata comparando i risultati con quelli ottenuti mediante Gen-C (genotipi 2-5) o sequenziamento dei singoli campioni ed analisi filogenetica comparativa mediante database di sequenza (per i sottotipi 1a e 1b).

Per i campioni difficilmente reperibili (genotipi 5a e 6a) sono stati utilizzati pannelli di riferimento internazionali.

L'analisi è stata valutata sia a livello del genotipo sia a livello dei sottotipi a e b del genotipo 1.

215/215 campioni hanno dato esito positivo e corretto, dando una sensibilità complessiva del 100%.

115/115 campioni di genotipo 1 analizzati sono risultati concordanti con il sequenziamento. La sensibilità a livello dei sottotipi 1a e 1b è pertanto pari al 100% (115/115).

Tabella riassuntiva dei genotipi analizzati e concordanza:

Genotipo	Numero di campioni	Concordanti con metodo di riferimento (Gen-C, sequenziamento o pannello)
1a	25	25
1b	90	90
2a/2c	37	37
3a	22	22
3	10	10
4c/4d	21	21
4	2	2
5a	6	6
6a/6b	2	2

Riproducibilità

- INTRASAGGIO:

La riproducibilità Intrasaggio è stata testata utilizzando 3 campioni di 3 differenti genotipi in 3 replicati. Gli stessi campioni sono stati testati con due differenti lotti del kit Gen-C 2.0 da due differenti operatori.

- INTERSAGGIO:

La riproducibilità Intersaggio è stata testata utilizzando 3 campioni con 3 differenti genotipi da 3 differenti operatori in diverse sedute e utilizzando 3 lotti diversi del kit.

I test sono stati eseguiti secondo quanto descritto in metodica e la riproducibilità è stata del 100%.

LOT

Numero di lotto

REF

Codice



Limiti di
temperatura



Usare entro



Consultare le
istruzioni d'uso



Conformità
europea



Prodotto da



Irritante

IVD

Dispositivo medico-
diagnostico *in vitro*



Contenuto
sufficiente
per <x> tests



Tenere al riparo
dalla luce solare

REF AC004/24

24 TEST

GMDN 30742

AMPLIFICATION: AA910/48 or AA896/48
EXTRACTION: AA1318 NOT INCLUDED

GEN-C 2.0

Reverse Hybridization Strip Assay

CE

0459

IVD



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

⇒ INTENDED USE

Gen-C 2.0 is an *in vitro* line probe assay for the genotyping of hepatitis C virus. The assay discriminates between HCV genotypes on the basis of variations in the 5'-UTR and Core regions. The assay works with amplicons obtained with NLM code AA910/48 or AA896/48. For optimal results it is strictly recommended to use samples with viral load between 5×10^3 and 8×10^6 (if necessary dilute high viral load plasma before the RNA extraction).

On the basis of the *in silico* sequence analysis, the device is able to distinguish genotypes 1, 2, 3, 4 and 6, and subtypes 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g,f,q, 6m and 7a.

The result of this assay should be intended as an aid in selecting type and length of antiviral therapy for patients with chronic HCV infection. Therefore the device is not intended for use as a screening test for the presence of HCV RNA or as a diagnostic test to confirm the presence of HCV infection.

⇒ INTRODUCTION

A very high number of HCV-infected patients develop chronic hepatitis which often results in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (1). HCV genome is a linear single strand RNA consisting of about 9400 nucleotides. The Core, Envelope and non-structural domains form the coding region of the genome, flanked in 5' and 3' by highly conserved untranslated regions (UTR).

The genetic heterogeneity of coding and untranslated regions determines the classification of HCV into different genotypes (2,3). Current nomenclature allows the classification in: genotypes, which have nucleotides difference of about 31-33%, and subtypes, that exhibit nucleotide differences of about 20-25%. This nomenclature system is widely used by the international scientific community (4) and define the following genotypes: 1a to 1c, 2a to 2d, 3a to 3k (previously defined as 10a), 4a to 4k, 5a, 6a-q 7a. The 5'UTR region is characterized by variable regions among the different HCV genotypes that are useful for distinguishing types 1-5, 6a-b and 7a, but is not able to differentiate accurately subtypes 6g,f,q, 6m and subtypes 1a and 1b. Core region elements were added to better identify these types and to improve genotype 1 subtyping accuracy (10-11).

IFN- α treatment

Results from many clinical studies regarding interferon (IFN) treatment of chronic HCV indicated that different genotypes respond in a dissimilar way if treated with IFN- α . In particular genotype 1b HCV infection could not be efficiently treated with IFN- α (less than 10% of treated patients with a long-term response), while genotypes 1a, 2a, 2b, and 3a responded favorably (between 50 and 80% long-term response). It has been demonstrated that genotype 1b infections proceed much faster to severe forms of chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (5,6). Treatment response is dependent by age, sex, and duration of disease (6). New drugs like Ribavirin together with IFN- α improved the number of therapeutic success (7-9). Discrimination of HCV subtypes is of great diagnostic importance since it helps to find more correct, more effective and personalized therapeutic protocols.

REFERENCES

1. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 2011 vol.55: 245-264.
2. Nizar N. Zein. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 2000, p.223-235.
3. Verbeeck J., et al. Use of a Commercially Available Line Probe Assay for Genotyping of Hepatitis C Virus 5a Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, Dec. 2005, p.6117-6119
4. Simmonds et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, vol. 42, n° 4, 2005.
5. Hino K, Yamaguchi Y, Fujiwara D, Katoh Y, Korenaga M, Okazaki, Ohuda M, Okita K. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study. *J Viral Hepat* 2000; 7:36-42.
6. Khan MH, Farrell GC, Byth K, Lin R, Weltman M, George J et al. Which patients with hepatitis C develop liver complications. *Hepatology* 2000; 31:513-520.
7. Guideline on clinical evaluation of medicinal products for the treatment of chronic hepatitis C. *European Medicines Agency*. Jan. 2011
8. Hadziyannis SJ. Why and how treat chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol* 2000; 14 suppl B:45B-48B
9. Griso D., Rivanera D, Lilli D., Macri A., Biolcati G., Piunno M., Misogano N., Lozzi M.A., Mancini C.. Role of viral hepatitis infection in Italian patients with sporadic and familial porphyria cutanea tarda. Millenium meeting on porphyrins and porphyrias 2000. Institut Pasteur Paris – France. September 10-13, 2000
10. P.T. Hrabec et al. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology Journal* 2006, 3:103
11. M. A. Ansari et al. HCV-Core Region: Its Significance in HCV-Genotyping and Type Dependent Genomic Expression. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2012 Mar 15; 5(1):30-39.

⇒ PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

The test is based on reverse-hybridization principle. Biotinylated amplicons, generated by RT-PCR of the 5'-UTR and Core regions of HCV RNA, are hybridized to specific probes that are bound to nitrocellulose strip by a poly-T tail.

Biotinylated hybrids are then detected using streptavidin bound to alkaline phosphatase; amplicons that are not complementary are washed out. Then the substrate reacts with the streptavidin-alkaline phosphatase complex forming a purple precipitate and colouring banding pattern on the strip.

PRODUCT COMPOSITION

REAGENTS (2-8°C)	NLM Code	Quantity	N° VIAL
Strips Nitrocellulose membranes coated with oligonucleotides	KC029	24	1
DNAT R36/38* Denaturation solution containing NaOH	KA107	1 ml	1
Hybridization Saline Solution containing preservatives	KA102	60 ml	1
Stringent Wash Solution Saline solution containing detergent and preservatives	KA573	175 ml	1
Wash Solution B Saline Solution containing preservatives	KA105	175ml	1
Conjugate Solution containing streptavidin-labeled with alkaline phosphatase, stabilizers and preservatives	KA574	60 ml	1
Color developer Solution containing 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and 4-Nitroblue tetrazolium	AA564	60 ml	1
Plastic Trays	DC000	3	
Interpretation chart Sheet that provides banding patterns for identification of genotypes		1	
Transparent interpretation card		1	

*Irritating to eyes and skin

⇒ MODULARITY

Reagents are provided for max. 3 distinct runs. If modularity isn't respected reagents could not be enough for the number of tests declared.

STORAGE AND STABILITY

- All opened or unopened reagents are stable up to the expiry date indicated on the label when stored at the correct temperature.
- At the end of each assay store reagents at the correct temperature.
- The kit should be kept isolated from any source of contaminating DNA especially amplified products.
- Developed dry strips should be stored in the dark at room temperature (+15/30°C).
- The vial containing the DNAT Solution should be closed immediately after use.

PRECAUTIONS

- Only professional and opportunely trained personnel should use this kit. Handle this product according to established good laboratory practices and universal precautions; wear personal protective apparel.
- All disposable items (tips and tubes) used during amplification step have to be sterile. When handling DNA samples or amplification products, use aerosol-resistant pipette tips to avoid pipettes contamination.
- Discard used materials as bio hazardous waste.
- Plastic trays can be reused maximum twice, if washed with bleach and then with water at the end of detection.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in areas where reagents or specimens are handled.
- If skin or mucous membrane exposure occurs, immediately wash the area with copious amount of water. Seek medical advice.
- Do not use components beyond the expiration date.
- Test strips stored at +2/+8°C in the dark are stable until the expiry date.
- Do not mix reagents from different lots.
- Reagents have to be preserved separated from possible contaminants (as DNA samples and amplification products).
- Pay attention to device modularity: if modularity isn't respected, reagents will not be enough to process all the tests.
- It is recommended to work in three separated areas:
 - Area 1: pre-PCR (samples handling and extraction).
 - Area 2: Master Mix preparation.
 - Area 3: post-PCR (amplification and detection).
- Risk phrases linked to some components:
 - **R36/38**: irritating to eyes and skin
- Don't use the device if the box is damaged; contact the supplier.
- **It is advisable to have constant and uniform laboratory temperature, avoid to place the instruments near heating/cooling sources that may compromise the correct working.**
- **Use the transparent interpretation card of the specific lot.**

AMPLICONS STORAGE

Store amplicons obtained with AA910/48 ver.2.0 or AA896/48 ver.2.0 at +2/+8°C or at -15/-25°C for later use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Water bath with inclined lid, shaking platform (50-100 rpm) and adjustable temperature (46°C ± 0,5 °C) or **Tecan ProfiBlot 48 with software ver. 1.xx**
- Thermometer
- Deionised or distilled water
- Dedicated adjustable volume micropipettes set and tips
- Clean tweezers to handle strips
- Vacuum aspiration apparatus

PROCEDURE

⇒ MANUAL DETECTION

- Adjust the water level of the shaking bath to approx. 2/3 of the height of the Plastic Tray.
- Heat the water bath to 46°C and check the temperature (46 ± 0,5°C) using a calibrated thermometer.
- Pre-warm the Hybridization and Stringent Wash Solution to 46°C; all crystals should be completely dissolved.
- Allow DNAT, Conjugate, Wash Solution B and Color developer to reach room temperature.
- Take one strip for each sample using clean tweezers (touch strips with gloves only). Label strips with a pencil (do not use ballpoint pen, markers, etc).
Warning: do not allow the strips to dry during the whole procedure.

Hybridization (46°C)

- Pipette **10 µl** of **DNAT** into each lane of the Plastic Tray
Warning: do not use DNAT if is not blue.
- For each sample add **10 µl** of **amplification** product to the corresponding drop of DNAT. Mix thoroughly with a pipette (solution will remain blue).
- Incubate **5 min** at room temperature.
- Add **1 ml** of **Hybridization** (pre-warmed to 46°C) to each sample and mix gently: blue color disappears.
- Place strips into the respective lanes with marker lines facing up. Submerge completely.
- Incubate for **30 min** at **46°C** in the shaking water bath (about 50 rpm). Keep the water bath closed to avoid temperature variations.

Stringent Wash solution (46°C)

- After hybridization step remove the tray from the water bath; angle the tray upwards and aspirate the solution from each lane using a pipette or a vacuum aspiration apparatus, without touching the strip surface to avoid its damage.
- Add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 46°C) to each lane and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 46°C).
- Incubate **15 min** at **46°C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
Warning: put Stringent Wash solution back in the water bath during incubation
- Remove the solution and add **1 ml** of **Stringent Wash solution** (pre-warmed at 46°C).
- Incubate **15 min** at **46°C** in the shaking water bath (about 50 rpm).
- Remove the solution from each lane.

Color development (room temperature)

All the next steps have to be performed at room temperature with shaking. Since water takes too much time to reach room temperature, place a tray (for example of polystyrene) on the lid of the water bath to isolate the Plastic Trays from the hot water and use the agitation function of the water bath only.

- Add **1 ml** of **Conjugate**.
- Incubate **15 minutes** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution, add **1 ml** of **Wash solution B** and rinse briefly.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Wash solution B**.
- Incubate for **5 min** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Wash solution B**.
- Incubate for **5 min** while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove the solution and add **1 ml** of **Color developer**.
- Incubate for **15 min** in the dark, while shaking (about 50 rpm) at room temperature.
- Remove color developer and wash strips with distilled water.
- Let strips dry in the dark on absorbent paper before proceeding with the interpretation of results.

⇒ AUTOMATIC DETECTION

Detection can be performed by using automatic instrument (*Tecan ProfiBlot 48 with software ver. 1.xx*): select “**Tipizza P**” program. In this case **10 µl PCR product + 10 µl DNAT** and **1,5 ml** of each reagent should be used for each sample.

⇒ RESULTS

Validation

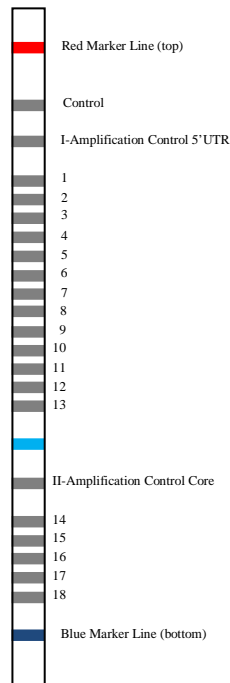
A positive reaction of the uppermost Conjugate Control (CC) line indicates the correct function of the detection step. This line has to be always present and its intensity should be the same among different strips.

The colour intensity among the other positive lines on the strips may vary. This doesn't affect results interpretation.

Interpretation of results

- Align the CC line of the strip with the CC line on the transparent interpretation card. This line should always stain positive.
- The Amplification Control (AC) lines (lines I and II) contain universal probes for conserved sequences of the 5'UTR and Core region respectively. Their positive reaction ensures the addition of the amplified material and indicates the amplification of the corresponding region.
- Read the number of all positive lines for each strip on the Transparent interpretation card: the corresponding HCV typing result can be determined by using the Interpretation Chart (read also the section on diagnostic sensitivity for additional information on genotypes).

Strip scheme:



The part A of the interpretation table shows the possible result combinations on the basis of the 5'UTR region; the part B shows the possible result combinations obtainable on the basis of the Core region.

- If the 5'UTR region of the sample falls in the combinations of genotypes **2,3,4,5, 6a-b or 7a** don't continue with the analysis of the Core region. It is possible to observe positivity on lines **14-18** of the Core, but these **must not** be taken into account in the results interpretation.
- If the 5'UTR region of the sample falls in the combinations of genotypes **1 or 6c-q**, the analysis has to be continued with the interpretation of the results on the bands 14-18 (Core) and report only the results associated with the type indicated by the Core region (e.g. if a sample is genotype 1b in the 5'UTR region, but **1a in the Core region, it should be classified as 1a**).

In the presence of genotypes 2,3,4,5 and 7, signals on the probes of the Core region can be absent or present; in this case they should not be interpreted in any way:

Core probes	Genotypes that can show signals
14	4, 5a
15	/
16	2c, 4a, 5a
17	3
18	2, (3), 5a

TROUBLESHOOTING

1. False negative or too weak signals

- Weak signals on the strip could be the consequence of:
 - Too high DNA concentration during the PCR (try to dilute it) especially for samples with a very high titer ($>8 \times 10^6$)
 - Too low DNA concentration during the PCR for samples with a very low titer ($< 5 \times 10^3$)
- If all the strips show weak signals it could be due to too high hybridization and/or Stringent washing steps water-bath temperature. **Check carefully the water-bath temperature.**
- Hybridization or Stringent Wash Solution were not pre-warmed or mixed carefully. In this case the remaining solution should be discarded and a new one should be used.

2. False positive signals

- Unspecific signals can occur if temperature during hybridization and/or Stringent washing steps is too low. **Check carefully the water-bath temperature.**
- Stringent Wash Solution was not pre-warmed and mixed carefully. In this case the remaining buffer should be wasted and a new one should be used.
- If the same non-specific pattern, corresponding to a given genotype, is visible on all strips, a contamination occurred. Repeat the assay with new solutions. If contamination events occur it is important to discover their origin: extraction, RT and PCR reactions or contamination derived from other amplicons. The use of HCV positive and negative controls can be useful to find out the cause of contamination.

3. Single line non homogeneous staining

Shaking rate during detection steps is too low. Check that strips are submerged totally.

4. Pattern different from regular pattern on the typing list

- Typing probes of 2 different types are present: designate the sample as co-infection.
- Other Patterns: contact your distributor. In rare cases, combinations of bands are generated as not interpretable. This may be due to the heterogeneity of the HCV genome and to recombinant strains.

⇒ PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Diagnostic specificity

The specificity of the Gen-C 2.0 assay was determined analysing 103 HCV negative plasma samples. Samples tested were negative for HCV antibody and RNA. The test was performed according to instructions for use. No false positive results were observed, therefore Gen-C 2.0 Test Specificity is 100%.

Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity of the kit Gen-C 2.0 was evaluated using plasma samples from HCV-positive subjects and amplified with kits cod NLM. AA910/48 ver. 2.0 . As reported in the interpretation chart, on the basis of the sequence analysis, the device is able to distinguish genotypes 1, 2, 3, 4, 6 and subtypes 1a, 1b, 2a/2c, 2b, 3a, 3b, 3c, 3k, 4a, 4b, 4c/4d, 4e, 4f, 4h, 5a, 6a/6b, 6g, 6f-q, 6m and 7a.

The device validation has been carried out with real samples of genotype: 1a, 1b, 2a/2c, 3, 3a, 4, 4c/4d, 5a and 6a. Viral loads were in a range of 2×10^3 and 1×10^7 IU/ml.

The Gen-C 2.0 assay ability to accurately genotype HCV positive samples was evaluated by comparing the results with those based on the previous version of the kit (for genotypes 2-5) and sequencing (for genotype 1 and 6) of individual samples; sequencing results were determined comparing them to HCV database and phylogenetic analysis. For genotypes 5a and 6a reference panels were used.

Analysis has been carried out at level of genotypes and at level of subtype for 1a and 1b. Of the 215 samples analyzed, all gave positive and correct results. The overall sensitivity for the assay is therefore 100%.

115/115 genotype 1 samples, were correctly subtyped with AC004 2.0 and were concordant with the sequencing method. Therefore the accuracy for Gen-C 2.0 assay for subtype 1a and 1b is 100%.

Summary of the analyzed samples and concordance:

Genotype	Nr of samples tested	Concordant to reference method (Gen-C, sequencing or panel)
1a	25	25
1b	90	90
2a/2c	37	37
3a	22	22
3	10	10
4c/4d	21	21
4	2	2
5a	6	6
6a/6b	2	2

Reproducibility

- **INTRA-ASSAY REPRODUCIBILITY (within series precision):**
Intra-assay reproducibility was evaluated using 3 samples of 3 different genotype in 3 replicates. The same 3 samples were tested with two different batches by two different operators.
- **INTER-ASSAY REPRODUCIBILITY (series to series precision):**
Inter-assay reproducibility was evaluated using 3 samples of different genotype by three different operators in different runs and days, using three different batches.

The test was performed according to the instructions for use, the precision was evaluated for all the steps of the procedure. The reproducibility for Gen-C 2.0 assay is 100%.

LOT

Lot
number

REF

Catalogue
number



Temperature
limitation



Use by



Consult instruction
for use



European
Conformity



Manufacturer



Irritant

IVD

In vitro
diagnostic device



Sufficient for



Keep away from
sunlight