

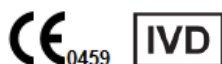


EurobioPlex HEV

Pour la RT-PCR **qualitative/quantitative** en temps réel

REF **EBX-010-25 / EBX-010-50 / EBX-010-100**

 **25/50/100 réactions**



EBX-010 Notice d'utilisation - Version 8.03 du 01/10/2024

Validé sur :

CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1
(Bio-Rad)



Notice d'utilisation
Disponible sur www.eurobio-scientific.com

Le Résumé des Caractéristiques de Sécurité et Performance (RCSP) sera mis à disposition par l'organisme notifié certificateur sur EUDAMED une fois ce dernier fonctionnel. Il peut également être obtenu sur demande.

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

Table des matières

1.	Informations générales	3
2.	Destination du dispositif	4
3.	Symboles	5
4.	Principe.....	6
5.	Composants du kit.....	7
6.	Conservation et stockage	7
7.	Matériel requis non fournis.....	7
8.	Instrument de PCR en temps réel	7
9.	Mises en garde et précautions.....	8
10.	Protocole.....	9
11.	Validation de l'expérimentation.....	12
12.	Analyse des données et interprétation.....	14
13.	Analyse des performances.....	16
14.	Bibliographie.....	18
15.	Contrôle qualité.....	20
16.	Elimination des déchets.....	20
17.	Déclaration d'incident	20
18.	Assistance technique.....	20

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

1. Informations générales

Le virus de l'hépatite E (HEV) appartient à la famille *Hepeviridae*, genre *HepEvirus*. C'est le seul virus hépatotrope possédant un réservoir animal connu à ce jour. C'est un virus à RNA simple brin d'environ 7,5 kb non enveloppé. Il est considéré comme un agent causal majeur de l'hépatite virale transmise, très peu par voie verticale, ou par transfusion de sang contaminée et surtout par voie oro-fécale à la faveur de consommation d'aliments contaminés. Il est reconnu comme un agent infectieux responsable mondialement de problème de santé publique.

Le HEV est responsable d'environ 50% des hépatites virales aiguës dans les pays en développement à faible niveau d'hygiène, d'Asie, d'Afrique et d'Amérique du Sud, causant des infections à caractère endémo-épidémique. Dans ces régions, la séroprévalence peut atteindre jusqu'à 60 %. En revanche dans les pays développés à niveau d'hygiène élevé, le virus se présente plutôt comme un agent zoonotique à l'origine d'infections sporadiques autochtones et/ou importés. Dans certaines zones géographiques de ces pays, l'infection à HEV revêt en réalité un caractère endémique depuis l'utilisation de techniques de sérodiagnostic bien plus sensibles.

L'infection à HEV est habituellement asymptomatique et bénigne. Elle touche les populations humaines de tous âges, mais elle présente deux caractéristiques cliniques non encore élucidées : les hommes sont plus infectés que les femmes, tandis que le taux de mortalité est particulièrement élevé (jusqu'à 30-40%) chez les femmes enceintes surtout en cas de forme fulminante. L'infection chronique peut aussi être observée, en particulier chez des personnes immunodéprimées, transplantées d'organes solides ou atteintes d'hémopathies malignes.

Sur la base des séquences génomiques de nombreux isolats humains et animaux, le HEV est classé en quatre géotypes majeurs divisés en de nombreux sous-types. Les géotypes 1 et 2 infectant principalement l'humain sont la cause majeure des infections à HEV endémo-épidémiques en Asie, en Afrique et au Mexique. De séquences nucléotidiques relativement bien conservées, ils sont subdivisés en 5 (1a-1e) et 2 (2a-2b) sous-types respectivement. Les géotypes 3 et 4 sont détectés chez le porc principalement. Le géotype 3 circule surtout aux Etats-Unis, mais aussi dans certains pays d'Europe et au Japon. Le géotype 4 circule surtout en Asie : Chine, Japon et Taïwan. Ces géotypes 3-4 sont aussi détectés dans des cas d'hépatite virale aiguë humaine et sont subdivisés en 10 (3a-3j) et 7 (4a-4g) sous-types respectivement. Leur transmission zoonotique a été clairement établie par comparaison de séquences génomiques (par ex. seulement 0,2-2% de différence entre isolats humains et animaux de géotype 3) et aussi par évaluation de la séroprévalence anti-HEV entre éleveurs de porc et population générale allant de 11 à 51% contre 2 à 25% respectivement.

La stratégie de diagnostic de l'infection à HEV repose sur sa détection à partir d'échantillons de selles, de sérum ou plasma par la technique RT-PCR, et par les marqueurs sérologiques (IgM et IgG) présents dès le début de la maladie qui est caractérisée par l'ictère et l'asthénie. Les IgM apparaissent précocement et peuvent persister au-delà de trois mois tandis que les IgG qui suivent très rapidement les IgM persistent plusieurs années après leur apparition. La technique de RT-PCR quantitative est une technique très sensible et spécifique de détection de l'HEV.

2. Destination du dispositif

L'Eurobioplex HEV est un test d'amplification par réaction en chaîne de la polymérase (PCR) en temps réel, conçu pour la détection qualitative et quantitative de la présence ou l'absence de ce virus dans un extrait d'acides nucléiques ARN. Le test est indiqué pour poser un diagnostic de présomption d'infection par HEV chez l'homme, ou compléter un diagnostic avéré ou indéterminé. Le test n'est pas destiné au screening de sang ou d'organes pour le virus HEV. L'extrait d'ARN est le matériel de départ pour le kit Eurobioplex HEV.

Il revient à l'utilisateur d'utiliser des méthodes d'extraction adaptées aux prélèvements testés.

Le kit a été testé sur du plasma.

Le test EurobioPlex HEV est un dispositif médical de diagnostic *in vitro*, il doit être utilisé par du personnel qualifié de laboratoire d'analyses de biologie médicale. Il ne doit pas être recyclé après utilisation.

3. Symboles



Référence catalogue



Code de lot



Limite inférieure et supérieure de température de conservation



Date d'expiration



Contenu suffisant pour « N » essais



Fabricant



Date de fabrication



Produit marqué CE



Dispositif Médical de Diagnostic *in vitro*



Consulter les instructions d'utilisation



Attention



Ne pas utiliser si l'emballage est endommagé



A conserver à l'abri de la lumière du soleil

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

4. Principe

L'Eurobioplex HEV est un test d'amplification de l'acide ribonucléique (ARN) de HEV. Le test est réalisé à partir de l'ARN extrait de l'échantillon au moyen d'une réaction unique dans un seul puits/tube.

La présence d'un gène de ménage humain servant de contrôle pour la qualité du prélèvement, pour l'extraction d'ARN et l'inhibition de RT-PCR permet de déterminer de possibles variations pouvant se produire au cours des étapes d'extraction d'ARN d'échantillons biologiques et d'amplification par RT-PCR en temps réel. Il permet ainsi de s'assurer qu'un résultat négatif ne peut être dû à une mauvaise extraction d'ARN et/ou à la présence d'inhibiteurs de RT-PCR en trop grande quantité.

L'ARN de HEV est détecté à l'aide d'une sonde marquée HEX. Le Contrôle endogène est détecté à l'aide d'une sonde marquée CY5. Au cours de l'élongation du produit d'amplification, les sondes émettent une fluorescence spécifique suite à leur hydrolyse. La mesure de l'intensité de fluorescence en temps réel est relative à l'accumulation des produits d'amplification spécifiques.

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 1.

Tableau 1 : Détection des cibles selon les fluorophores

Cible	Fluorophore	Excitation	Emission
HEV	HEX	535 nm	555 nm
Contrôle Endogène	Cy5	647 nm	667 nm

Canaux équivalents sur différents instruments de PCR :

- Canal **HEX** (Chromo 4/CFX96, Systèmes Mx), Canal VIC (Systèmes ABI), Canal Alexa532 (SmartCycler II), Canal 580 (LC 480), Canal Yellow (RotorGene),
- Canal **Cy5** (Systèmes ABI, Systèmes Mx, Chromo4/CFX96), Canal Alexa647 (SmartCycler II), Canal 660 (LC 480), Canal Red (RotorGene)

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

5. Composants du kit

Le kit de RT-PCR en temps réel EurobioPlex HEV est prêt à l'emploi et contient les réactifs et les enzymes nécessaires pour la détection et la quantification de ce virus (Tableau 2).

Tableau 2: Composants du kit

Couleur de Bouchon	Composés du kit	Volume pour 25 réactions	Volume pour 50 réactions	Volume pour 100 réactions	Reconstitution
Rouge	Enzymes	420 µL	2 x 420 µL	4 x 420 µL	Prêt à l'emploi
Transparent	Oligomix *	140 µL	2 x 140 µL	4 x 140 µL	Prêt à l'emploi
Jaune	4 Standards HEV **: S-1 à 10 ⁶ copies/µL S-2 à 10 ⁵ copies/µL S-3 à 10 ⁴ copies/µL S-4 à 10 ³ copies/µL	50 µL de chaque	2 x 50 µL de chaque	4 x 50 µL de chaque	Prêt à l'emploi
Orange	Contrôle positif CP	40 µL	80 µL	160 µL	Prêt à l'emploi
Bleu	Eau = contrôle négatif (CN- H2O)	1000 µL	1000 µL	1000 µL	Prêt à l'emploi

*Oligomix : contient les amorces et sondes pour la cible HEV et pour le contrôle endogène.

** Le kit EBX-010 contient des standards de quantifications à 4 concentrations différentes (voir chapitre 10.3 partie RT-PCR quantitative).

6. Conservation et stockage

Tous les réactifs doivent être stockés entre -15°C et -22°C.

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



La sensibilité de l'analyse peut diminuer si les composants du kit subissent plusieurs cycles de congélation/décongélation. Le kit peut être utilisé après l'ouverture initiale pendant un maximum de 5 cycles de congélation et décongélation.

7. Matériel requis non fournis

- Hotte biologique
- Appareil de PCR temps réel
- Centrifugeuse pour microtubes
- Vortex
- Plaques / tubes pour réaction de PCR temps réel
- Micropipettes
- Embouts DNase-free et RNase-free à filtre pour micropipettes
- Microtubes stériles
- Gants (sans talc)

8. Instrument de PCR en temps réel

Le kit EurobioPlex HEV a été développé et validé pour être utilisé avec l'instrument de PCR en temps réel suivant :

CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) avec analyse sur CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad).

9. Mises en garde et précautions



Lire attentivement ces instructions avant de débiter le protocole.

- Cette expérimentation doit être réalisée par du personnel compétent, formé aux techniques et procédures de sécurité adaptées.
- 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.
- Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.
- Cette expérimentation doit être réalisée selon les bonnes pratiques de laboratoire.
- Ne pas utiliser ce kit après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Le kit est expédié sous carboglace, et les composants du kit doivent arriver congelés. Si un ou plus des composants arrive décongelé, ou si les tubes ont été endommagés pendant le transport, contacter Eurobio Scientific.
- 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.
- Il est recommandé de définir trois zones de travail distinctes : 1) Isolation de l'ARN, 2) Préparation du mélange réactionnel et 3) Amplification / Détection des produits amplifiés.
- Les sondes fluorescentes contenues dans l'oligomix sont sensibles à la lumière. Toute exposition prolongée de l'oligomix à la lumière doit être limitée au temps technique nécessaire à la préparation de la plaque PCR.
- Il est recommandé d'ouvrir et de manipuler les contrôles positifs à l'écart des échantillons biologiques à tester et des autres composants du kit afin d'éviter les contaminations croisées.
- Porter des blouses et des gants (sans talc) distincts dans chaque zone de travail.
- Les pipettes, les réactifs et autres matériels de travail ne doivent pas circuler entre ces zones.
- Une attention particulière doit être mise en œuvre pour conserver la pureté des réactifs et des mélanges réactionnels.
- Le contrôle interne endogène détecte une cible cellulaire détectable dans tous les échantillons d'origine humaine mais pas dans le contrôle négatif CN-H2O fourni dans la trousse. L'absence de signal au niveau du contrôle négatif permet de prévenir la survenue de contaminations croisées.
- Des méthodes appropriées de préparation/extraction d'ARN pour une production d'ARN de qualité et une application de RT-PCR en temps réel doivent être utilisées, notamment afin d'éviter tout risque de contamination avec les RNases.
- Utiliser des embouts à filtre pour micropipettes, RNase-free et DNase-free.
- Ne pas pipeter avec la bouche. Ne pas manger, ni boire ou fumer dans le laboratoire.
- Eviter les aérosols.
- Le kit n'est pas destiné à un usage unique. Lors de la réutilisation du dispositif, il est nécessaire de suivre les recommandations concernant les cycles de congélation-décongélation autorisés, et les précautions pour prévenir la contamination des réactifs.
- Les composants du kit ne doivent pas être utilisés séparément (ni avec d'autres réactifs, ni avec les réactifs d'autres lots).
- La décongélation des réactifs doit être ménagée afin de ne pas altérer les performances du dispositif (à +2°C/+8°C ou à température ambiante).
- Le dispositif n'est pas automatisé. Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'utiliser un autre équipement que ceux validés, et dans ce cas, les performances ne sont pas garanties.

10. Protocole

10.1 Collecte des échantillons

- Collecter les échantillons dans des tubes stériles. **L'utilisation d'héparine comme anti-coagulant est proscrite.**
- Il revient à l'utilisateur de maîtriser ses propres conditions de collecte, transport, conservation et extraction des échantillons pour que l'extraction d'ARN/ADN par des systèmes adaptés produise des ARN/ADN de qualité.
- Il est recommandé que les échantillons soient extraits immédiatement, ou conservés selon les recommandations de stockage des échantillons avant extraction (Tableau 3).
- Les références bibliographiques dans la section « 14. Bibliographie » fournissent des données indicatives sur la stabilité des échantillons et des ARNs.



Tableau 3 : Recommandations de stockage avant utilisation

Recommandations de stockage à température ambiante avant préparation du plasma EDTA à partir de sang	
< 24 h	
Recommandations de stockage à +4°C avant préparation du plasma EDTA à partir de sang	
< 72 h	
Recommandations de stockage maximum des échantillons de plasma avant extraction	
Température ambiante	2 h
+2°C/+8°C	5 jours
<-70°C (préféré par rapport à -20°C)	Stockage à long terme (>5 jours et maximum 2 mois à -20°C)

Attention	
	- L'utilisateur peut se référer aux recommandations émises par l'Organisation Mondiale de la Santé ou par la Haute Autorité de Santé pour la bonne conservation des échantillons. - Les ARNs extraits doivent être stockés à <-70°C afin d'assurer leur stabilité. Au-delà d'une année de stockage des ARNs à <-70°C, les Ct obtenus peuvent augmenter. Il est conseillé de ré-extraire un échantillon biologique stocké depuis plus d'un an. Il est conseillé de limiter à 3 le nombre de décongélation des ARNs. - Le transport des échantillons cliniques est soumis à la réglementation locale pour le transport des agents infectieux.

10.2 Extraction de l'ARN/ADN

Il revient aux utilisateurs de s'assurer que le système d'extraction des acides nucléiques utilisé est compatible avec la technologie de RT-PCR en temps réel. Nous recommandons d'utiliser des méthodes d'extraction d'ARN/ADN adaptés aux prélèvements utilisés, et de se référer aux instructions du fournisseur du kit d'extraction utilisé.

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

Dans le kit EBX-010, le contrôle interne endogène lu sur le canal Cy5 est déjà présent dans l'échantillon clinique à extraire. Sa détection après amplification permet de vérifier la qualité du prélèvement et de l'extraction.

Les performances telles que décrites dans la partie 13 du présent document ont été obtenues avec la technique d'extraction suivante : Maelstrom 9600 (TANBead) et le kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46).

10.3 Réalisation de la RT-PCR en temps réel

Recommandation générale :

- Les standards HEV ainsi que le contrôle positif contient une concentration élevée de matrice. Les manipulations doivent être réalisées précautionneusement pour éviter toute contamination.
- Pour contrôler le bon fonctionnement de la RT-PCR, il est nécessaire de tester un contrôle positif, CP, ainsi qu'un contrôle négatif (eau PCR fournie= CN-H2O) (voir II-3/ 6 du protocole de RT-PCR en temps réel).

RT-PCR qualitative

Aucune gamme standard n'est réalisée. Seul le contrôle positif CP et le contrôle négatif sont testés.

RT-PCR quantitative

En plus des contrôles négatif et positif (CP), il faut réaliser une courbe standard à l'aide des quatre tubes standards HEV S-1 à S-4, prêts à l'emploi. Les standards ne sont pas à extraire.

Afin de pouvoir corriger une éventuelle variation liée à l'expérimentation, nous recommandons de tester les standards HEV en *triplicatas*.

Pour générer une courbe standard sur un système de PCR en temps réel, les concentrations 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 copies/ μ L doivent être utilisées et définies comme standard en spécifiant le nombre de copies/ μ L correspondant (tableau 4a).

Tableau 4a : Concentrations des standards HEV

Standards	Concentration
S-1	10^6 copies/ μ L
S-2	10^5 copies/ μ L
S-3	10^4 copies/ μ L
S-4	10^3 copies/ μ L

Les concentrations en copies/ μ L peuvent être converties en UI (Unités Internationales) sachant que 2,25 copies/mL correspondent à 1 UI/mL soit **0.00225 copies/ μ L** correspondant à 1 UI/mL (tableau 4b).

Tableau 4b : Calcul pour renseigner les standards HEV

Valeur standard HEV en cp/ μ L (tableau 4a)	÷	0.00225 (cp/ μ L)	=	Valeur standard HEV en UI/mL
---	---	-----------------------	---	---------------------------------

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

Schéma de la procédure :

1 - PREPARATION MELANGE REACTIONNEL / MASTERMIX

Nombre de réaction(s)	N+3
Enzymes	(N+3) x 15 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl
Volume total Mastermix	(N+3) x 20 µl



2 - PREPARATION DES REACTIONS

Echantillon

20 µl de Mastermix

+

5µl échantillon ARN

Contrôle(s) positif(s)

Qualitatif :

20 µl de Mastermix

+

5µl de CP

Quantitatif :

20 µl de Mastermix

+

5µl de S-1 à S-4

Contrôle Négatif

20 µl de Mastermix

+

5µl Eau biologie moléculaire (CN-H2O)



3 - INSTRUMENT PCR EN TEMPS REEL

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Reverse Transcription	50 °C	10 min	1	-
Dénaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Acquisition de fluorescence

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

10.4 Protocole détaillé

- 1) Vérifier que les réactifs soient entièrement décongelés. Homogénéiser les tubes d'enzymes, et vortexer environ 15 secondes l'Oligomix et le CP, puis centrifuger brièvement.
- 2) Préparer les Mastermix comme ci-dessous, N étant le nombre de réactions (incluant les contrôles positif et négatif). Prévoir la quantité de Mastermix pour N+3 réactions minimum.

Nombre de réaction(s)	1	N+3
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
Volume total Mastermix	20 µl	(N+3) x 20 µl

**Pour les petites séries (≤10) : préparer pour N+2 est suffisant.*

- 3) Homogénéiser le Mastermix préparé en 2) et centrifuger brièvement.
- 4) Distribuer 20 µL de Mastermix à l'aide d'une micropipette et d'embouts à filtre dans des tubes/puits de microplaques indépendants.
- 5) Ajouter 5 µL d'échantillon d'ARN extrait.
- 6) En parallèle réaliser les contrôles suivants :
 - Contrôle(s) positif(s) :
 - Test qualitatif :
 - 20 µL de Mastermix + 5 µL de contrôle positif CP
 - Test quantitatif :
 - 20 µL de Mastermix + 5 µL de S-1 à S-4 pour la gamme standard HEV
 - Contrôle négatif :
 - 20 µL de Mastermix + 5 µL d'eau fournie (CN-H2O)
- 7) Fermer immédiatement les tubes, ou plaque avec un film adhésif pour éviter toute contamination.
- 8) Centrifuger brièvement pour collecter le mélange réactionnel au fond des tubes ou des puits de microplaque.
- 9) Réaliser le programme suivant sur l'instrument de PCR temps réel.

Programme	Température	Durée	Cycle(s)	
Reverse Transcription	50 °C	10 min	1	-
Dénaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Acquisition de fluorescence

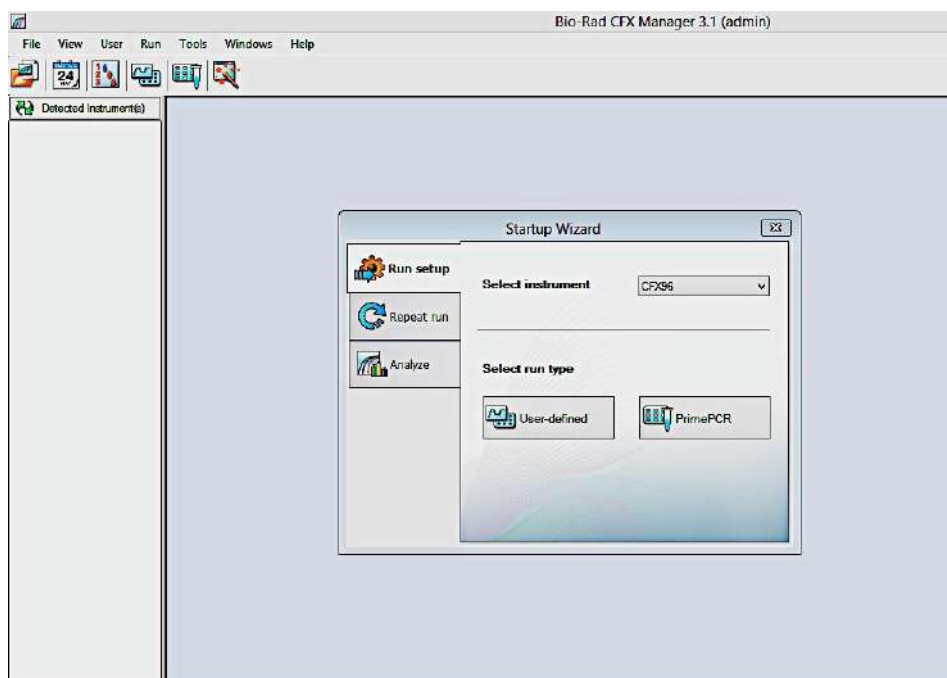
Note 1 : Sur CFX96™ (Bio-Rad), lancer le run à partir de la version 1.6 ou postérieure, puis analyser avec la version 3.1 (voir § 11. Validation de l'expérience).

11. Validation de l'expérimentation

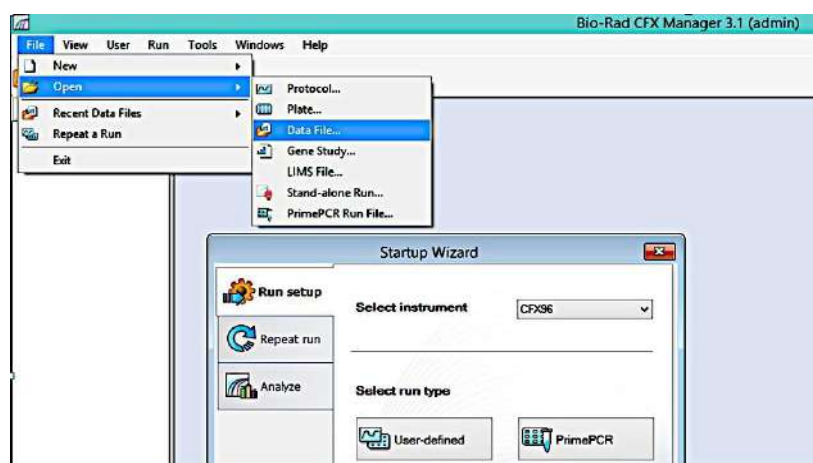
L'analyse des data post-acquisition sur un appareil de PCR CFX96 (Bio-Rad) doit être réalisée à l'aide de la version 3.1 du logiciel CFX Manager (Bio-Rad). Afin de passer sur cette version à partir d'un run lancé sur une version antérieure, veuillez suivre la procédure suivante : à la fin du run, le fichier de données avec le suffixe .pcrd doit être ouvert et traité avec la version 3.1 du CFX Manager (Bio-Rad).

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

Si le run a été lancé avec le logiciel CFX Manager v1.6 par exemple, pour ouvrir un fichier de data avec le logiciel CFX Manager v3.1, cliquer sur l'icône CFX Manager v3.1. L'écran d'accueil apparaît.



Cliquer sur « File » et sélectionner « Open » puis « Data File ».



Sélectionner le fichier que vous souhaitez analyser et cliquer sur « Ouvrir ».

L'option « Drift correction » doit être appliquée dans l'onglet « Settings » comme sur l'image ci-dessous : cliquer sur l'onglet « Settings », puis sur « Baseline Setting » et sur « Apply Fluorescence Drift Correction ».

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV



Une fois cette étape réalisée, l'analyse peut débuter.

Pour que le dosage soit valide, les valeurs de Ct pour les contrôles doivent être les suivantes (Tableau 5) ; autrement l'expérimentation ne peut être validée.

Tableau 5

Contrôle Positif	
HEX	Ct ≤ 30
CY5	Ct ≤ 30
Contrôle Négatif	
HEX	Ct non déterminé
CY5	Ct non déterminé

12. Analyse des données et interprétation

A) Analyse qualitative

Pour les échantillons cliniques, les résultats suivants sont possibles :

Seuil de Ct pour la positivité des échantillons (canal HEX) : + Positif => Ct < 45

Signal PCR		Présence de HEV	Validité du test/commentaire
HEX	CY5		
-	+	Non	VALIDE
+	+	Oui	VALIDE
+	-	Oui	VALIDE Problème d'extraction ou d'inhibition de RT-PCR ou forte compétition qui n'empêche pas la détection du virus
-	-	Non interprétable	Possible inhibition de RT-PCR ou problème d'extraction ou forte compétition → diluer 5 x l'échantillon ; si même résultat ré-extraire l'échantillon

B) Analyse quantitative

Pour tracer la courbe étalon, renseigner les concentrations en copies/μl de la gamme de linéarité de quantification des standards HEV (canal HEX) (10⁶ -10⁵ -10⁴ - 10³ copies/μl pour S-1, S-2, S-3 et S-4 respectivement). Le logiciel affichera une courbe standard et calculera pour les échantillons le nombre de copies/μl correspondant.

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

En fonction du volume de liquide corporel introduit au moment de l'extraction, et du volume d'éluat, la concentration d'ARN-HEV dans l'éluat pourra être ramenée à la concentration/ml de prélèvement. Pour déterminer la charge virale par ml de prélèvement original, la formule suivante doit être appliquée :

$$\text{Charge virale par microlitre d'éluat} \times \text{Volume éluat (microlitres)}$$
$$\text{Volume de prélèvement extrait (millilitres)}$$
$$=$$
$$\text{Charge virale par millilitre de prélèvement}$$

Il peut être converti en UI (Unités Internationales) sachant que 2,25 copies/ml correspondent à 1 UI/ml. Les résultats des échantillons en dessous du seuil de quantification ne peuvent être validés quantitativement, mais conservent leur qualité de détectabilité (positivité validée sur le canal HEX).

En PCR quantitative, en plus des contrôles valides du Tableau 5, l'efficacité de la PCR en temps réel sur le canal HEX doit être comprise entre 90 et 110 % et le coefficient de corrélation > 0,98.

Limites d'utilisation et d'interprétation :

- ❖ Le kit EurobioPlex HEV est utilisé à des fins de diagnostic de première intention.
- ❖ Tous les échantillons doivent être traités comme potentiellement infectés par les bactéries d'intérêts, et la réglementation locale de biosécurité doit être scrupuleusement suivie.
- ❖ L'interprétation des résultats doit prendre en compte la possibilité de faux négatifs et de faux positifs.

Les faux négatifs peuvent être dus à :

- Une collecte inadaptée des échantillons, ou un mauvais stockage,
- Des conditions d'extraction inadaptées ou l'utilisation d'instruments de PCR non validés,
- Une expérimentation non respectueuse de tous les éléments de ce mode d'emploi.

Les faux positifs peuvent être dus à :

- Une contamination liée à une mauvaise manipulation d'échantillons fortement positifs, du contrôle positif, ou des produits issus de l'amplification de PCR,
 - Un non-respect de la procédure décrite dans ce mode d'emploi, notamment pour éviter toute source de contamination.
- ❖ Tout résultat doit être interprété par du personnel médical dans le contexte clinique du patient, son historique et ses symptômes.
 - ❖ Ce test n'exclut pas la présence d'autres pathogènes que ceux ciblés par ce kit.
 - ❖ Un résultat négatif de ce test n'exclut pas de façon absolue une possible infection au virus de l'hépatite E.

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

13. Analyse des performances

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique à 100% du kit EurobioPlex EBX-010 HEV a été déterminée sur le contrôle positif du kit. Une gamme de dilution a été réalisée à partir d'un mélange plasmidique allant de 10^5 à 1 copie/ μ L.

Une gamme de dilution a été réalisée à partir d'un éluât de l'étalon International WHO HEV (Paul Ehrlich Institute PEI code : 6329/10) allant de 2083 IU/ml à 16,2 IU/mL. Cette gamme de dilution a été utilisée pour déterminer la limite de détection du kit EBX-010. Une analyse probit a été réalisée afin de pouvoir déterminer le taux de positivité à 95%.

Limite de détection/sensibilité analytique sur CP: 5 copies/ μ L

Limite de détection sur l'étalon international WHO IS (first world health organization international standard for Hepatitis E RNA Nucleic acid amplification (NAT) assay, Paul Ehrlich Institute PEI code: 6329/10) à 95% (probit):

HEV : 63,9 IU/mL

Limite de quantification

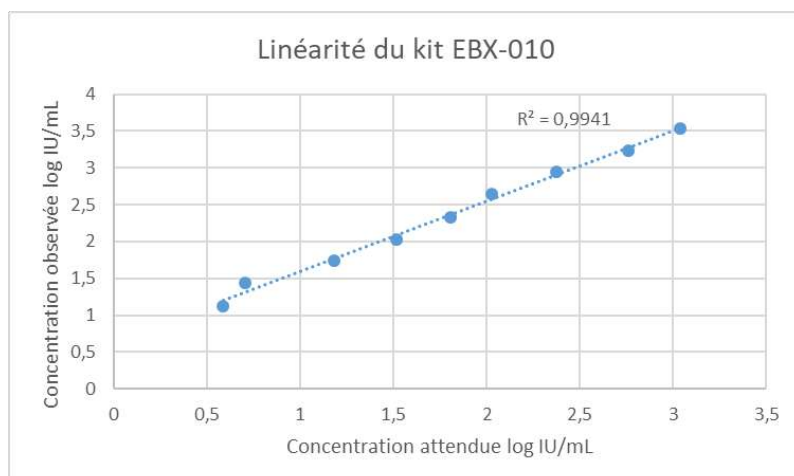
Une gamme de dilution a été réalisée à partir d'un éluât de l'étalon International WHO HEV (Paul Ehrlich Institute PEI code : 6329/10) allant de 2083 IU/ml à 16,2 IU/mL a été utilisée pour déterminer la limite de quantification du kit EBX-010.

Limite de quantification sur l'étalon international WHO IS (first world health organization international standard for Hepatitis E RNA Nucleic acid amplification (NAT) assay, Paul Ehrlich Institute PEI code: 6329/10):

HEV : 260 IU/mL

Gamme de linéarité

Le champ de mesure linéaire du kit EurobioPlex HEV a été déterminé par l'analyse de dilutions en série d'un échantillon titré à 3,54 log UI/mL. Chaque dilution a été testée en duplicat de 1,13 à 3,54 log UI/ml.



Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

Justesse

La justesse du kit a été établit en comparant la moyenne des valeurs mesurées de l'étalon International WHO HEV (Paul Ehrlich Institute PEI code : 6329/10) à sa valeur vraie connue. Cette méthode a été aussi employée sur un échantillon clinique dont la charge virale était connue.

Valeur vraie du standard HEV = 3,02 log UI/mL

Biais (%) = $((3,00-3,02) / 3,02) * 100 = 0,62\%$

Valeur vraie de l'échantillon titré = 4,92 log UI/mL

Biais (%) = $((4,92-4,78) / 4,92) * 100 = 2,74\%$

Précision

- Variabilité intra-expérience :

	EBX-010	
	CY 5	HEX
Moyenne CV intralot CP	0.77	0.70

CV: coefficient de variation

- Variabilité inter-lots :

	EBX-010	
	CY 5	HEX
CV moyen inter lots CP en %	3.27	2.76

CV: coefficient de variation

Spécificité analytique

Cette validation a porté sur 10 échantillons négatifs pour HEV mais positifs pour d'autres virus hépatiques, afin de tester les réactions croisées.

Nombre d'échantillons	Echantillon positif pour	Hépatite E	Statut HEV sur EBX-010
3	Hépatite C	Négatif	Négatif
3	Hépatite B	Négatif	Négatif
2	Hépatite D	Négatif	Négatif
2	Hépatite A	Négatif	Négatif

En renforcement à cette étude, une analyse in silico a été employée et démontre la spécificité des amorces et sondes pour HEV dans le kit EBX-010.

Aucune aspécificité ou cross réaction n'a été détectée.

Le kit est 100 % spécifique.

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

Sensibilité et spécificité diagnostique

La validation des performances a porté sur 66 échantillons HEV positifs et 51 échantillons HEV négatifs.

Pour cette étude, l'extraction des échantillons a été réalisée sur Maelstrom 9600 (TANBead) avec le kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46), et la RT-PCR sur CFX96 (Bio-Rad).

Les performances globales sont les suivantes :

		EBX-010	
		Positifs HEV	Négatifs HEV
Pré-testés avec le kit Altona	Positifs HEV	66	0
	Négatifs HEV	0	51

Sensibilité globale : > 99% (66/66)

Spécificité globale : > 99% (51/51)

Concordance globale : > 99% (117/117)

Substances interférentes

Des substances interférentes (comprenant différents inhibiteurs de PCR) ont été testés pour s'assurer qu'elles ne faussent pas le résultat diagnostic obtenu avec le kit. Un panel d'AccroMetrix™ Inhibition Panel REF 956400 contenant 7 substances ont été testés à des concentrations connues comme étant les plus élevées possibles.

Tous les échantillons, à chaque concentration, étaient bien positifs HEV, en HEX, en présence de ces substances interférentes. Il n'y a donc pas d'impact de ces substances sur le kit EBX-010.

Cross-contaminations

L'étude de contaminations croisées sur 28 CP et 28 NTC a révélé une sensibilité, une spécificité et une concordance globale > 99% avec des coefficients de variation intra et inter plaques < à 5% sur CP, pour toutes les cibles.

14. Bibliographie

Meng X-J., Purcell R. H., Halbur P. G., Lehman J. R., Webb D. M., Tsareva T. T., Haynes J. S., Thacker B. J., and Emerson S. U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus . Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 9860-9865

Wang Y., Zhang H., Ling R., LI H., and Harrisson T. J. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3 . Journal of General Virology 2000; 81: 1675-1666

Drobeniuc J., Favorov M. O., Shapiro C. N., Bell B. P., Mast E. E., Dadu A., Culver D., Iarovoi P., Robertson B H and Margolis H S. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. The Journal of Infectious Diseases 2001; 184: 1594-1597

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

Meng X-J. , Wiseman B. , Elvinger F. , Guenette D. K. Toth T. E. , Engle R. E. , Emerson S. U. , and Purcell R. H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries . *Journal of clinical microbiology* 2002; 40 (1): 117-122

Orru G , Masia G , Orru L , Piras V , Coppola R C . Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *Journal of Virological Methods* 2004; 118: 77-82

Olsen B., Axelsson-Olsson D., Thelin A. and Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls . *Scand J Infect Dis* 2006; 38 (1): 55-58

Bouwknegt M. , Engel B. , Herremans M. M. P. T. , Widdowson M. A., Worm H. C. , Koopmans M. P. G. , Frankena K. , De Roda Husman A. M. , De Jong M. C. M. , and van der Poel W. H. M. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands . *Epidemiol Infect* 2008; 136: 567-576

Kuniholm M. H. , Purcell R. H. , McQuillan G. M. , Engle R. E. , Wasley A. , and Nelson K. E. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: Results from the third National Health and nutrition examination survey, 1988-1994 *Ht Journal of Infectious Diseases* 2009; 200: 48-56

Ward P , Poitras E , Leblanc D , Letellier A , Brassard J , Plante D , Houde A . Comparative analysis of different Taqman real-time RT-PCR assays for detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control. *Journal of Applied Microbiology* 2009; 106: 1360-1369

Zhang W , Yang S , Ren L , Shen Q , Cui L , Fan K , Huang F , Kang Y , Shan T , Wei J , Xiu H , Lou Y , Liu J , Yang Z , Zhu J , Hua X . Hepatitis E virus infection in Central China reveals no evidence of cross-species transmission between human and swine in this area. *PLoS one* 2009 , 4(12) eb156: 1-8

Meng X. J. Hepatitis E virus : Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 2010; 140 (3-4): 256-265

Legrand-Abravanel F. , Kamar N. , Sandres-Saune K. , Garrouste C. , Dubois M. , Mansuy J-M. , Muscari F. , Sallusto F. , Rostaing L. , and Izopet J. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France . *The Journal of Infectious Diseases* 2010; 202 (6): 835-844

Purcell R. H. and Emerson S. U. Hidden danger : The raw facts about hepatitis E virus. *The Journal of Infectious Diseases* 2010; 202 (6): 819-821

Baylis S A , Hanschmann K-M , Blümel J , and Micha Nübling C et al . Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays : an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate Laboratory performance . *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49(4): 1234-1239

Hakze-van der Honing R. W. , van Coillie E. , Antonis A. F. G. , van der Poel W. H.M. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PloS One* 2011; 6 (8) : e22673

Mansuy J-M. , Bendall R. , Legrand-Abravanel F. , Sauné K. , Miédouge M. , Ellis V. , Rech H. , Destruel F. , Kamar N. , Dalton H. R. and Izopet J. Hepatitis E virus antibodies *Emerging Infectious Diseases* 2011; 17 (12): 2309-2312

Faber M. S. , Wenzel J. J. , Jilg W. , Thamm M. , Höhle M. , and Stark K. Hepatitis E virus seroprevalence among adults , Germany . *Emerging Infectious Diseases* 2012; 18 (10): 1654-1657

Ruggeri F. M. , Di Bartolo I. , Ponterio E. , Angeloni G. , Trevisani M. , Ostanello F. Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol* 2013; 36 (4): 331-344

Notice d'utilisation EurobioPlex HEV

Smith D B , Purdy M A , Simmonds P. Genetic variability and the classification of Hepatitis E Virus. J Virol. 2013 , 87(8): 4161-4169

Dalton H.R. Hepatitis E: The 'new kid on the block' or an old friend ?. Transfus Med Hemother. 2014 , 41: 6-9

Smith D B , Simmonds P , Jameel S , Emerson S U , Harisson T J , Meng X-J , Okamoto H , Van der Poel W H M and Purdy M A. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae Journal of General Virology 2014, 95: 2223-2232

Izopet J , Labrique A B , Basnyat B , Dalton H R , Kmush B , Heaney C D et al; Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas ; Nepal, Bangladesh and southwest France . J. Clin. Virology. 2015, 70: 39-42

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

15. Contrôle qualité

Conformément au système de management de la qualité d'Eurobio, certifié ISO EN 13485, chaque lot de l'EurobioPlex HEV est testé selon des spécifications prédéfinies afin de garantir une qualité constante des produits.

16. Elimination des déchets

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

17. Déclaration d'incident

Tout incident grave survenu en lien avec le réactif fait l'objet d'une notification à Eurobio Scientific et à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

18. Assistance technique

Pour obtenir une assistance sur nos produits, merci de contacter notre support technique.

Le service clients d'Eurobio Scientific est joignable par voie électronique (mail), à l'adresse adv@eurobio-scientific.com ou par téléphone au +33 (0)1.69.79.64.80.



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANCE

Instructions for use EurobioPlex HEV

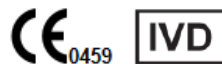


EurobioPlex HEV

For **qualitative/quantitative** real time RT-PCR

REF **EBX-010-25 / EBX-010-50 / EBX-010-100**

 **25/50/100 reactions**



EBX-010 IFU - Version 8.03 of 10/01/2024

Validated on :

CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)



Instructions for use
Available on sur www.eurobio-scientific.com

The Summary of Safety and Performance Characteristics (SPSC) will be made available by the Notified Body on EUDAMED once it is operational. It can also be obtained on request.

Instructions for use EurobioPlex HEV

Table of contents

1. Introduction.....	23
2. Purpose of the system	31
3. Symbols	25
4. Principle of detection.....	26
5. Content of the kit.....	27
6. Storage.....	27
7. Materials required not provided.....	27
8. Real-time PCR instrument.....	28
9. Cautions and note.....	28
10. Procedure.....	29
11. Validation of the experiment	33
12. Data analysis and interpretation.....	35
13. Performance analysis.....	36
14. Bibliography	53
15. Quality control	53
16. Waste disposal.....	54
17. Incident report.....	41
18. Technical assistance	42

Instructions for use EurobioPlex HEV

1. Introduction

Hepatitis E Virus (HEV) belongs to the family *Hepesviridae*, genus *HepEvirus*. It is the single hepatotropic virus with an animal reservoir known to date. It is a non-enveloped single-stranded RNA virus which is approximatively 7.5 kb long. It is considered to be a major causal agent of transmitted viral hepatitis, very little by vertical transmission or by contaminated blood transfusion but more specifically by fecal-oral route through consumption of contaminated food. It is recognized as an infectious agent responsible for global public health problem.

HEV is responsible for approximately 50% of acute viral hepatitis in developing countries with low level of hygiene, in Asia, Africa and South America causing endemic-epidemic infections. In these regions the seroprevalence can reach up to 60%. In contrast, the virus exists rather as a zoonotic agent responsible for indigenous sporadic or imported infections in developed countries with high level of hygiene. In some geographical areas of these countries, HEV infection is actually endemic since the use of far more sensitive serodiagnostic techniques.

HEV infection is usually asymptomatic and benign. It affects people of all ages, but it has two still unresolved clinical features: infected people are more often men than women, and the mortality rate is particularly high (up to 30-40%) for pregnant women especially in case of fulminant form. Chronic infection can also be observed in particular in immunocompromised people, transplanted with solid organs or suffering from hematological malignancies.

On the basis of the genomic sequences of many human and animal isolates, the HEV is classified into four major genotypes divided into many subtypes. Genotypes 1 and 2 mainly infecting humans are the leading cause of HEV endemic-epidemic infections in Asia, Africa and Mexico. With relatively well conserved nucleotide sequences, they are respectively subdivided into 5 (1a-1e) and 2 (2a-2b) sub-types. Genotypes 3 and 4 are primarily detected in pigs. Genotype 3 circulates mainly in the United States but also in some European countries and Japan. Genotype 4 circulates primarily in Asia: China, Japan and Taiwan. Genotypes 3-4 are also detected in human acute viral hepatitis and are respectively subdivided into 10 (3a-3j) and 7 (4a-4g) subtypes. Their zoonotic transmission has been clearly established by comparison of genomic sequences (e.g. only 0,2 - 2% difference between human and animal genotype 3 isolates) and also by assessing the anti-HEV seroprevalence between hog producers and the general population, going respectively from 11 to 51% against 2 to 25 %.

Diagnosis strategy of HEV infection is based on its detection from stool samples or from serum or plasma by the RT-PCR technique and by the serological markers (IgM and IgG), present early in the disease, which is characterized by jaundice and asthenia. IgM appears early and may persist beyond three months while IgG which follow IgM very quickly, persist for several years after their appearance.

The quantitative RT-PCR technique is a highly sensitive and specific technic for HEV detection.

Instructions for use EurobioPlex HEV

2. Purpose of the system

Eurobioplex HEV is a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay designed for the qualitative and quantitative detection of the presence or absence of this virus in an RNA nucleic acid extract. The test is indicated for the diagnosis of presumptive HEV infection in humans, or to supplement a proven or undetermined diagnosis. The test is not intended for screening blood or organs for HEV. The RNA extract is the starting material for the Eurobioplex HEV kit.

It is up to the user to use extraction methods adapted to the tested samples.

The kit has been tested on plasma.

The EurobioPlex HEV test is an in vitro diagnostic medical device and must be used by qualified medical laboratory personnel. The device must not be recycled after use.

Instructions for use EurobioPlex HEV

3. Symbols



Catalogue reference



Batch code



Upper and lower storage temperature limits



Expiration date



Content sufficient for « N » tests



Manufacturer



Manufacturing date



CE marked product



In Vitro Diagnostic Medical Device



Instructions for use



Caution



Do not use if package is damaged



Keep away from light

Instructions for use EurobioPlex HEV

4. Principle of detection

The Eurobioplex HEV kit is a test using reverse-transcription and real-time amplification of viral RNA of HEV. The test is performed from extracted RNA from a sample using a reaction in a single tube/well.

The RNA extraction and RT-PCR inhibition control allows to check for variations that may occur during the RNA extraction step of biological samples and real-time PCR amplification. Thus, it ensures that a negative result may be due to a bad RNA extraction, and/or due to the presence of PCR inhibitors in too large quantities.

RNA of HEV is detected using a HEX labeled probe. The endogenous control is detected using a CY5 labeled probe. Probes emit a specific fluorescence following their hydrolysis during the elongation of the amplification product. The measurement of the intensity of real-time fluorescence correlates with the accumulation of amplification products.

Fluorescence is emitted and individually recorded through optical measurements during the PCR. The detection of the amplified fragment is performed by a fluorimeter using the channels shown in the Table 1.

Table 1: Detection of targets by fluorophores

Target	Fluorophore	Excitation	Emission
HEV	HEX	535 nm	555 nm
Endogenous gene	Cy5	647 nm	667 nm

Equivalent channels on different real time PCR cyclers:

- Channel **HEX** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems), Channel VIC (ABI Systems), Channel Alexa532 (SmartCycler II), Channel 580 (LC 480), Channel Yellow (RotorGene),
- Channel **Cy5** (CFX96/Chromo4, Systems ABI, Systems Mx), Channel Alexa647 (SmartCycler II), Channel 660 (LC 480), Channel Red (RotorGene)

Instructions for use EurobioPlex HEV

5. Content of the kit

The EurobioPlex HEV real-time RT-PCR kit is ready to use and contains the necessary reagents and enzymes for the detection and quantification of this virus (Table 2).

Table 2: Content of the kit

Cap color	Content of the kit	Volume for 25 reactions	Volume for 50 reactions	Volume for 100 reactions	Reconstitution
Red	Enzymes	420 µL	2 x 420 µL	4 x 420 µL	Ready to use
Transparent	Oligomix *	140 µL	2 x 140 µL	4 x 140 µL	Ready to use
Yellow	4 Standards HEV **: S-1 : 10 ⁶ copies/µl S-2 : 10 ⁵ copies/µl S-3 : 10 ⁴ copies/µl S-4 : 10 ³ copies/µl	50 µL of each	2 x 50 µL of each	4 x 50 µL of each	Ready to use
Orange	Positive Control CP	40 µL	80 µL	160 µL	Ready to use
Blue	Water = negative control (CN- H2O)	1000 µL	1000 µL	1000 µL	Ready to use

*Oligomix: contains primers and probes for HEV and for the endogenous control.

** The EBX-010 kit contains quantification standards in 4 different concentrations (see chapter 10.3 Quantitative RT-PCR).

6. Storage

All reagents should be stored between -15°C and -22°C.

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



The sensitivity of the assay may decrease if the kit components undergo multiple freeze/thaw cycles. The kit can be used after the initial opening for up to 5 freeze/thaw cycles.

7. Materials required not provided

- Biological cabinet
- Real time PCR instrument
- Centrifuge for microtubes
- Vortex
- Plates / tubes for real-time PCR reaction
- Micropipettes
- DNase-free and RNase-free filter tips for micropipettes
- Sterile microtubes
- Gloves (talc-free)

Instructions for use EurobioPlex HEV

8. Real-time PCR instrument

The EurobioPlex HEV kit has been developed and validated for use with the following real-time PCR instrument:

CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) with analysis on CFX Manager version 3.1 (Bio-Rad)

9. Cautions and note



Read these instructions carefully before starting the procedure.

- The experiment must be performed by competent staff, trained to technical and safety techniques.
- 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.
- It is the user's responsibility if he/she uses other non-validated equipment, and if so, the performances are not guaranteed.
- The experiment must be performed according to good laboratory practices.
- Do not use this kit after expiration date.
- The kit is shipped with dry ice, and the components of the kits must arrive frozen. If one or more components are defrosted, or if the tubes have been damaged, contact Eurobio-Scientific.
- Avoid freezing/thawing reagents, as this can lead to a reduction in test sensitivity.
- Once defrosted, spin down briefly the tubes before use.
- It is recommended to define three working areas: 1) Isolation of RNA, 2) Preparation of the reaction mix and 3) Amplification / Detection of amplified products.
- Oligomix containing oligonucleotides and especially dye-labelled oligonucleotides should be protected from light for optimal stability. Material's exposure to light is valid during the time required for the PCR setup.
- Positive controls should be opened and handled separately from biological samples to be tested and other kit components, to avoid cross-contamination.
- Use specific lab coat and gloves (powder free) in each working area.
- 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 internal endogenous control detects a cellular target detectable in all human samples but not in the CN-H2O negative control provided in the kit. The absence of a signal in the negative control prevents cross-contamination from occurring.
- Appropriate methods of preparation/extraction of RNA to produce high quality RNA and to be followed by a real-time RT-PCR application should be used, particularly avoiding all sources of RNase contamination.
- Always use RNase-free DNase-free filtered tips for micropipettes.
- Do not pipette with mouth and do not eat, drink or smoke in the area.
- Avoid sprays.
- The kit is not intended for single use. When reusing the device, follow the recommendations concerning authorized freeze-thaw cycles, and precautions to prevent contamination of reagents.
- Kit components must not be used separately (neither with other reagents, nor with reagents from other batches).

Instructions for use EurobioPlex HEV

- Reagents must be thawed carefully so as not to impair device performance (at +2°C/+8°C or room temperature).
- The device is not automated. It is the user's responsibility to use equipment other than that validated, in which case performance is not guaranteed.

10. Procedure

10.1 Samples collection

- Collect samples in sterile tubes.
- It is the responsibility of the user to control their own sample collection, transport, storage and extraction conditions to ensure that RNA/DNA extraction using appropriate systems produces RNA/DNA of high quality.
- It is recommended that samples are extracted immediately, or stored according to the sample storage recommendations before extraction (Table 3).
- The bibliographical references in section "6. Bibliography" provide indicative data on sample and RNA stability.



Table 3 : Storage recommendations before use

Recommendations for storage at room temperature before preparing EDTA plasma from blood	
< 24 h	
Storage recommendations at +4°C before preparing EDTA plasma from blood	
< 72 h	
Recommendations for maximum storage of samples before extraction	
Ambient temperature	2 h
+2°C/+8°C	5 days
<-70°C (preferred over -20°C)	Long term storage (>5 days and maximum 2 months at -20°C)

Caution	
	- The user may refer to the recommendations issued by the World Health Organization or the French National Authority for Health for the proper storage of samples. - Extracted RNAs should be stored at <-70°C to ensure stability. After one year's storage of RNAs at <-70°C, the Ct values obtained may increase. It is advisable to re-extract a biological sample that has been stored for more than one year. It is advisable to limit the number of times RNAs are thawed to 3. - The transport of clinical samples is subject to local regulations governing the transport of infectious agents.

Instructions for use EurobioPlex HEV

10.2 RNA/DNA extraction

It is the responsibility of the user to ensure that the nucleic acid extraction system used is compatible with real-time RT-PCR technology. We recommend using RNA/DNA extraction methods suitable to the samples used, and to refer to the instructions of the supplier of the extraction kit used.

In the EBX-010 kit, the endogenous internal control on the Cy5 channel is already present in the clinical sample. Properly detected after amplification, the endogenous internal control is used to ensure the quality of the sample and the extraction.

The performance described in this document was obtained with the following extraction technique: Maelstrom 9600 (TanBEAD) and the OptiPure Viral Auto Plate kit (ref: W665A46).

10.3 Real-time RT-PCR

General comment:

- HEV Standards and the positive control contain a very high concentration of matrix. Manipulations must be performed carefully to avoid contamination.
- To control the functioning of the RT-PCR and steps of extraction and real-time RT-PCR amplification, it is necessary to test a positive control, CP, as well as the negative control (water PCR provided = CN-H2O) (see II-3/6) of real-time RT-PCR procedure for details).

Qualitative RT-PCR

No standard range is performed. Only the CP positive control and the negative control are tested.

Quantitative RT-PCR

In addition to the negative and positive controls (CP), a standard curve must be produced using the four ready-to-use HEV standard tubes S-1 to S-4. Standards do not need to be extracted.

In order to correct for possible experimental variation, we recommend testing standards HEV in triplicates.

To generate a standard curve on a real-time PCR System, the concentrations of 10^6 , 10^5 , 10^4 and 10^3 copies/ μ l must be used and defined as standard HEV by specifying the corresponding number of copies/ μ l (table 4a).

Table 4a : Standards concentrations HEV

Standards	Concentration
S-1	10^6 copies/ μ l
S-2	10^5 copies/ μ l
S-3	10^4 copies/ μ l
S-4	10^3 copies/ μ l

Concentrations in copies/ μ l can be converted to IU (International Units), where 2.25 copies/mL correspond to 1 IU/mL, or **0.00225 copies/ μ l** correspond to 1 IU/mL (table 4b).

Instructions for use EurobioPlex HEV

Table 4b: Calculating HEV standards

HEV standard value in cp/ μ L (table 4a)	$\div$	0.00225 (cp/ μ L) =	HEV standard value in UI/mL
--	--------	-------------------------	--

Instructions for use EurobioPlex HEV

Diagram of the procedure:

1 - PREPARATION OF REACTION MIX / MASTERMIX

Number of reaction(s)	N+3
Enzymes	(N+3) x 15 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl
Total Volume Mastermix	(N+3) x 20 µl



2 - PREPARATION OF REACTIONS

Sample

20 µl Mastermix

+

5µl RNA sample

Positive Control(s)

Qualitative :

20 µl Mastermix

+

5µl CP

Quantitative :

20 µl Mastermix

+

5µl S-1 to S-4

Negative Control

20 µl Mastermix

+

5µl water supplied (CN-H2O)



3 - REAL TIME PCR INSTRUMENT

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Reverse Transcription	50 °C	10 min	1	-
Denaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Fluorescence Acquisition

Instructions for use EurobioPlex HEV

10.4 Detailed procedure

- 1) Homogenize the tube of Enzymes, and vortex Oligomix, CP, and HEV standards tubes before starting, and centrifuge.
- 2) Prepare a Mastermix as below. N is the number of PCR reactions. Plan to prepare enough reagents for at least N+3 reactions.

Number of reaction(s)	1	N+3
Enzymes	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
Total Volume Mastermix	20 µl	(N+3) x 20 µl

- 3) Homogenize the Mastermix prepared in 2) and centrifuge briefly.
- 4) Distribute 20 µl of the Mastermix with a micropipette and filtered tips in each tube or well of microplate for real time PCR.
- 5) Add 5 µl of extracted RNA sample.
- 6) In parallel test:
 - Positive control(s):
 - o Qualitative Test: 20µl Mastermix + 5µl CP
 - o Quantitative Test: 20µl Mastermix + 5µl S-1 to S-4 to generate HEV standard range
 - Negative control:
 - 20 µl Mastermix + 5 µl water supplied (CN-H2O)
- 7) Close immediately with an adhesive film or transparent caps to avoid all contamination.
- 8) Centrifuge briefly to collect all the PCR reaction mix at the bottom of the tubes or plate.
- 9) Program the real-time PCR instrument as follows.

Program	Temperature	Duration	Cycle(s)	
Reverse Transcription	50 °C	10 min	1	-
Denaturation	95°C	3 min	1	-
Amplification	95°C	10 sec	45	-
	60°C	30 sec		Fluorescence acquisition

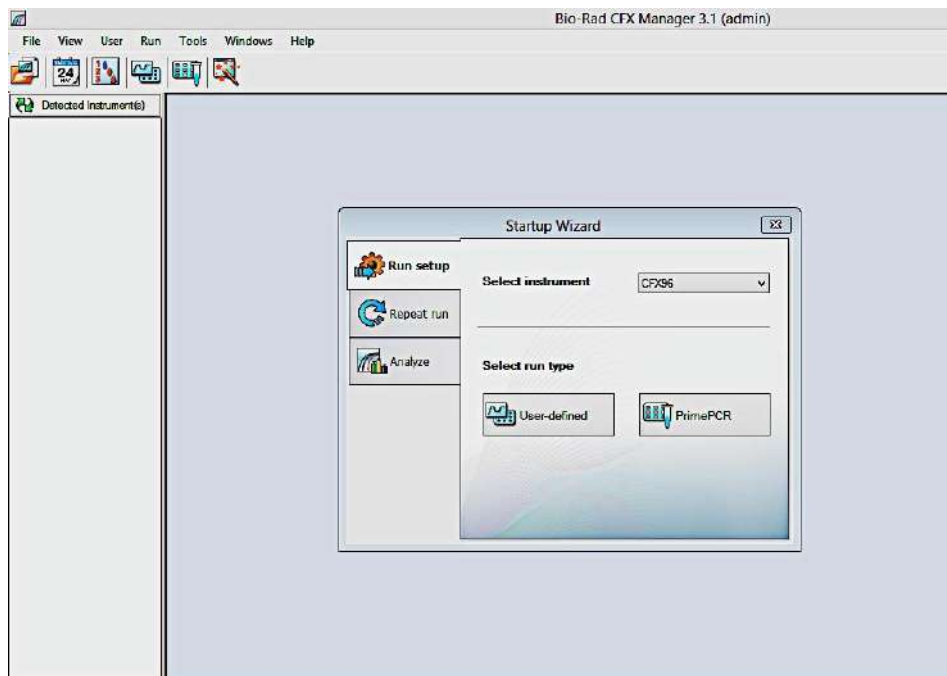
Note 4: On CFX96 (Biorad), start the run using the v1.6 or later version of CFX Manager software, and analyse with v 3.1 (see § 11. Validation of the Experiment)

11 Validation of the experiment

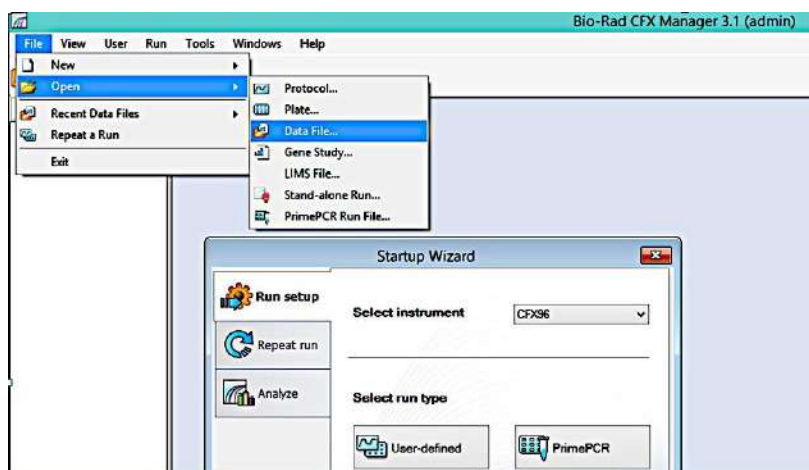
Post-acquisition data analysis on a CFX96 PCR instrument (Bio-Rad) must be performed using version 3.1 of the CFX Manager software (Bio-Rad). In order to change to this version from a run started on an earlier version, please follow the procedure below: At the end of the run, the data file with the extension .pcrd must be opened and processed with CFX Manager (Bio-Rad) version 3.1.

Instructions for use EurobioPlex HEV

If the run was started with CFX Manager v1.6 for example, to open a data file with CFX Manager v3.1, click on the CFX Manager v3.1 icon. The home screen appears.



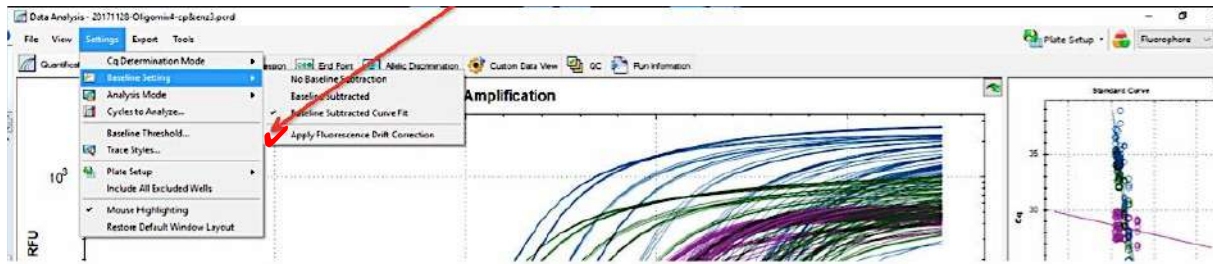
Click on "File" and select "Open" then "Data File".



Select the file you need to analyse and click on "Open".

The "Drift correction" option must be applied in the "Settings" tab as shown in the image below: click on the "Settings" tab, then on "Baseline Setting" and on "Apply Fluorescence Drift Correction".

Instructions for use EurobioPlex HEV



Once this is done, the analysis can start.

For the assay to be valid, the Ct values for the controls must be the following (Table 5). Otherwise, the experiment is not valid.

Table 5:

Positive control	
HEX	Ct ≤ 30
CY5	Ct ≤ 30
Negative control	
HEX	Undetermined Ct
CY5	Undetermined Ct

12 Data analysis and interpretation

A) Qualitative analysis

For clinical samples, the following results are possible:

Ct threshold for sample positivity (HEX channel): + Positive => Ct < 45

PCR Signal		Presence of HEV virus	Test validity/comment
HEX	CY5		
-	+	No	VALID
+	+	Yes	VALID
+	-	Yes	VALID Inhibition of RT-PCR or problem with extraction or strong competition that does not prevent the detection of virus.
-	-	No possible interpretation	Inhibition of RT-PCR or problem with extraction → dilute 5 x the sample; otherwise extract once again the sample

B) Quantitative analysis

Define the concentrations of the standards HEV (channel HEX) (10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 copies/μl for S-1, S-2, S-3 and S-4, respectively) during the setting of the thermal cycler. The software will draw the standard curve and will calculate directly the corresponding number of copies/μl for the samples.

Instructions for use EurobioPlex HEV

Depending on the volume of corporal fluid/sample extracted, and the elution volume, the concentration of HEV RNA in the eluate can be translated in the original specimen sample as the concentration/ml of specimen.

To determine the viral load per ml original specimen, the following formula can be applied.

$$\frac{\text{Viral load per microlitre eluate} \times \text{Volume eluate (microliters)}}{\text{Volume of extracted sample (milliliters)}} = \text{Viral load per milliliter sample}$$

It can be converted to IU (International Units) knowing that 2.25 copies/ml correspond to 1IU/ml.

The results below quantification threshold cannot be quantitatively validated, but retain their quality of detectability (positivity validated by the HEX channel).

Moreover, for quantitative PCR, in addition to the valid controls of Table 5, efficiency should be between 90 and 110% on the HEX channel, and the coefficient of correlation > 0.98.

Limitations on use and interpretation:

- ❖ The EurobioPlex HEV kit is used for first-line diagnostic purposes.
- ❖ All samples should be treated as potentially infected with bacteria of interest, and local biosafety regulations should be carefully followed.
- ❖ Interpretation of results should consider the possibility of false negatives and false positives.

False negatives may be due to:

- Inadequate collection of samples, or incorrect storage,
- Inappropriate extraction conditions or use of non-validated PCR instruments,
- Experimentation not respecting all elements of these instructions for use.

False positives may be due to:

- Contamination due to mishandling of high positive samples, the positive control, or the PCR amplification products,
- Failure to follow the procedure described in these instructions for use, especially to avoid sources of contamination.
- ❖ All results should be interpreted by medical professionals in the context of the patient's clinical situation, history and symptoms.
- ❖ This assay does not exclude the presence of pathogens other than those targeted in the kit.
- ❖ A negative result of this assay does not absolutely exclude a possible infection with the virus targeted in this kit.

13. Performance analysis

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity of the EurobioPlex EBX-010 HEV kit was determined on the positive control of the kit. A dilution range was performed using a plasmid mixture ranging from 10⁵ to 1 copy/μL.

Instructions for use EurobioPlex HEV

A dilution range was performed using an eluate of the WHO HEV International Standard (Paul Ehrlich Institute PEI code: 6329/10) ranging from 2083 IU/mL to 16.2 IU/mL. This dilution range was used to determine the detection limit of the EBX-010 kit. A probit assay was performed to determine the 95% positivity rate.

Detection limitation/analytical sensitivity on CP: 5 copies/ μ L

Limit of quantification on international WHO IS (1st world health organization international standard for Hepatitis E RNA Nucleic acid amplification (NAT) assay, Paul Ehrlich Institute PEI code : 6329/10) at 95%:

HEX : 63,9 IU/mL

Limit of quantification

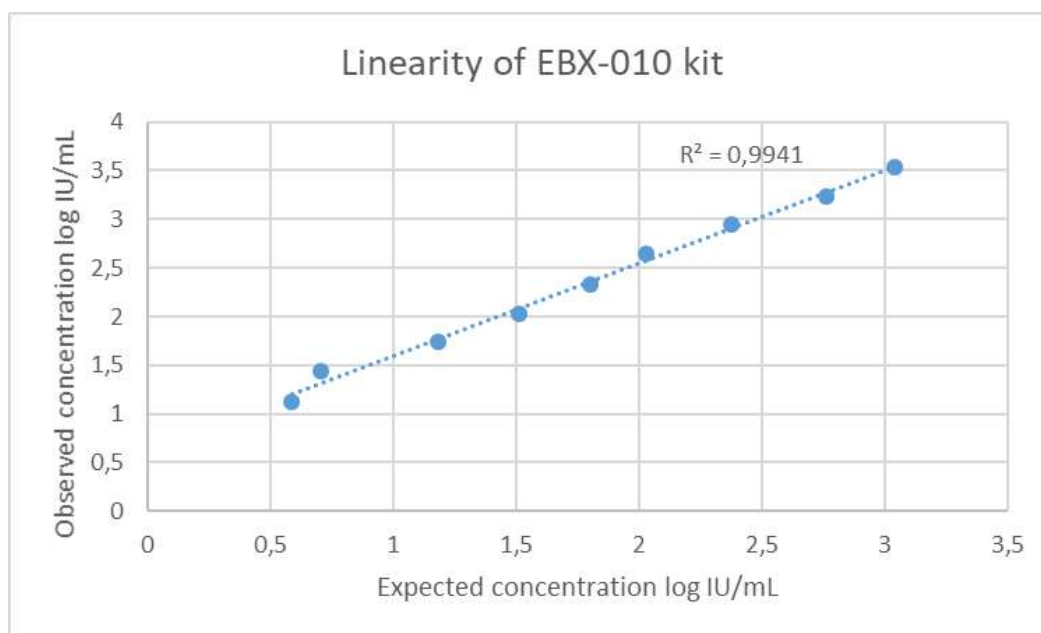
A dilution range was performed using an eluate of the WHO HEV International Standard (Paul Ehrlich Institute PEI code: 6329/10) ranging from 2083 IU/ml to 16,2 IU/mL. This dilution range was used to determine the limit of quantification of the EBX-010 kit.

Limit of quantification on international WHO IS (1st world health organization international standard for Hepatitis E RNA Nucleic acid amplification (NAT) assay, Paul Ehrlich Institute PEI code : 6329/10) :

HEX : 260 IU/mL

Linearity range

The linear measurement range of the EurobioPlex HEV kit was determined by analyzing serial dilutions of a sample titrated to 3.54 log IU/mL. Each dilution was tested in duplicate from 1.13 to 3.54 log IU/mL.



Instructions for use EurobioPlex HEV

Precision

The accuracy of the kit was established by comparing the mean of the measured values of the International WHO HEV standard (Paul Ehrlich Institute PEI code: 6329/10) to its known true value. This method was also used on a clinical sample with a known viral load.

True value of HEV standard = 3.02 log IU/mL

Bias (%) = $((3.02-3.00) / 3.02) * 100 = 0.62\%$

True value of titrated sample = 4.92 log IU/ml

Bias (%) = $((4.92-4.78) / 4.92) * 100 = 2.74\%$

Accuracy

- Intra-experimental variability:

	EBX-010	
	CY 5	HEX
Mean CV intralot CP	0.77	0.70

CV: coefficient of variation

- Inter-batch variability:

	EBX-010	
	CY 5	HEX
Mean CV inter lots CP in %	3.27	2.76

CV: coefficient of variation

Analytical specificity

The validation was performed on 10 samples negative for HEV but positive for other liver viruses, to test for cross-reactivity.

Number of samples	Sample positive for	Hepatitis E	HEV status on EBX-010
3	Hepatitis C	Negative	Negative
3	Hepatitis B	Negative	Negative
2	Hepatitis D	Negative	Negative
2	Hepatitis A	Negative	Negative

Instructions for use EurobioPlex HEV

As a reinforcement to this study, an in silico analysis was used which demonstrates the specificity of the primers and probes for HEV in the EBX-010 kit.

No aspecificity or cross reaction was detected.

The kit is 100% specific.

Diagnostic sensitivity and specificity

This validation was carried out on 66 HEV positive samples and 51 HEV negative samples.

For this study, RNA extraction was performed on Maelstrom 9600 (TANBead) with kit OptiPure Viral Auto Plate (réf : W665A46) kit, and the RT-PCR on CFX96 (Bio-Rad).

		EBX-010	
		Positive HEV	Negative HEV
Pre-tested with Altona kit	Positive HEV	66	0
	Negative HEV	0	51

Overall sensitivity: > 99% (66/66)

Overall specificity : > 99% (51/51)

Overall Concordance : > 99% (117/117)

Interfering substances (including various PCR inhibitors) were tested to ensure that they would not distort the diagnostic result obtained with the kit. A panel of AccroMetrix™ Inhibition Panel REF 956400 containing 7 substances were tested at concentrations known to be the highest possible.

All samples at each concentration were HEV positive, in HEX, in the presence of these interfering substances. There is therefore no impact of these substances on the EBX-010 kit.

Cross-contamination

The cross-contamination study on 28 CP and 28 NTC revealed sensitivity, specificity and overall concordance > 99% with intra- and inter-plate coefficients of variation < 5% on CP, for all targets.

14. Bibliography

Meng X.-J., Purcell R. H., Halbur P. G., Lehman J. R., Webb D. M., Tsareva T. T., Haynes J. S., Thacker B. J., and Emerson S. U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus . Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 9860-9865

Instructions for use EurobioPlex HEV

Wang Y. , Zhang H. , Ling R. , Li H. , and Harrisson T. J. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3 . *Journal of General Virology* 2000; 81: 1675-1666

Drobeniuc J. , Favorov M. O. , Shapiro C. N. , Bell B. P. , Mast E. E. , Dadu A. , Culver D. , Iarovoi P. , Robertson B H and Margolis H S. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *The Journal of Infectious Diseases* 2001; 184: 1594-1597

Meng X-J. , Wiseman B. , Elvinger F. , Guenette D. K. Toth T. E. , Engle R. E. , Emerson S. U. , and Purcell R. H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries . *Journal of clinical microbiology* 2002; 40 (1): 117-122

Orru G , Masia G , Orru L , Piras V , Coppola R C . Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *Journal of Virological Methods* 2004; 118: 77-82

Olsen B., Axelsson-Olsson D., Thelin A. and Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls . *Scand J Infect Dis* 2006; 38 (1): 55-58

Bouwknegt M. , Engel B. , Herremans M. M. P. T. , Widdowson M. A., Worm H. C. , Koopmans M. P. G. , Frankena K. , De Roda Husman A. M. , De Jong M. C. M. , and van der Poel W. H. M. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands . *Epidemiol Infect* 2008; 136: 567-576

Kuniholm M. H. , Purcell R. H. , McQuillan G. M. , Engle R. E. , Wasley A. , and Nelson K. E. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: Results from the third National Health and nutrition examination survey, 1988-1994 *Ht Journal of Infectious Diseases* 2009; 200: 48-56

Ward P , Poitras E , Leblanc D , Letellier A , Brassard J , Plante D , Houde A . Comparative analysis of different Taqman real-time RT-PCR assays for detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control. *Journal of Applied Microbiology* 2009; 106: 1360-1369

Zhang W , Yang S , Ren L , Shen Q , Cui L , Fan K , Huang F , Kang Y , Shan T , Wei J , Xiu H , Lou Y , Liu J , Yang Z , Zhu J , Hua X . Hepatitis E virus infection in Central China reveals no evidence of cross-species transmission between human and swine in this area. *PLoS one* 2009 ,4(12) eb156: 1-8

Meng X. J. Hepatitis E virus : Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol* 2010; 140 (3-4): 256-265

Legrand-Abravanel F. , Kamar N. , Sandres-Saune K. , Garrouste C. , Dubois M. , Mansuy J-M. , Muscari F. , Sallusto F. , Rostaing L. , and Izopet J. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France . *The Journal of Infectious Diseases* 2010; 202 (6): 835-844

Purcell R. H. and Emerson S. U. Hidden danger :The raw facts about hepatitis E virus. *The Journal of Infectious Diseases* 2010; 202 (6): 819-821

Baylis S A , Hanschmann K-M , Blümel J , and Micha Nübling C et al . Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays : an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate Laboratory performance . *J. Clin. Microbiol.* 2011, 49(4): 1234-1239

Hakze-van der Honing R. W. , van Coillie E. , Antonis A. F. G. , van der Poel W. H.M. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PloS One* 2011; 6 (8) : e22673

Instructions for use EurobioPlex HEV

Mansuy J-M., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Sauné K., Miédouge M., Ellis V., Rech H., Destruel F., Kamar N., Dalton H. R. and Izopet J. Hepatitis E virus antibodies Emerging Infectious Diseases 2011; 17 (12): 2309-2312

Faber M. S., Wenzel J. J., Jilg W., Thamm M., Höhle M., and Stark K. Hepatitis E virus seroprevalence among adults ,Germany . Emerging Infectious Diseases 2012; 18 (10): 1654-1657

Ruggeri F. M., Di Bartolo I., Ponterio E., Angeloni G., Trevisani M., Ostanello F. Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. New Microbiol 2013; 36 (4): 331-344

Smith D B , Purdy M A , Simmonds P. Genetic variability and the classification of Hepatitis E Virus. J Virol. 2013 , 87(8): 4161-4169

Dalton H.R. Hepatitis E: The 'new kid on the block' or an old friend ?. Transfus Med Hemother. 2014 , 41: 6-9

Smith D B , Simmonds P , Jameel S , Emerson S U , Harisson T J , Meng X-J , Okamoto H , Van der Poel W H M and Purdy M A. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae Journal of General Virology 2014, 95: 2223-2232

Izopet J , Labrique A B , Basnyat B , Dalton H R , Kmush B , Heaney C D et al; Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas ; Nepal, Bangladesh and southwest France . J. Clin. Virology. 2015, 70: 39-42

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

15. Quality control

In accordance with Eurobio's ISO EN 13485 certified quality management system, each batch of EurobioPlex HEV is tested according to predefined specifications to ensure consistent product quality.

16. Waste disposal

Eliminate all waste in accordance with the legislation on DASRI.

17. Incident report

Serious incidents related to the system must be reported to Eurobio Scientific and to the competent authority of the Member States in which the user and/or the patient is registered.

Instructions for use EurobioPlex HEV

18. Technical assistance

For assistance with our products, please contact our technical support.

Eurobio Scientific's customer service can be contacted by e-mail at adv@eurobio-scientific.com or by phone at +33 (0)1.69.79.64.80.



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANCE

Návod k použití pro EurobioPlex HEV



eurobio
SCIENTIFIC

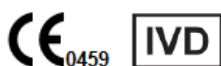
EurobioPlex HEV

Pro kvalitativní/kvantitativní RT-PCR v reálném čase

REF EBX-010-25 / EBX-010-50 / EBX-010-100



25/50/100 reakcí



EBX-010 IFU – Verze 8.03 z 01.10.2024

Validováno dne:

Detekční systém CFX96™ Real Time PCR (Bio-Rad) s analýzou na CFX Manager
verze 3.1 (Bio-Rad)



Návod k použití
K dispozici na www.eurobio-scientific.com

Souhrn bezpečnostních a funkčních charakteristik (SPSC) bude k dispozici od notifikovaného úřadu na stránkách EUDAMED, jakmile bude uveden do provozu. Lze ji také získat na vyžádání.

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

Obsah

1.	Úvod	45
3.	Symboly	47
4.	Princip detekce	48
5.	Obsah soupravy	49
6.	Skladování	49
7.	Požadovaný ale neposkytovaný materiál	49
8.	Přístroj pro PCR v reálném čase	50
9.	Upozornění a poznámka	50
10.	Postup	51
11.	Validace experimentu	55
12.	Analýza a interpretace dat	57
13.	Analýza výkonu	58
14.	Reference	61
15.	Kontrola kvality	63
16.	Likvidace odpadu	63
17.	Hlášení incidentu	63
18.	Technická podpora	63

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

1. Úvod

Virus hepatitidy E (HEV) patří do třídy Hepesviridae, rodu HepEvirus. Jedná se o jediný dosud známý hepatotropní virus se zvířecím rezervoárem. Jedná se o neobalený jednovláknový RNA virus, který je přibližně 7,5 kb dlouhý. Je považován za hlavního původce přenášené virové hepatitidy, a to velmi málo vertikálním přenosem nebo kontaminovanou krevní transfuzí, ale konkrétněji fekálně-orální cestou prostřednictvím konzumace kontaminovaných potravin. Je považován za infekční agens, který je zodpovědný za celosvětový problém veřejného zdraví.

HEV je zodpovědný za přibližně 50 % akutních virových hepatitid v rozvojových zemích s nízkou úrovní hygieny, v Asii, Africe a Jižní Americe, kde způsobuje endemické epidemické infekce. V těchto oblastech může séroprevalence dosáhnout až 60 %. Naopak v rozvinutých zemích s vysokou úrovní hygieny se virus vyskytuje spíše jako zoonotické agens, které je zodpovědné za místní sporadické nebo importované infekce. V některých zeměpisných oblastech těchto zemí je infekce HEV ve skutečnosti endemická, protože se používají mnohem citlivější sérodiagnostické techniky.

Infekce HEV je obvykle asymptomatická a benigní. Postihuje lidi všech věkových kategorií, ale má dvě dosud nevyřešené klinické charakteristiky: infikovaní jsou častěji muži než ženy a úmrtnost je obzvláště vysoká (až 30–40 %) u těhotných žen, zejména v případech fulminantní formy. Chronickou infekci lze také pozorovat zejména u osob s oslabenou imunitou, po transplantaci solidních orgánů nebo u osob trpících hematologickými malignitami.

Na základě genomických sekvencí mnoha lidských a zvířecích izolátů je HEV klasifikován do čtyř hlavních genotypů rozdělených do mnoha subtypů. Genotypy 1 a 2 infikující především člověka jsou hlavní příčinou endemických epidemií HEV v Asii, Africe a Mexiku. Díky relativně dobře konzervovaným nukleotidovým sekvencím se dělí na 5 (1a–1e) a 2 (2a–2b) podtypy. Genotypy 3 a 4 jsou primárně detekovány u psů. Genotyp 3 se vyskytuje především ve Spojených státech, ale také v některých evropských zemích a Japonsku. Genotyp 4 se vyskytuje především v Asii: Číně, Japonsku a na Tchaj-wanu. Genotypy 3–4 se vyskytují také u akutní virové hepatitidy u lidí a dělí se na 10 (3a–3j) a 7 (4a–4g) subtypů. Jejich zoonotický přenos byl jasně prokázán porovnáním genomických sekvencí (např. pouze 0,2–2 % rozdíl mezi lidskými a zvířecími izoláty genotypu 3) a také hodnocením séroprevalence anti-HEV mezi chovateli prasat a běžnou populací, která se pohybuje od 11 do 51 % proti 2 až 25 %.

Strategie diagnostiky infekce HEV je založena na detekci HEV ze vzorků stolice nebo séra či plazmy pomocí techniky RT-PCR a sérologických markerů (IgM a IgG), které jsou přítomny na počátku onemocnění, které je charakterizováno žloutenkou a astenií. IgM se objevují brzy a mohou přetrvávat déle než tři měsíce, zatímco IgG, které následují IgM velmi rychle, přetrvávají několik let po svém objevení.

Kvantitativní technika RT-PCR je vysoce citlivá a specifická technika pro detekci HEV.

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

2. Účel systému

EurobioPlex HEV je test polymerázové řetězové reakce (PCR) v reálném čase určený ke kvalitativní a kvantitativní detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti tohoto viru v extraktu nukleové kyseliny RNA. Test je určen k diagnostice předpokládané infekce HEV u lidí nebo k doplnění prokázané nebo neurčené diagnózy. Test není určen ke screeningu krve nebo orgánů na HEV. Extrakt RNA je výchozím materiálem pro soupravu EurobioPlex HEV.

Je na uživateli, aby použil extrakční metody přizpůsobené testovaným vzorkům.

Souprava byla testována na plazmě.

Test EurobioPlex HEV je diagnostický zdravotnický prostředek in vitro a musí být používán kvalifikovaným personálem zdravotnické laboratoře. Po použití se nesmí recyklovat.

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

3. Symboly



Katalogová reference



Kód šarže



Horní a dolní hranice skladovací teploty



Datum použitelnosti



Obsah dostačující pro testy „N“



Výrobce



Datum výroby



Výrobek s CE značkou



In vitro diagnostický zdravotnický prostředek



Návod k použití



Upozornění



Nepoužívejte, pokud je obal poškozený



Chraňte před světlem

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

4. Princip detekce

Souprava EurobioPlex HEV je test využívající reverzní transkripci a amplifikaci virové RNA HEV v reálném čase. Test se provádí z extrahované RNA ze vzorku pomocí reakce v jedné zkumavce/jamce.

Kontrola extrakce RNA a inhibice RT-PCR umožňuje kontrolovat odchylky, které se mohou vyskytnout během extrakce RNA biologických vzorků a amplifikace PCR v reálném čase. Tím je zajištěno, že negativní výsledek může být způsoben špatnou extrakcí RNA a/nebo přítomností inhibitorů PCR v příliš velkém množství.

RNA HEV se detekuje pomocí sondy značené HEX. Endogenní kontrola se detekuje pomocí sondy značené CY5. Sondy emitují specifickou fluorescenci po své hydrolýze během prodlužování amplifikačního produktu. Měření intenzity fluorescence v reálném čase koreluje s akumulací amplifikačních produktů.

Během PCR je emitována fluorescence, která je individuálně zaznamenávána pomocí optických měření. Detekce amplifikovaného fragmentu se provádí pomocí fluorimetru s využitím kanálů uvedených v tabulce 1.

Tabulka 1: Detekce cílů pomocí fluoroforů

Cíl	Fluorofor	Excitace	Emise
HEV	HEX	535 nm	555 nm
Endogenní gen	Cy5	647 nm	667 nm

Ekvivalentní kanály na různých PCR cyklérech v reálném čase:

- Kanál **HEX** (Chromo 4/CFX96, Mx Systems), kanál VIC (ABI Systems), kanál Alexa532 (SmartCycler II), kanál 580 (LC 480), kanál Yellow (RotorGene),
- Kanál **Cy5** (CFX96/Chromo 4, Systems ABI, Systems Mx), kanál Alexa647 (SmartCycler II), kanál 660 (LC 480), kanál Red (RotorGene).

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

5. Obsah soupravy

Souprava EurobioPlex HEV RT-PCR v reálném čase je připravena k použití a obsahuje nezbytná činidla a enzymy pro detekci a kvantifikaci tohoto viru (tabulka 2).

Tabulka 2: Obsah soupravy

Barva víčka	Obsah soupravy	Objem pro 25 reakcí	Objem pro 50 reakcí	Objem pro 100 reakcí	Rekonstituce
Červená	Enzymy	420 µl	2 x 420 µl	4 x 420 µl	Připravené k použití
Transparentní	Oligomix*	140 µl	2 x 140 µl	4 x 140 µl	Připravené k použití
Žluté	4 standardy HEV**: S-1: 10 ⁶ kopií/µl S-2: 10 ⁵ kopií/µl S-3: 10 ⁴ kopií/µl S-4: 10 ³ kopií/µl	50 µl v každé	2 x 50 µl v každé	4 x 50 µl v každé	Připravené k použití
Oranžové	Pozitivní kontrola CP	40 µl	80 µl	160 µl	Připravené k použití
Modré	Voda = negativní kontrola (CN-H2O)	1 000 µl	1 000 µl	1 000 µl	Připravené k použití

*Oligomix: obsahuje primery a sondy pro HEV a pro endogenní kontrolu.

**Souprava EBX-010 obsahuje kvantifikační standardy ve 4 různých koncentracích (viz kapitola 10.3 Kvantitativní RT-PCR).

6. Skladování

Všechna činidla by měla být skladována při teplotě od -15 °C do -22 °C.

Všechna činidla lze používat až do data použitelnosti uvedeného na štítku soupravy.



Citlivost testu se může snížit, pokud komponenty soupravy projdou několika cykly zmrazení/rozmrazení. Sadu lze po prvním otevření používat až po dobu 5 cyklů zmrazení/rozmrazení.

7. Požadovaný ale neposkytovaný materiál

- Biologická skříň
- Přístroj pro PCR v reálném čase
- Centrifuga na mikrozkušavky
- Třepačka (vortex)
- Destičky / zkumavky pro reakci PCR v reálném čase
- Mikropipety
- Filtrační špičky pro mikropipety bez DNAzy a bez RNAzy
- Sterilní mikrozkušavky
- Rukavice (bez mastku)

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

8. Přístroj pro PCR v reálném čase

Souprava EurobioPlex HEV byla vyvinuta a validována pro použití s následujícím přístrojem pro PCR v reálném čase:

Detekční systém CFX96™ Real Time PCR (Bio-Rad) s analýzou na CFX Manager verze 3.1 (Bio-Rad)

9. Upozornění a poznámka



Před zahájením postupu si pečlivě přečtěte tyto pokyny.

- Experiment musí provádět kompetentní personál, vyškolený v technických a bezpečnostních technikách.
- Přístroje musí být řádně nainstalovány, kalibrovány a udržovány podle doporučení výrobce.
- Klinické vzorky jsou potenciálně infekční a musí být zpracovávány v digestoři s laminárním prouděním.
- Pokud uživatel použije jiné neověřené zařízení, je to na jeho zodpovědnost a v takovém případě nejsou výkony zaručeny.
- Experiment musí být proveden v souladu se správnou laboratorní praxí.
- Nepoužívejte tuto soupravu po uplynutí doby použitelnosti.
- Souprava je dodávána se suchým ledem a součásti soupravy musí být doručeny zmrazené. Pokud je jedna nebo více součástí rozmrazených nebo pokud došlo k poškození zkumavek, kontaktujte společnost Eurobio-Scientific.
- Vyvarujte se zmrazování/rozmrazování činidel, protože to může vést ke snížení citlivosti testu.
- Po rozmrazení zkumavky před použitím krátce odstřed'te.
- Doporučuje se vymezit tři pracovní oblasti: 1) Izolace RNA, 2) Příprava reakční směsi a 3) Amplifikace / detekce amplifikovaných produktů.
- Oligomix obsahující oligonukleotidy a zejména oligonukleotidy značené barvivem by měl být chráněn před světlem, aby byl optimálně stabilní. Vystavení materiálu světlu platí po dobu potřebnou pro nastavení PCR.
- Pozitivní kontroly by měly být otevřeny a mělo by se s nimi manipulovat odděleně od testovaných biologických vzorků a ostatních součástí soupravy, aby se zabránilo křížové kontaminaci.
- V každé pracovní oblasti používejte specifický laboratorní plášť a rukavice (bez prášku).
- Pipety, činidla a další materiály se nesmí křížit.
- Je třeba dbát zvýšené opatrnosti, aby byla zachována čistota činidel a reakčních směsí.
- Vnitřní endogenní kontrola detekuje buněčný cíl, který je detekovatelný ve všech lidských vzorcích, ale ne v negativní kontrole CN-H2O, která je součástí soupravy. Absence signálu v negativní kontrole zabraňuje křížové kontaminaci.
- Měly by být použity vhodné metody přípravy/extrakce RNA pro získání vysoce kvalitní RNA a následnou aplikaci RT-PCR v reálném čase, zejména je třeba se vyhnout všem zdrojům kontaminace RNázou.
- Pro mikropipety vždy používejte filtrované špičky bez RNázy a DNázy.
- Nepipetujte ústy a v okolí nejezte, nepijte ani nekuřte.
- Nepoužívejte sprej.
- Souprava není určena k jednorázovému použití. Při opakovaném použití přístroje dodržujte doporučení týkající se autorizovaných cyklů zmrazování a rozmrazování a opatření k zabránění kontaminace činidel.

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

- Složky soupravy se nesmí používat samostatně (ani s jinými činidly, ani s činidly z jiných šarží).
- Činidla je třeba rozmrazovat opatrně, aby nedošlo ke zhoršení výkonu přístroje (při +2 °C/+8 °C nebo při pokojové teplotě).
- Prostředek není automatický. Za použití jiného než ověřeného zařízení odpovídá uživatel, v takovém případě není zaručena jeho výkonnost.

10. Postup

10.1 Odběr vzorku



- Odeberte vzorky do sterilních zkumavek.
- Uživatel je zodpovědný za kontrolu vlastního odběru, přepravy, skladování a podmínek extrakce vzorku, aby zajistil, že extrakce RNA/DNA pomocí vhodných systémů poskytne RNA/DNA vysoké kvality.
- Doporučuje se vzorky extrahovat okamžitě nebo je před extrakcí skladovat podle doporučení pro uchovávání vzorků (tabulka 3).
- Bibliografické odkazy v části „6. Reference“ poskytují orientační údaje o stabilitě vzorku a RNA.

Tabulka 3: Doporučení pro uchovávání před použitím

Doporučení pro uchovávání při pokojové teplotě před přípravou EDTA plazmy z krve	
< 24 h	
Doporučení pro uchovávání při +4 °C před přípravou EDTA plazmy z krve	
< 72 h	
Doporučení pro maximální uchovávání vzorků před extrakcí	
Okolní teplota	2h
+2 °C/+8 °C	5 dní
< -70 °C (preferováno nad -20 °C)	Dlouhodobé skladování (>5 dní a maximálně 2 měsíce při -20°C)

Upozornění	
	- Uživatel se může řídit doporučeními Světové zdravotnické organizace nebo francouzského Národního úřadu pro zdraví, pokud jde o správné skladování vzorků. - Extrahované RNA by měly být uchovávány při teplotě < -70 °C, aby byla zajištěna jejich stabilita. Po ročním uchovávání RNA při teplotě < -70 °C se mohou získané hodnoty Ct zvýšit. Biologický vzorek, který byl skladován déle než jeden rok, je vhodné opakově extrahovat. Doporučuje se omezit počet rozmrazení RNA na 3. - Přeprava klinických vzorků podléhá místním předpisům upravujícím přepravu infekčních agens.

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

10.2 Extrakce RNA/DNA

Uživatel je povinen zajistit, aby použitý systém extrakce nukleových kyselin byl kompatibilní s technologií RT-PCR v reálném čase. Doporučujeme použít metody extrakce RNA/DNA vhodné pro použité vzorky a řídit se pokyny dodavatele použité extrakční soupravy.

V soupravě EBX-010 je endogenní vnitřní kontrola na kanálu Cy5 již přítomna v klinickém vzorku. Po amplifikaci je správně detekována endogenní vnitřní kontrola, která slouží k zajištění kvality vzorku a extrakce.

Výkon popsany v tomto dokumentu byl získán pomocí následující techniky extrakce: Maelstrom 9600 (TANBead) a souprava OptiPure Viral Auto Plate (ref: W665A46).

10.3 RT-PCR v reálném čase

Obecný komentář:

- Standardy HEV a pozitivní kontrola obsahují velmi vysokou koncentraci matrice. Manipulace musí být prováděny opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci.
- Pro kontrolu fungování RT-PCR a kroků extrakce a amplifikace RT-PCR v reálném čase je nutné testovat pozitivní kontrolu, CP, a také negativní kontrolu (voda PCR za předpokladu = CN-H₂O) (podrobnosti viz II-3/6) postupu RT-PCR v reálném čase).

Kvalitativní RT-PCR

Není prováděno žádné standardní rozmezí. Testuje se pouze pozitivní kontrola CP a negativní kontrola.

Kvantitativní RT-PCR

Kromě negativní a pozitivní kontroly (CP) je třeba vytvořit standardní křivku pomocí čtyř standardních zkumavek HEV připravených k použití S-1 až S-4. Standardy nemusí být extrahovány.

Za účelem korekce možné experimentální odchylky doporučujeme testovat standardy HEV ve třech opakováních.

Pro vytvoření standardní křivky na systému PCR v reálném čase je třeba použít koncentrace 10⁶, 10⁵, 10⁴ a 10³ kopií/μl a definovat je jako standardní HEV uvedením příslušného počtu kopií/μl (tabulka 4a).

Tabulka 4a: Koncentrace standardu HEV

Standardy	Koncentrace
S-1	10 ⁶ kopií/μl
S-2	10 ⁵ kopií/μl
S-3	10 ⁴ kopií/μl
S-4	10 ³ kopií/μl

Koncentrace v kopiích/μl lze přepočítat na IU (mezinárodní jednotky), kde 2,25 kopií/ml odpovídá 1 IU/ml nebo **0,00225 kopií/μl** odpovídá 1 IU/ml (tabulka 4b).

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

Tabulka 4b: Výpočet HEV standardů

Standardní hodnota HEV v cp/μl (tabulka 4a)	÷	0,00225 (cp/μl)	=	Hodnota standardu HEV v UI/ml
--	---	-----------------	---	--

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

Schéma postupu:

1 - PŘÍPRAVA REAKČNÍ SMĚSI / MASTERMIX

Počet reakcí	N+3
Enzymy	(N+3) x 15 µl
Oligomix	(N+3) x 5 µl
Celkový objem Mastermix	(N+3) x 20 µl

2 - PŘÍPRAVA REAKCÍ

Vzorek

20 µl Mastermix
+
5 µl vzorku RNA

Pozitivní kontrola(y)

Kvalitativní:
20 µl Mastermix
+
5 µl CP

Kvantitativní:
20 µl Mastermix
+
5 µl S-1 až S-4

Negativní

20 µl Mastermix
+
5 µl dodané vody (CN-H2O)

3 - PŘÍSTROJ PCR V REÁLNÉM ČASE

Program	Teplota	Trvání	Cyklus(y)	
Reverzní tran-skripce	50 °C	10 min	1	-
Denaturace	95 °C	3 min	1	-
Amplifikace	95 °C	10 s	45	-
	60 °C	30 s		Fluorescenční akvizice

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

10.4 Detailní postup

- 3) Homogenizujte zkumavku s enzymy a před zahájením práce vortexujte zkumavky se standardy Oligomix, CP a HEV a odstřed'te je.
- 4) Připravte Mastermix podle postupu níže. N je počet PCR reakcí. Naplánujte si dostatek činidel pro nejméně N+3 reakce.

Počet reakcí	1	N+3
Enzymy	15 µl	(N+3) x 15 µl
Oligomix	5 µl	(N+3) x 5 µl
Celkový objem Mastermix	20 µl	(N+3) x 20 µl

- 10) Homogenizujte Mastermix připravený v bodě 2) a krátce odstřed'te.
- 11) Do každé zkumavky nebo jamky mikrotitrační destičky pro PCR v reálném čase rozděl'te 20 µl Mastermixu pomocí mikropipety a filtračních špiček.
- 12) Přidejte 5 µl extrahovaného vzorku RNA.
- 13) V paralelním testu:
 - Pozitivní kontrola(y):
 - Kvalitativní test: 20 µl Mastermix + 5 µl CP
 - Kvantitativní test: 20 µl Mastermix + 5 µl S-1 to S-4 pro vytvoření standardního rozmezí HEV
 - Negativní kontrola:
 - 20 µl Mastermix + 5 µl dodané vody (CN-H2O)
- 14) Okamžitě je uzavřete lepicí fólií nebo průhledným uzávěrem, abyste zabránili jakékoli kontaminaci.
- 15) Krátce odstřed'te, aby se veškerá reakční směs PCR zachytila na dně zkumavky nebo destičky.
- 16) Naprogramujte přístroj PCR v reálném čase takto.

Program	Teplota	Trvání	Cyklus(y)	
Reverzní transkripce	50 °C	10 min	1	-
Denaturace	95 °C	3 min	1	-
Amplifikace	95 °C	10 s	45	-
	60 °C	30 s		Fluorescenční akvizice

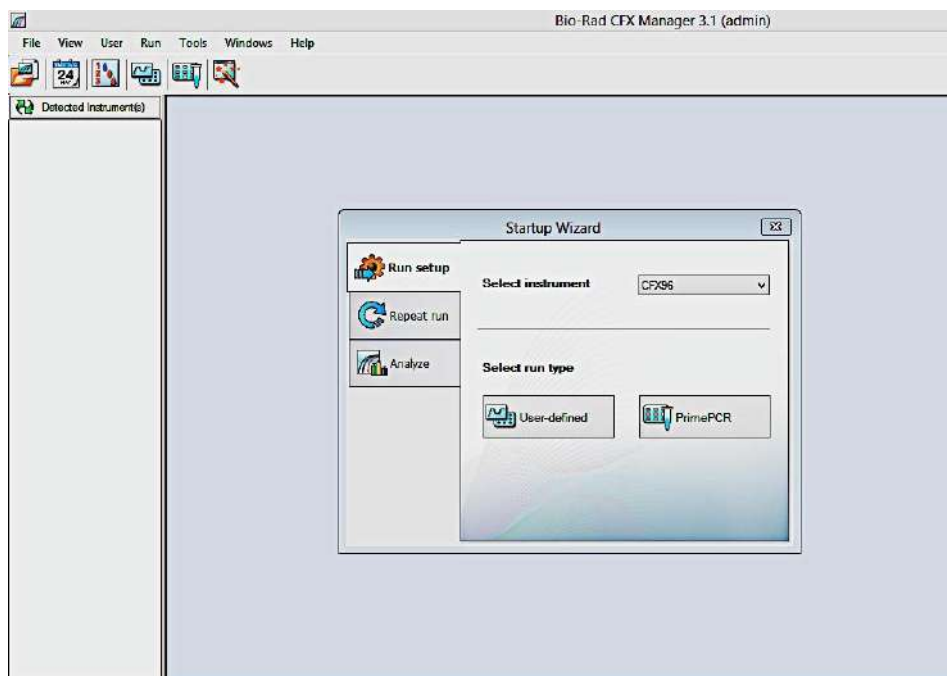
Poznámka 4: U CFX96 (Bio-Rad) spusťte běh pomocí verze 1.6 nebo novější softwaru CFX Manager a analyzujte pomocí verze 3.1 (viz § 11. Validace experimentu)

11 Validace experimentu

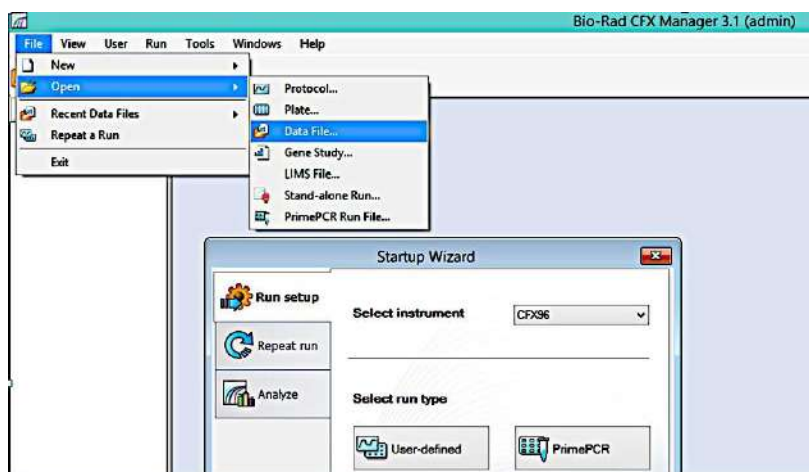
Analýza dat po akvizici na přístroji CFX96 PCR (Bio-Rad) musí být provedena pomocí verze 3.1 softwaru CFX Manager (Bio-Rad). Chcete-li přejít na tuto verzi z běhu zahájeného na starší verzi, postupujte podle následujícího postupu: Na konci běhu je třeba otevřít datový soubor s příponou .pcrd a zpracovat jej pomocí programu CFX Manager (Bio-Rad) verze 3.1.

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

Pokud byl běh spuštěn například pomocí aplikace CFX Manager v1.6, otevřete datový soubor pomocí aplikace CFX Manager v3.1 kliknutím na ikonu CFX Manager v3.1. Zobrazí se domovská obrazovka.



Klikněte na „File“ (Soubor) a vyberte „Open“ (Otevřít) a poté „Data File“ (Datový soubor).



Vyberte soubor, který chcete analyzovat, a klikněte na tlačítko „Open“ (Otevřít).

Na kartě „Nastavení“ je třeba použít možnost „Korekce posunu“, jak je znázorněno na obrázku níže: Klikněte na kartu „Settings“ (Nastavení), poté na „Baseline Setting“ (Nastavení základní linie) a na „Apply Fluorescence Drift Correction“ (Použít korekci posunu fluorescence).

Aby byl test validní, musí být hodnoty Ct pro kontroly následující (tabulka 5). Jinak není experiment validní.

Pozitivní kontrola	
HEX	Ct ≤ 30
CY5	Ct ≤ 30
Negativní kontrola	
HEX	Nestanovený Ct
CY5	Nestanovený Ct

A) Kvalitativní analýza

Prahová hodnota Ct pro pozitivitu vzorku (HEX kanál): + Pozitivní => Ct < 45

B) Kvantitativní analýza

Pro stanovení virové nálože na 1 ml původního vzorku lze použít následující vzorec.

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

Virová nálož na mikrolitr **eluátu** x Objem **eluátu** (mikrolitry)

Objem extrahovaného **vzorku** (v mililitrech)

=

Virová zátěž na mililitr **vzorku**

Lze ji převést na IU (mezinárodní jednotky), protože víme, že 2,25 kopií/ml odpovídá 1 IU/ml.

Výsledky pod prahem kvantifikace nelze kvantitativně validovat, ale zachovávají si kvalitu detekovatelnosti (pozitivita validovaná kanálem HEX).

Kromě toho by pro kvantitativní PCR měla být kromě platných kontrol uvedených v tabulce 5 účinnost na kanálu HEX mezi 90 a 110 % a korelační koeficient > 0,98.

Omezení použití a interpretace:

- ❖ Souprava EurobioPlex HEV se používá pro diagnostické účely první linie.
- ❖ Se všemi vzorky je třeba zacházet jako s potenciálně infikovanými zájmovými bakteriemi a pečlivě dodržovat místní předpisy o biologické bezpečnosti.
- ❖ Při interpretaci výsledků je třeba vzít v úvahu možnost falešně negativních a falešně pozitivních výsledků.
Falešně negativní výsledky mohou být z následujících důvodů:
 - nevhodný odběr vzorků nebo nesprávné uchovávání,
 - nevhodné podmínky extrakce nebo použití nevalidovaných PCR přístrojů,
 - experimentování při nedodržení všech prvků tohoto návodu k použití.Falešně pozitivní výsledky mohou být z následujících důvodů:
 - kontaminace způsobená nesprávným zacházením s vysoce pozitivními vzorky, pozitivní kontrolou nebo produkty amplifikace PCR,
 - nedodržení postupu popsaného v tomto návodu k použití, zejména vyhnutí se zdrojům kontaminace.
- ❖ Všechny výsledky by měly být interpretovány zdravotnickými pracovníky v kontextu klinické situace, anamnézy a příznaků pacienta.
- ❖ Tento test nevylučuje přítomnost jiných patogenů než těch, na které se zaměřuje souprava.
- ❖ Negativní výsledek tohoto testu absolutně nevylučuje možnou infekci virem, na který je tento kit zaměřen.

13. Analýza výkonu

Analytická senzitivita

Analytická citlivost soupravy EurobioPlex EBX-010 HEV byla stanovena na pozitivní kontrole soupravy. Bylo provedeno ředění směsi plazmidů v rozsahu od 10^5 do 1 kopie/ μ l.

Rozsah ředění byl proveden s použitím eluátu mezinárodního standardu WHO HEV (kód PEI Paul Ehrlich Institute): 6329/10) v rozmezí od 2 083 IU/ml do 16,2 IU/ml. Tento rozsah ředění byl použit pro stanovení detekčního limitu soupravy EBX-010. Pro stanovení 95 % míry positivity byl proveden probitový test.

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

Omezení detekce/analytická citlivost na CP: 5 kopií/μl

Mez stanovitelnosti podle mezinárodního standardu WHO IS (1. mezinárodní standard Světové zdravotnické organizace pro test amplifikace nukleové kyseliny (NAT) u hepatitidy E RNA, Paul Ehrlich Institute PEI kód: 6329/10) při 95 %:

HEX: 63,9 IU/ml

Limit kvantifikace

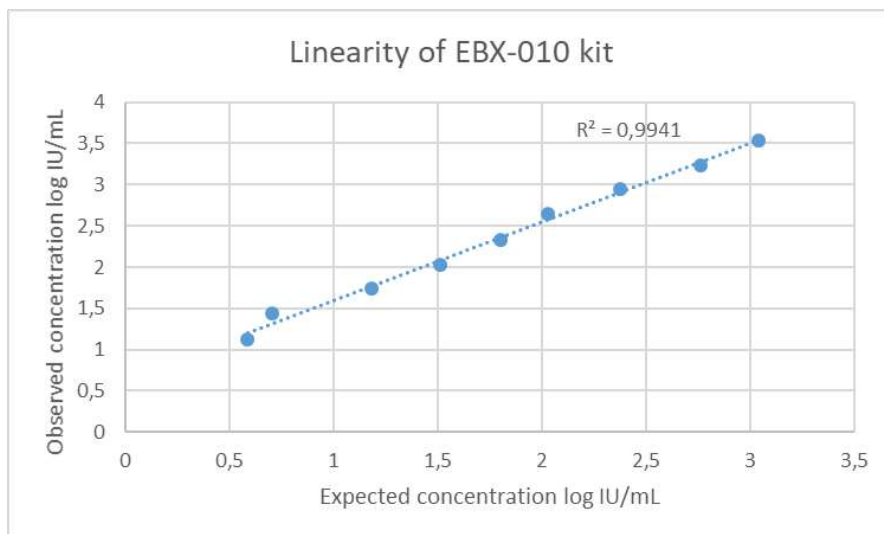
Rozsah ředění byl proveden s použitím eluátu mezinárodního standardu WHO HEV (kód PEI Paul Ehrlich Institute): 6329/10) v rozmezí od 2 083 IU/ml do 16,2 IU/ml. Tento rozsah ředění byl použit pro stanovení meze stanovitelnosti soupravy EBX-010.

Mez stanovitelnosti podle mezinárodního standardu WHO IS (1. mezinárodní standard Světové zdravotnické organizace pro test amplifikace nukleové kyseliny (NAT) u hepatitidy E RNA, Paul Ehrlich Institute PEI kód: 6329/10):

HEX: 260 IU/ml

Rozmezí linearity

Lineární rozsah měření soupravy EurobioPlex HEV byl stanoven analýzou sériových ředění vzorku titrovaného na 3,54 log IU/ml. Každé ředění bylo testováno ve dvou opakováních od 1,13 do 3,54 log IU/ml.



Přesnost

Přesnost soupravy byla stanovena porovnáním průměrných naměřených hodnot mezinárodního standardu WHO HEV (kód PEI Institutu Paula Ehrlicha: 6329/10) na jeho známou skutečnou hodnotu. Tato metoda byla použita také na klinickém vzorku se známou virovou náloží.

Skutečná hodnota standardu HEV = 3,02 log IU/ml

Zkreslení (%) = $((3,02 - 3,00) / 3,02) * 100 = 0,62 \%$.

Skutečná hodnota titrovaného vzorku = 4,92 log IU/ml

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

Zkreslení (%) = $((4,92-4,78) / 4,92) * 100 = 2,74 \%$.

Přesnost

- Intra-experimentální variabilita:

	EBX-010	
	CY 5	HEX
Průměrný CV intralot CP	0,77	0,70

CV: koeficient změny

- Variabilita mezi šaržemi:

	EBX-010	
	CY 5	HEX
Průměrný CV mezi šaržemi CP v %	3,27	2,76

CV: koeficient změny

Analytická specifita

Validace byla provedena na 10 vzorcích negativních na HEV, ale pozitivních na jiné jaterní viry, aby se ověřila křížová reaktivita.

Počet vzorků	Vzorek pozitivní na	hepatitidu E	Stav HEV na EBX-010
3	Hepatitida C	Negativní	Negativní
3	Hepatitida B	Negativní	Negativní
2	Hepatitida D	Negativní	Negativní
2	Hepatitida A	Negativní	Negativní

Jako doplněk k této studii byla použita analýza in silico, která prokázala specifičnost primerů a sond pro HEV v sadě EBX-010.

Nebyla zjištěna žádná aspecifita ani zkřížená reakce.

Souprava je 100 % specifická.

Diagnostická senzitivita a specifita

Tato validace byla provedena na 66 HEV pozitivních vzorcích a 51 HEV negativních vzorcích.

Pro tuto studii byla extrakce RNA provedena na přístroji Maelstrom 9600 (TANBead) se sadou OptiPure Viral Auto Plate (réf: W665A46) souprava a RT-PCR na CFX96 (Bio-Rad).

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

		EBX-010	
		Pozitivní HEV	Negativní HEV
Předběžně testováno pomocí soupravy Altona	Pozitivní HEV	66	0
	Negativní HEV	0	51

Celková senzitivita: > 99 % (66/66)

Celková specifita: > 99 % (51/51)

Celková shoda: > 99 % (117/117)

Byly testovány interferující látky (včetně různých inhibitorů PCR), aby se zajistilo, že nezkreslí diagnostický výsledek získaný pomocí soupravy. Byl testován panel AccroMetrix™ Inhibition Panel REF 956400 obsahující 7 látek ve známých nejvyšších možných koncentracích.

Všechny vzorky v každé koncentraci byly v přítomnosti těchto interferujících látek HEV pozitivní v HEX. Tyto látky proto nemají na soupravu EBX-010 žádný vliv.

Zkřížená kontaminace

Studie zkřížené kontaminace na 28 CP a 28 NTC odhalila u všech cílů citlivost, specifičnost a celkovou shodu > 99 % s variačními koeficienty uvnitř a mezi deskami < 5 % u CP.

14. Reference

Meng X-J., Purcell R. H., Halbur P. G., Lehman J. R., Webb D. M., Tsareva T. T., Haynes J. S., Thacker B. J., and Emerson S. U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus . Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 9860-9865

Wang Y., Zhang H., Ling R., Li H., and Harrisson T. J. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3 . Journal of General Virology 2000; 81: 1675-1666

Drobeniuc J., Favorov M. O., Shapiro C. N., Bell B. P., Mast E. E., Dadu A., Culver D., Iarovoi P., Robertson B H and Margolis H S. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. The Journal of Infectious Diseases 2001; 184: 1594-1597

Meng X-J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D. K. Toth T. E., Engle R. E., Emerson S. U., and Purcell R. H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

in normal blood donors in the United States and other countries . Journal of clinical microbiology 2002; 40 (1): 117-122

Orru G , Masia G , Orru L , Piras V , Coppola R C . Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. Journal of Virological Methods 2004; 118: 77-82

Olsen B., Axelsson-Olsson D., Thelin A. and Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls . Scand J Infect Dis 2006; 38 (1): 55-58

Bouwknegt M. , Engel B. , Herremans M. M. P. T. , Widdowson M. A., Worm H. C. , Koopmans M. P. G. , Frankena K. , De Roda Husman A. M. , De Jong M. C. M. , and van der Poel W. H. M. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands . Epidemiol Infect 2008; 136: 567-576

Kuniholm M. H. , Purcell R. H. , McQuillan G. M. , Engle R. E. , Wasley A. , and Nelson K. E. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: Results from the third National Health and nutrition examination survey, 1988-1994 Ht Journal of Infectious Diseases 2009; 200: 48-56

Ward P , Poitras E , Leblanc D , Letellier A , Brassard J , Plante D , Houde A . Comparative analysis of different Taqman real-time RT-PCR assays for detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control. Journal of Applied Microbiology 2009; 106: 1360-1369

Zhang W , Yang S , Ren L , Shen Q , Cui L , Fan K , Huang F , Kang Y , Shan T , Wei J , Xiu H , Lou Y , Liu J , Yang Z , Zhu J , Hua X . Hepatitis E virus infection in Central China reveals no evidence of cross-species transmission between human and swine in this area. PLoS one 2009 ,4(12) eb156: 1-8

Meng X. J. Hepatitis E virus : Animal reservoirs and zoonotic risk. Vet Microbiol 2010; 140 (3-4): 256-265

Legrand-Abravanel F. , Kamar N. , Sandres-Saune K. , Garrouste C. , Dubois M. , Mansuy J-M. , Muscari F. , Sallusto F. , Rostaing L. , and Izopet J. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France . The Journal of Infectious Diseases 2010; 202 (6): 835-844

Purcell R. H. and Emerson S. U. Hidden danger :The raw facts about hepatitis E virus. The Journal of Infectious Diseases 2010; 202 (6): 819-821

Baylis S A , Hanschmann K-M , Blümel J , and Micha Nübling C et al . Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays : an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate Laboratory performance . J. Clin. Microbiol. 2011, 49(4): 1234-1239

Hakze-van der Honing R. W. , van Coillie E. , Antonis A. F. G. , van der Poel W. H.M. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. PLoS One 2011; 6 (8) : e22673

Mansuy J-M. , Bendall R. , Legrand-Abravanel F. , Sauné K. , Miédouge M. , Ellis V. , Rech H., Destruel F., Kamar N., Dalton H. R. and Izopet J. Hepatitis E virus antibodies Emerging Infectious Diseases 2011; 17 (12): 2309-2312

Faber M. S., Wenzel J. J., Jilg W., Thamm M., Höhle M., and Stark K. Hepatitis E virus seroprevalence among adults ,Germany . Emerging Infectious Diseases 2012; 18 (10): 1654-1657

Ruggeri F. M., Di Bartolo I., Ponterio E. , Angeloni G. , Trevisani M. , Ostanello F. Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. New Microbiol 2013; 36 (4): 331-344

Návod k použití pro EurobioPlex HEV

Smith D B , Purdy M A , Simmonds P. Genetic variability and the classification of Hepatitis E Virus. J Virol. 2013 , 87(8): 4161-4169

Dalton H.R. Hepatitis E: The 'new kid on the block' or an old friend ?. Transfus Med Hemother. 2014 , 41: 6-9

Smith D B , Simmonds P , Jameel S , Emerson S U , Harisson T J , Meng X-J , Okamoto H , Van der Poel W H M and Purdy M A. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae Journal of General Virology 2014, 95: 2223-2232

Izopet J , Labrique A B , Basnyat B , Dalton H R , Kmush B , Heaney C D et al; Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas ; Nepal, Bangladesh and southwest France . J. Clin. Virology. 2015, 70: 39-42

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

15. Kontrola kvality

V souladu s certifikovaným systémem řízení kvality společnosti Eurobio podle normy ISO EN 13485 je každá šarže přípravku EurobioPlex HEV testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna stálá kvalita produktu.

16. Likvidace odpadu

Odstraňte veškerý odpad v souladu s právními předpisy o DASRI.

17. Hlášení incidentu

Závažné incidenty související se systémem musí být hlášeny společnosti Eurobio Scientific a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém je uživatel a/nebo pacient registrován.

18. Technická podpora

Pro pomoc s našimi produkty se obraťte na naši technickou podporu.

Zákaznický servis společnosti Eurobio Scientific můžete kontaktovat e-mailem na adrese adv@eurobio-scientific.com nebo telefonicky na čísle +33 (0)1 69 79 64 80.



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANCIE

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV



EurobioPlex HEV

Per la RT-PCR **qualitativa/quantitativa** in tempo reale

REF

EBX-010-25/EBX-010-50/EBX-010-100



25/50/100 reazioni



EBX-010 istruzioni per l'uso - Versione 8.03 del 01/10/2024

Validato su:

CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con analisi su CFX Manager versione 3.1 (Bio-Rad)



Istruzioni per l'uso
Disponibile su www.eurobio-scientific.com

La Sintesi delle caratteristiche di sicurezza e di prestazione clinica (SSCP) sarà messa a disposizione dall'organismo notificato su EUDAMED non appena quest'ultima sarà operativa. Può anche essere ottenuta su richiesta.

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

Indice

Indice	65
1. Informazioni generali	66
2. Destinazione del dispositivo	67
3. Simboli	68
4. Premessa.....	69
5. Componenti del kit.....	70
6. Conservazione e deposito	70
7. Attrezzatura necessaria non fornita	70
8. Strumento di PCR in tempo reale.....	70
9. Avvertenze e precauzioni.....	71
10. Protocollo.....	72
11. Convalida dell'esperimento.....	77
12. Analisi dei dati e interpretazione.....	78
13. Analisi delle prestazioni.....	80
14. Bibliografia.....	83
15. Controllo qualità	84
16. Smaltimento dei rifiuti	85
17. Incident reporting	85
18. Assistenza tecnica.....	85

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

1. Informazioni generali

Il virus dell'epatite E (HEV) fa parte della famiglia *Hepeviridae*, genere *HepEvirus*. È l'unico virus epatotropo con un serbatoio animale ad oggi noto. Si tratta di un virus a singolo filamento di RNA di circa 7,5 kb, non rivestito. Viene considerato come agente eziologico principale dell'epatite virale trasmessa, raramente per via verticale o mediante trasfusione di sangue contaminato e, soprattutto, per via oro-fecale attraverso il consumo di cibo contaminato. Viene riconosciuto quale agente infettivo responsabile di problemi di salute pubblica in tutto il mondo.

L'HEV è responsabile di circa il 50% delle epatiti virali acute nei Paesi in via di sviluppo con condizioni igieniche scarse dell'Asia, dell'Africa e del Sudamerica, causando infezioni a carattere endemico-epidemico. In queste regioni, la sieroprevalenza può arrivare fino al 60%. Al contrario, nei Paesi sviluppati con standard igienici elevati, è più probabile che il virus si presenti come agente zoonotico che causa infezioni sporadiche autoctone e/o importate. In alcune aree geografiche di questi Paesi, l'infezione da HEV ha, in realtà, un carattere endemico a seguito dell'impiego di tecniche di sierodiagnosi molto più sensibili.

L'infezione da HEV è generalmente asintomatica e benigna. Colpisce la popolazione umana di qualsiasi età, ma presenta due caratteristiche cliniche non ancora chiarite: gli uomini si infettano maggiormente rispetto alle donne, mentre il tasso di mortalità è particolarmente elevato (fino ad un 30-40%) nelle donne in gravidanza, soprattutto nei casi di forme fulminanti. L'infezione cronica può essere rilevata inoltre nei soggetti immunocompromessi, nei trapiantati di organi solidi o nei soggetti affetti da neoplasie ematologiche.

Sulla base delle sequenze genomiche di numerosi isolati umani e animali, la HEV viene classificata in quattro genotipi principali divisi in numerosi sottotipi. I genotipi 1 e 2 responsabili principalmente dell'infezione umana, rappresentano la causa principale delle infezioni da HEV endemiche-epidemiche in Asia, Africa e Messico. Con sequenze nucleotidiche relativamente ben conservate, si suddividono rispettivamente in 5 (1a - 1e) e in 2 (2a - 2b) sottotipi. I genotipi 3 e 4 si rilevano principalmente nei suini. Il genotipo 3 circola prevalentemente negli Stati Uniti ma anche in alcuni Paesi europei e in Giappone. Il genotipo 4 circola prevalentemente in Asia: Cina, Giappone e Taiwan. I genotipi 3 - 4 vengono inoltre rilevati nei casi di epatite virale acuta umana e si suddividono rispettivamente in 10 (3a - 3j) e in 7 (4a - 4g) sottotipi. La loro trasmissione zoonotica è stata chiaramente accertata dal confronto di sequenze genomiche (ad es., una differenza di solo 0,2-2% tra isolati umani e animali di genotipo 3) nonché valutando la sieroprevalenza anti-HEV tra gli allevatori di suini e la popolazione generale, che varia dall'11 al 51% contro, rispettivamente, il 2-25%.

La strategia diagnostica dell'infezione da HEV si fonda sulla sua rilevazione partendo da campioni di feci, siero o plasma mediante la tecnica RT-PCR, e mediante marker sierologici (IgM e IgG) presenti già dall'insorgenza della malattia, caratterizzata da ittero e astenia. Le IgM compaiono precocemente e possono persistere per più di tre mesi, mentre le IgG, che seguono le IgM molto rapidamente, persistono per diversi anni dopo la loro comparsa. La tecnica della RT-PCR quantitativa è una tecnica estremamente sensibile e specifica per la rilevazione della HEV.

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

2. Destinazione del dispositivo

EurobioPlex HEV è un test di amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) in tempo reale, progettato per la rilevazione qualitativa e quantitativa della presenza o dell'assenza di tale virus in un estratto di acidi nucleici RNA. Il test è indicato per contribuire alla diagnosi presuntiva di infezione da HEV nell'uomo, o per integrare una diagnosi accertata o indeterminata. Il test non è destinato allo screening del sangue o degli organi per il virus HEV. L'estratto di RNA rappresenta il materiale di partenza per il kit EurobioPlex HEV.

Spetta all'utente impiegare metodi di estrazione adeguati ai campioni da analizzare.

Il kit è stato testato su plasma.

Il test EurobioPlex HEV è un dispositivo medico-diagnostico *in vitro* il cui uso è riservato al personale di laboratorio di analisi di biologia clinica qualificato. Non deve essere riciclato dopo l'uso.

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

3. Simboli



Numero di catalogo



Codice del lotto



Limite minimo e massimo di temperatura di conservazione



Data di scadenza



Contenuto sufficiente per «N» test



Fabbricante



Data di fabbricazione



Prodotto marcato CE



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*



Consultare le istruzioni per l'uso.



Attenzione



Non usare se la confezione è danneggiata.



Conservare al riparo dalla luce solare

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

4. Premessa

EurobioPlex HEV è un test di amplificazione dell'acido ribonucleico (RNA) della HEV. Il test viene effettuato partendo da RNA estratto dal campione mediante una singola reazione in un singolo pozzetto/provetta.

La presenza di un gene costitutivo umano con funzione di controllo per la qualità del prelievo, per l'estrazione del RNA e l'inibizione della RT-PCR consente di determinare possibili variazioni che possono intervenire durante le fasi di estrazione di RNA di campioni biologici e di amplificazione mediante RT-PCR in tempo reale. Consente inoltre di garantire che un risultato negativo non possa essere dovuto a un'estrazione errata di RNA e/o alla presenza di inibitori della RT-PCR in quantità eccessiva.

L'RNA della HEV viene rilevato mediante una sonda marcata HEX. Il controllo endogeno viene rilevato mediante una sonda marcata CY5. Durante l'elongazione del prodotto di amplificazione, le sonde emettono una specifica fluorescenza come risultato della loro idrolisi. La misura dell'intensità della fluorescenza in tempo reale è relativa all'accumulo di prodotti di amplificazione specifici.

La fluorescenza viene emessa e misurata individualmente con un sistema ottico durante la PCR. La rilevazione dei frammenti amplificati viene effettuata mediante un fluorimetro, usando i canali indicati nella Tabella 1.

Tabella 1: Rilevamento dei target basato su fluorofori

Target	Fluoroforo	Eccitazione	Emissione
HEV	HEX	535 nm	555 nm
Controllo endogeno	Cy5	647 nm	667 nm

Canali equivalenti su strumenti di PCR diversi:

- Canale **HEX** (Chromo 4/CFX96, Sistemi Mx, Canale VIC (Sistemi ABI), Canale Alexa532 (SmartCycler II), Canale 580 (LC 480), Canale Yellow (RotorGene),
- Canale **Cy5** (Sistemi ABI, Sistemi Mx, Chromo4/CFX96), Canale Alexa647 (SmartCycler II), Canale 660 (LC 480), Canale Red (RotorGene)

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

5. Componenti del kit

Il kit per la RT-PCR in tempo reale EurobioPlex HEV è pronto all'uso e contiene i reagenti e gli enzimi necessari alla rilevazione e alla quantificazione di tale virus (Tabella 2).

Tabella 2: Componenti del kit

Colore del tappo	Componenti del kit	Volume per 25 reazioni	Volume per 50 reazioni	Volume per 100 reazioni	Ricostituzione
Rosso	Enzimi	420 µL	2 x 420 µL	4 x 420 µL	Pronto all'uso
Trasparente	Oligomix*	140 µL	2 x 140 µL	4 x 140 µL	Pronto all'uso
Giallo	4 standard HEV**: S-1 a 10 ⁶ copie/µL S-2 a 10 ⁵ copie/µL S-3 a 10 ⁴ copie/µL S-4 a 10 ³ copie/µL	50 µL di ciascuna	2 x 50 µL di ciascuna	4 x 50 µL di ciascuna	Pronto all'uso
Arancione	Controllo positivo CP	40 µL	80 µL	160 µL	Pronto all'uso
Blu	Acqua = controllo negativo (CN-H2O)	1000 µL	1000 µL	1000 µL	Pronto all'uso

*Oligomix: contiene i primer e le sonde per il target HEV e per il controllo endogeno.

** Il kit EBX-010 contiene degli standard di quantificazione a 4 diverse concentrazioni (si veda il capitolo 10.3, sezione RT-PCR quantitativa).

6. Conservazione e deposito

Tutti i reagenti devono essere conservati a una temperatura fra -15°C e -22°C.

Tutti i reagenti possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del kit.



La sensibilità del test può diminuire qualora i componenti del kit vengano sottoposti a diversi cicli di congelamento/scongelo. Dopo la prima apertura, il kit può essere utilizzato per un massimo di 5 cicli di congelamento e scongelamento.

7. Attrezzatura necessaria non fornita

- Cappa biologica
- Strumento PCR in tempo reale
- Centrifuga per microprovette
- Vortex
- Piastre/provette per reazione PCR in tempo reale
- Micropipette
- Puntali DNase-free e RNase-free con filtro per micropipette
- Microprovette sterili
- Guanti (senza talco)

8. Strumento di PCR in tempo reale

Il kit EurobioPlex HEV è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con il seguente strumento di PCR in tempo reale:

CFX96™ Real Time PCR detection system (Bio-Rad) con analisi su CFX Manager versione 3.1 (Bio-Rad).

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

9. Avvertenze e precauzioni



Leggere attentamente le seguenti istruzioni prima di avviare il protocollo.

- L'esperimento deve essere effettuato da personale competente, formato sulle tecniche e sulle idonee procedure di sicurezza.
- Accertarsi che gli strumenti siano stati installati, calibrati e mantenuti in base alle raccomandazioni del fabbricante.
- I campioni clinici devono essere considerati come materiale potenzialmente infettivo e devono essere preparati sotto una cappa a flusso laminare.
- L'utilizzo di apparecchiature diverse da quelle approvate è responsabilità dell'utente e, in questo caso, le performance non sono garantite.
- L'esperimento deve essere effettuato secondo le buone prassi di laboratorio.
- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Il kit viene spedito sotto ghiaccio secco e i componenti del kit devono arrivare congelati. Qualora uno o più componenti arrivassero scongelati, o qualora le provette siano state danneggiate durante il trasporto, contattare Eurobio Scientific.
- Evitare i cicli di congelamento/scongelamento dei reagenti; ciò può comportare una riduzione della sensibilità del test.
- Una volta scongelati i reagenti, centrifugare brevemente le provette prima del loro utilizzo.
- Si raccomanda di delimitare tre aree di lavoro distinte: 1) Isolamento del RNA, 2) Preparazione della miscela di reazione e 3) Amplificazione/rilevazione dei prodotti amplificati.
- Le sonde fluorescenti contenute nell'Oligomix sono fotosensibili. L'eventuale esposizione prolungata dell'Oligomix alla luce, deve limitarsi al tempo tecnico necessario alla preparazione della piastra PCR.
- Si raccomanda di aprire e maneggiare i controlli positivi separatamente dai campioni biologici da analizzare e dagli altri componenti del kit, onde evitare contaminazioni incrociate.
- Indossare camici e guanti (senza talco) diversi in ogni area di lavoro.
- Le pipette, i reagenti e altri materiali di lavoro non devono circolare in queste aree.
- Prestare particolare attenzione nel conservare la purezza dei reagenti e delle miscele di reazione.
- Il controllo interno endogeno rileva un target cellulare rilevabile in tutti i campioni di origine umana, ma non nel controllo negativo CN-H2O fornito nel kit. L'assenza di segnale a livello del controllo negativo consente di prevenire l'insorgenza di contaminazioni incrociate.
- Per la produzione di RNA di qualità e per l'applicazione della RT-PCR in tempo reale, è necessario impiegare opportune procedure di preparazione/estrazione del RNA, in particolare onde evitare qualsiasi rischio di contaminazione con gli RNase.
- Utilizzare dei puntali con filtro per micropipette, RNase-free e DNase-free.
- Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare in laboratorio.
- Evitare gli aerosol.
- Il kit non è monouso. Durante il riutilizzo del dispositivo, è necessario seguire le raccomandazioni relative ai cicli di congelamento/scongelamento autorizzati, nonché le necessarie cautele per prevenire la contaminazione dei reagenti.
- I componenti del kit non devono essere utilizzati separatamente (né con altri reagenti, né con reagenti di altri lotti).
- I reagenti devono essere scongelati con cura al fine di non compromettere le prestazioni del dispositivo (a +2°C/+8°C o a temperatura ambiente).
- Il dispositivo non è automatizzato. L'utilizzo di apparecchiature diverse da quelle approvate è responsabilità dell'utente e, in questo caso, le performance non sono garantite.

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

10. Protocollo

10.1 Raccolta dei campioni

- Raccogliere i campioni in provette sterili. **È vietato l'uso dell'eparina come anticoagulante.**
- È responsabilità dell'utente controllare le modalità di raccolta, trasporto, conservazione ed estrazione dei campioni affinché l'estrazione del RNA/DNA con sistemi adeguati produca RNA/DNA di qualità.
- Si raccomanda di estrarre immediatamente i campioni o di conservarli secondo le raccomandazioni di conservazione dei campioni prima dell'estrazione (Tabella 3).
- I riferimenti bibliografici nella sezione «14. Bibliografia» forniscono dati indicativi sulla stabilità dei campioni e degli RNA.



Tabella 3: Raccomandazioni per la conservazione prima dell'utilizzo

Raccomandazioni per la conservazione a temperatura ambiente prima della preparazione del plasma EDTA a partire dal sangue	
< 24 h	
Raccomandazioni per la conservazione a +4°C prima della preparazione del plasma EDTA a partire dal sangue	
< 72 h	
Raccomandazioni per la conservazione massima dei campioni di plasma prima dell'estrazione	
Temperatura ambiente	2 h
+2°C/+8°C	5 giorni
<-70°C (preferibile rispetto a -20°C)	Conservazione a lungo termine (> 5 giorni e massimo 2 mesi a -20°C)

Attenzione	
	- L'utente può fare riferimento alle raccomandazioni formulate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità o dalla Haute Autorité de Santé per la corretta conservazione dei campioni. - Gli RNA estratti devono essere conservati a <- 70°C al fine di garantirne la stabilità. Trascorso un anno dalla conservazione degli RNA a <- 70 °C, i Ct ottenuti possono aumentare. Si consiglia di estrarre nuovamente un campione biologico conservato da più di un anno. Si consiglia di limitare a 3 il numero di scongelamenti degli RNA. - Il trasporto dei campioni clinici è sottoposto alla normativa locale relativa al trasporto di agenti infettivi.

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

10.2 Estrazione del RNA/DNA

Spetta agli utenti garantire che il sistema di estrazione degli acidi nucleici utilizzato sia compatibile con la tecnologia della RT-PCR in tempo reale. Noi raccomandiamo di utilizzare dei metodi di estrazione di RNA/DNA adatti ai prelievi utilizzati, e di fare riferimento alle istruzioni del fornitore del kit di estrazione utilizzato.

Nel kit EBX-010, il controllo interno endogeno letto sul canale Cy5 è già presente nel campione clinico da estrarre. La sua rilevazione successiva all'amplificazione consente di verificare la qualità del prelievo e dell'estrazione.

Le prestazioni, così come descritte nel paragrafo 13 del presente documento, sono state ottenute mediante la tecnica di estrazione seguente: Maelstrom 9600 (TANBead) e il kit OptiPure Viral Auto Plate (rif: W665A46).

10.3 Esecuzione della RT- PCR in tempo reale

Raccomandazione generale :

- Gli standard HEV nonché il controllo positivo contengono un'elevata concentrazione di matrice. Le manipolazioni devono essere effettuate con cautela onde evitare contaminazioni.
- Al fine di verificare il corretto funzionamento della RT-PCR, è necessario testare un controllo positivo, CP, nonché un controllo negativo (acqua PCR fornita = CN-H₂O) (vedere II-3/6) del protocollo della RT-PCR in tempo reale).

RT-PCR qualitativa

Non viene eseguito alcun intervallo standard. Vengono testati solo il controllo positivo CP e il controllo negativo.

RT-PCR quantitativa

Oltre ai controlli negativo e positivo (CP), è necessario effettuare una curva standard avvalendosi di quattro provette standard HEV S-1 a S-4, pronte all'uso. Gli standard non sono da estrarre.

Al fine di poter correggere un'eventuale variazione legata all'esperimento, si raccomanda di testare gli standard HES in *triplicato*.

Per generare una curva standard su un sistema di PCR in tempo reale, le concentrazioni 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ copie/μL dovranno essere utilizzate e definite come standard, specificando il numero di copie/μL corrispondenti (tabella 4a).

Tabella 4a: Concentrazioni degli standard HEV

Standard	Concentrazione
S-1.	10 ⁶ copie/μL
S-2.	10 ⁵ copie/μL
S-3.	10 ⁴ copie/μL
S-4.	10 ³ copie/μL

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

Le concentrazioni in copie/ μ L possono essere convertite in UI (Unità Internazionali) dal momento che 2,25 copie/mL corrispondono a 1UI/mL, ossia **0,00225 copie/ μ L** che corrispondono a 1 UI/mL (tabella 4b).

Tabella 4b: Calcolo per la compilazione degli standard HEV

Valore standard HEV in cp/ μ L (tabella 4a)	÷	0,00225 (cp/ μ L)	=	Valore standard HEV in UI/mL
---	---	-----------------------	---	---

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

Schema della procedura:

1 - PREPARAZIONE DELLA MISCELA DI REAZIONE/MASTERMIX

Numero di reazioni	N+3
Enzimi	(N+3) x 15 µL
Oligomix	(N+3) x 5 µL
Volume totale Mastermix	(N+3) x 20 µL



2 - PREPARAZIONE DELLE REAZIONI

Campione

20 µL di Mastermix

+

5µL campione RNA

Controllo(i) positivo(i)

Qualitativo:

20 µL di Mastermix

+

5µL di CP

Quantitativo:

20 µL di Mastermix

+

5µL di S-1 a S-4

Controllo negativo

20 µL di Mastermix

+

5µL Acqua per biologia molecolare (CN-H2O)



3 - STRUMENTO PCR IN TEMPO REALE

Programma	Temperatura	Durata	Ciclo(i)	
Trascrittasi inversa	50 °C	10 min	1	-
Denaturazione	95 °C	3 min	1	-
Amplificazione	95 °C	10 sec	45	-
	60 °C	30 sec		Acquisizione della fluorescenza

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

10.4 Protocollo dettagliato

- 3) Verificare che i reagenti siano completamente scongelati. Omogeneizzare le provette degli enzimi e agitare con il Vortex per circa 15 secondi l'Oligomix e il CP, quindi centrifugare brevemente.
- 4) Preparare i Mastermix come segue, dove N è il numero di reazioni (inclusendo i controlli positivi e negativi). Prevedere la quantità di Mastermix per N+3 reazioni minimo.

Numero di reazioni	1	N+3
Enzimi	15 µL	(N+3) x 15 µL
Oligomix	5 µL	(N+3) x 5 µL
Volume totale Mastermix	20 µL	(N+3) x 20 µL

** Per le serie piccole (≤ 10): è sufficiente preparare per N+2.*

- 3) Omogeneizzare il Mastermix preparato in 2) e centrifugare brevemente.
- 10) Con l'aiuto di una micropipetta e di puntali con filtro, distribuire 20 µL di Mastermix in provette/pozzetti della piastra di microtitolazione indipendenti.
- 11) Aggiungere 5 µL di campione di RNA estratto.
- 12) Contemporaneamente, eseguire i seguenti controlli:
 - Controllo(i) positivo(i):
 - Test qualitativo:
 - 20 µL di Mastermix + 5 µL di controllo positivo CP
 - Test quantitativo:
 - 20 µL di Mastermix + 5 µL di S-1 a S-4 per l'intervallo standard HEV
 - Controllo negativo:
 - 20 µL di Mastermix + 5 µL di acqua fornita (CN-H2O)
- 13) Chiudere immediatamente le provette, o la piastra, con una pellicola adesiva onde evitare qualsiasi contaminazione.
- 14) Centrifugare brevemente per raccogliere la miscela di reazione dal fondo delle provette o dei pozzetti della piastra di microtitolazione.
- 15) Effettuare il seguente programma sullo strumento di PCR in tempo reale.

Programma	Temperatura	Durata	Ciclo(i)	
Trascrittasi inversa	50 °C	10 min	1	-
Denaturazione	95 °C	3 min	1	-
Amplificazione	95 °C	10 sec	45	-
	60 °C	30 sec		Acquisizione della fluorescenza

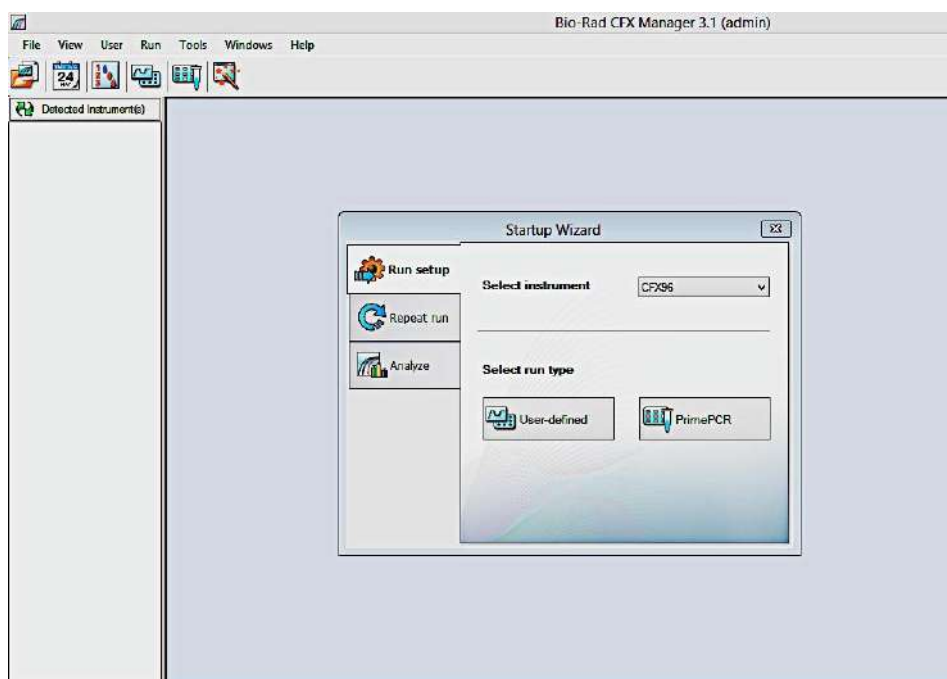
Nota 1: Su CFX96™ (Bio-Rad), avviare il Run a partire dalla versione 1.6 o successiva, quindi analizzare con la versione 3.1 (vedere § 11. Convalida dell'esperimento).

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

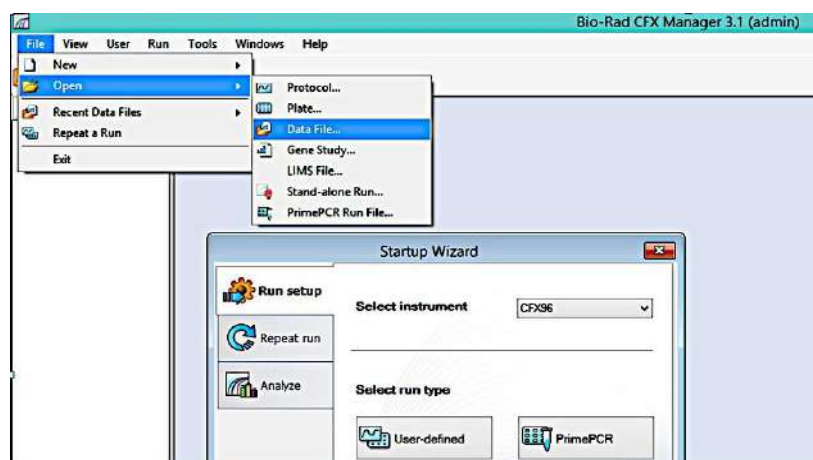
11. Convalida dell'esperimento.

L'analisi dei dati post-acquisizione su un apparecchio per PCR CFX96 (Bio-Rad) deve essere effettuata usando la versione 3.1 del software CFX Manager (Bio-Rad). Per passare a questa versione da un Run avviato su una versione precedente, attenersi alla procedura che segue: al termine del Run, il file di dati con suffisso .pcrd deve essere aperto ed elaborato con la versione 3.1 del CFX Manager (Bio-Rad).

Se il Run è stato avviato con il software CFX Manager v1.6 ad esempio, per aprire un file di dati con il software CFX Manager v3.1, fare clic sull'icona CFX Manager v3.1. Viene visualizzata la schermata iniziale.



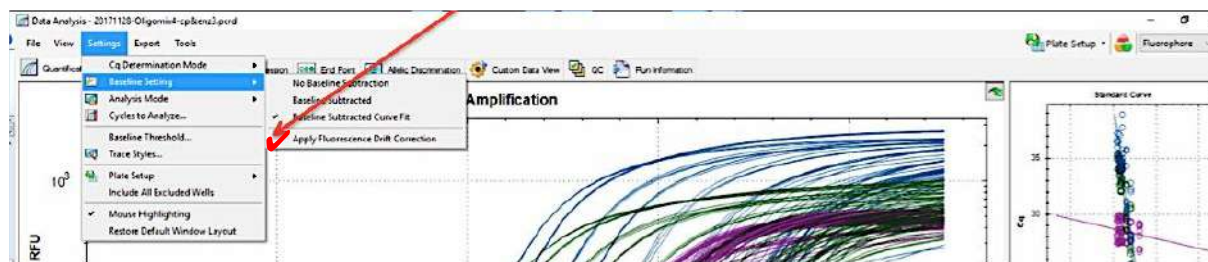
Fare clic su «File» e selezionare «Open», quindi «Data File».



Selezionare il file che si desidera analizzare e fare clic su «Open».

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

L'opzione «Drift correction» deve essere eseguita nella scheda «Settings» come nell'immagine che segue: fare clic sulla scheda «Settings», quindi su «Baseline Settings» e su «Apply Fluorescence Drift Correction».



Una volta effettuato questo passaggio, è possibile avviare l'analisi.

Affinché il dosaggio sia valido, i valori di Ct per i controlli devono essere i seguenti (Tabella 5); in caso contrario, l'esperimento non può essere convalidato.

Tabella 5

Controllo positivo	
HEX	Ct ≤ 30
CY5	Ct ≤ 30
Controllo negativo	
HEX	Ct non determinato
CY5	Ct non determinato

12. Analisi dei dati e interpretazione

A) Analisi qualitativa

Per i campioni clinici, i risultati che seguono sono plausibili :

Soglia Ct per positività del campione (canale HEX): + Positivo => Ct < 45

Segnale PCR		Presenza di HEV	Validità del test/commento
HEX	CY5		
-	+	No	VALIDO
+	+	Sì	VALIDO
+	-	Sì	VALIDO Problema di estrazione o di inibizione della RT-PCR o forte competizione che non impedisce la rilevazione del virus
-	-	Non interpretabile	Possibile inibizione della RT-PCR o problema di estrazione o forte competizione → diluire 5 x il campione; se stesso risultato, estrarre nuovamente il campione

B) Analisi quantitativa

Per tracciare la curva di taratura, inserire le concentrazioni in coppie/μL dell'intervallo di linearità di quantificazione degli standard HEV (canale HEX) (rispettivamente 10⁶ - 10⁵ - 10⁴ - 10³

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

copie/μL per S-1, S-2, S-3 e S-4). Il software visualizzerà una curva standard e calcolerà per i campioni il numero di copie/μL corrispondenti.

In base al volume di liquido corporeo introdotto al momento dell'estrazione, nonché del volume di eluizione, la concentrazione di RNA-HEV nell'eluato potrà essere ricondotta alla concentrazione/mL di prelievo. Per determinare la carica virale per mL di campione originale, è necessario applicare la seguente formula:

$$\text{Carica virale per microlitro di eluato} \times \text{Volume eluato (microlitri)}$$

$$\text{Volume del campione estratto (millilitri)}$$
$$=$$
$$\text{Carica virale per millilitri di campione}$$

Può essere convertito in UI (Unità Internazionali) dal momento che 2,25 copie/mL corrispondono a 1 UI/mL. I risultati dei campioni al di sotto della soglia di quantificazione non possono essere convalidati dal punto di vista quantitativo, ma conservano la loro qualità di rilevabilità (positività convalidata sul canale HEX).

Nella PCR quantitativa, oltre ai controlli validi della Tabella 5, l'efficacia della PCR in tempo reale sul canale HEX dev'essere compresa tra 90 e 110%, con un coefficiente di correlazione di > 0,98.

Limite di utilizzo e di interpretazione:

- ❖ Il kit EurobioPlex HEV viene utilizzato per scopi diagnostici di prima linea.
- ❖ Tutti i campioni devono essere trattati come potenzialmente infettati dai batteri di interesse; pertanto, è necessario attenersi scrupolosamente alla normativa locale sulla sicurezza biologica.
- ❖ L'interpretazione dei risultati deve tenere in considerazione la possibilità di falsi negativi e di falsi positivi.

I falsi negativi possono essere dovuti a:

- Un'errata raccolta dei campioni o una scorretta conservazione,
- Condizioni di estrazione non idonee o utilizzo di strumenti di PCR non convalidati,
- Un esperimento non conforme a tutti gli elementi delle presenti condizioni d'uso,

I falsi positivi possono essere dovuti a:

- Una contaminazione correlata ad un'errata manipolazione di campioni ad alta positività, al controllo positivo, o a prodotti provenienti dall'amplificazione della PCR.
- Il mancato rispetto della procedura descritta nelle presenti istruzioni d'uso, in particolare per evitare qualsiasi fonte di contaminazione.
- ❖ Qualsiasi risultato deve essere interpretato da personale medico nel contesto clinico, dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
- ❖ Il test non esclude la presenza di altri patogeni, oltre a quelli individuati da questo kit.
- ❖ Un risultato negativo di questo test non esclude in maniera assoluta una possibile infezione da virus dell'epatite E.

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

13. Analisi delle prestazioni

Sensibilità analitica

Il 100% di sensibilità analitica del kit EurobioPlex EBX-010 HEV è stata determinata sul controllo positivo del kit. È stato eseguito un intervallo di diluizione partendo da una miscela plasmidica compresa tra 10^5 a 1 copia/ μ L.

È stato eseguito un intervallo di diluizione partendo da un eluato del campione Internazionale WHO HEV (Paul Ehrlich Institute, PEI code: 6329/10) compreso tra 2083 UI/mL a 16,2 UI/mL. Questo intervallo di diluizione è stato utilizzato per determinare il limite di rilevazione del kit EBX-010. È stata effettuata un'analisi probit allo scopo di poter determinare il tasso di positività al 95%.

Limite di rilevazione/sensibilità analitica su CP: 5 copie/ μ L

Limite di rilevazione su campione Internazionale WHO IS (first world health organization international standard for Hepatitis E RNA Nucleic acid amplification (NAT) assay, Paul Ehrlich Institute PEI code: 6329/10) a 95% (probit):

HEV: 63,9 UI/mL

Limite di quantificazione

È stato eseguito un intervallo di diluizione partendo da un eluato del campione Internazionale WHO HEV (Paul Ehrlich Institute, PEI code: 6329/10) compreso tra 2083 UI/mL a 16,2 UI/mL, che è stato utilizzato per determinare il limite di quantificazione del kit EBX-010.

Limite di quantificazione su campione Internazionale WHO IS (first world health organization international standard for Hepatitis E RNA Nucleic acid amplification (NAT) assay, Paul Ehrlich Institute PEI code: 6329/10):

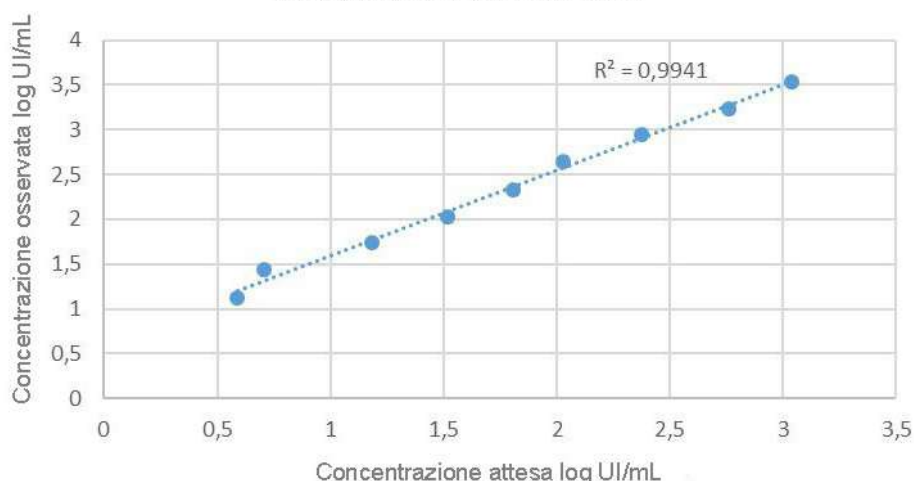
HEV: 260 UI/mL

Intervallo di linearità

Il campo di misura lineare del kit EurobioPlex HEV è stato determinato mediante l'analisi di diluizioni in serie di un campione titolato a 3,54 log UI/mL. Ogni diluizione è stata testata in duplicato da 1,13 a 3,54 log UI/mL.

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

Linearità del kit EBX-010



Accuratezza

L'accuratezza del kit è stata stabilita confrontando la media dei valori misurati del campione Internazionale WHO HEV (Paul Ehrlich Institute PEI code: 6329/10) rispetto al suo valore vero noto. Tale metodo è stato inoltre impiegato su un campione clinico la cui carica virale era nota.

Valore vero dello standard HEV = 3,02 log UI/mL

Distorsione (%) = $((3,00 - 3,02) / 3,02) * 100 = 0,62\%$

Valore vero del campione titolato = 4,92 log UI/mL

Distorsione (%) = $((4,92 - 4,78) / 4,92) * 100 = 2,74\%$

Precisione

- Variabilità intra-esperimento:

	EBX-010	
	CY 5	HEX
Media CV intra-lotto CP	0,77	0,70

CV: coefficiente di variazione

- Variabilità inter-lotti:

	EBX-010	
	CY 5	HEX
Media CV inter-lotti CP in %	3,27	2,76

CV: coefficiente di variazione

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

Specificità analitica

Questa convalida ha riguardato 10 campioni negativi per HEV ma positivi per altri virus epatici, allo scopo di testare le reazioni incrociate.

Numero di campioni	Campioni positivi per	Epatite E	Stato HEV su EBX-010
3	Epatite C	Negativo	Negativo
3	Epatite B	Negativo	Negativo
2	Epatite D	Negativo	Negativo
2	Epatite A	Negativo	Negativo

Al fine di avvalorare questo studio, è stata utilizzata un'analisi in silico che dimostra la specificità dei primer e delle sonde per HEV nel kit EBX-010.

Non è stata rilevata alcuna aspecificità o reazione incrociata.

Il kit è specifico al 100%.

Sensibilità e specificità diagnostica

La convalida delle prestazioni ha riguardato 66 campioni HEV positivi e 51 campioni HEV negativi.

Ai fini di questo studio, l'estrazione dei campioni è stata effettuata su Maelstrom 9600 (TANBead) mediante il kit OptiPure Viral Auto Plate (rif.: W665A46), e la RT-PCR su CFX96 (Bio-Rad).

Le prestazioni complessive sono le seguenti:

		EBX-010	
		Positivi HEV	Negativi HEV
Pre-testati con il kit Altona	Positivi HEV	66	0
	Negativi HEV	0	51

Sensibilità complessiva: > 99% (66/66)

Specificità complessiva: > 99% (51/51)

Corrispondenza complessiva: > 99% (117/117)

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

Sostanze interferenti

Sono state testate alcune sostanze interferenti (inclusi diversi inibitori della PCR) affinché non falsino il risultato diagnostico ottenuto con il kit. È stato testato un panel di AccroMetrix™ Inhibition Panel REF 956400 contenente 7 sostanze a concentrazioni note per essere le più elevate possibili.

Tutti i campioni, a ogni concentrazione, sono risultati HEV positivi, in HEX, in presenza di tali sostanze interferenti. Pertanto, queste sostanze non hanno nessun impatto sul kit EBX-010.

Contaminazioni incrociate

Lo studio relativo alle contaminazioni incrociate su 28 CP e 28 NTC ha rivelato una sensibilità, una specificità e una corrispondenza complessiva > 99%, con coefficienti di variazione intra e interpiastre < al 5% su CP, per tutti i target.

14. Bibliografia

Meng X-J., Purcell R. H., Halbur P. G., Lehman J. R., Webb D. M., Tsareva T. T., Haynes J. S., Thacker B. J., and Emerson S. U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 9860-9865

Wang Y., Zhang H., Ling R., LI H., and Harrison T. J. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *Journal of General Virology* 2000; 81: 1675-1666

Drobeniuc J., Favorov M. O., Shapiro C. N., Bell B. P., Mast E. E., Dadu A., Culver D., Iarovoi P., Robertson B H and Margolis H S. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *The Journal of Infectious Diseases* 2001; 184: 1594-1597

Meng X-J., Wiseman B., Elvinger F., Guenette D. K. Toth T. E., Engle R. E., Emerson S. U., and Purcell R. H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *Journal of clinical microbiology* 2002; 40 (1): 117-122

Orru G, Masia G, Orru L, Piras V, Coppola R C. Detection and quantitation of hepatitis E virus in human faeces by real-time quantitative PCR. *Journal of Virological Methods* 2004; 118: 77-82

Olsen B., Axelsson-Olsson D., Thelin A. and Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis* 2006; 38 (1): 55-58

Bouwknegt M., Engel B., Herremans M. M. P. T., Widdowson M. A., Worm H. C., Koopmans M. P. G., Frankena K., De Roda Husman A. M., De Jong M. C. M., and van der Poel W. H. M. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol Infect* 2008; 136: 567-576

Kuniholm M. H., Purcell R. H., McQuillan G. M., Engle R. E., Wasley A., and Nelson K. E. Epidemiology of hepatitis E virus in the United States: Results from the third National Health and nutrition examination survey, 1988-1994 *Ht Journal of Infectious Diseases* 2009; 200: 48-56

Ward P, Poitras E, Leblanc D, Letellier A, Brassard J, Plante D, Houde A. Comparative analysis of different Taqman real-time RT-PCR assays for detection of swine Hepatitis E virus and integration of Feline calicivirus as internal control. *Journal of Applied Microbiology* 2009; 106: 1360-1369

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

Zhang W, Yang S, Ren L, Shen Q, Cui I, Fan K, Huang F, Kang Y, Shan T, Wei J, Xiu H, Lou Y, Liu J, Yang Z, Zhu J, Hua X. Hepatitis E virus infection in Central China reveals no evidence of cross-species transmission between human and swine in this area. PLoS one 2009 ,4(12) eb156: 1-8

Meng X. J. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. Vet Microbiol 2010; 140 (3-4): 256-265

Legrand-Abravanel F., Kamar N., Sandres-Saune K., Garrouste C., Dubois M., Mansuy J-M., Muscari F., Sallusto F., Rostaing L., and Izopet J. Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. The Journal of Infectious Diseases 2010; 202 (6): 835-844

Purcell R. H. and Emerson S. U. Hidden danger: The raw facts about hepatitis E virus. The Journal of Infectious Diseases 2010; 202 (6): 819-821

Baylis S A, Hanschmann K-M, Blümel J, and Micha Nübling C et al. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate Laboratory performance. J. Clin. Microbiol. 2011, 49(4): 1234-1239

Hakze-van der Honing R. W., van Coillie E., Antonis A. F. G., van der Poel W. H.M. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. PLoS One 2011; 6 (8): e22673

Mansuy J-M., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Sauné K., Miédouge M., Ellis V., Rech H., Destruel F., Kamar N., Dalton H. R. and Izopet J. Hepatitis E virus antibodies Emerging Infectious Diseases 2011; 17 (12): 2309-2312

Faber M. S., Wenzel J. J., Jilg W., Thamm M., Höhle M., and Stark K. Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. Emerging Infectious Diseases 2012; 18 (10): 1654-1657

Ruggeri F. M., Di Bartolo I., Ponterio E., Angeloni G., Trevisani M., Ostanello F. Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. New Microbiol 2013; 36 (4): 331-344

Smith D B, Purdy M A, Simmonds P. Genetic variability and the classification of Hepatitis E Virus. J Virol. 2013, 87(8): 4161-4169

Dalton H.R. Hepatitis E: The 'new kid on the block' or an old friend? Transfus Med Hemother. 2014, 41: 6-9

Smith D B, Simmonds P, Jameel S, Emerson S U, Harisson T J, Meng X-J, Okamoto H, Van der Poel W H M and Purdy M A. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae Journal of General Virology 2014, 95: 2223-2232

Izopet J, Labrique A B, Basnyat B, Dalton H R, Kmush B, Heaney C D et al; Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas; Nepal, Bangladesh and southwest France. J. Clin. Virology. 2015, 70: 39-42

Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin, Recommandations de bonnes pratiques, www.has-santé.fr

15. Controllo qualità

In conformità con il sistema di gestione della qualità di Eurobio, certificato ISO EN 13485, ogni lotto di EurobioPlex HEV viene testato secondo specifiche predefinite allo scopo di garantire una qualità costante dei prodotti.

Istruzioni per l'uso di EurobioPlex HEV

16. Smaltimento dei rifiuti

Smaltire tutti i rifiuti in conformità alla normativa relativa ai Rifiuti sanitari.

17. Incident reporting

Qualsiasi evento grave verificatosi con il reagente deve essere notificato a Eurobio Scientific e all'autorità competente dello Stato membro presso il quale l'utente e/o il paziente risiede.

18. Assistenza tecnica

Per ottenere assistenza relativa ai nostri prodotti, contattare la nostra assistenza tecnica.

È possibile contattare il servizio clienti di Eurobio Scientific via e-mail all'indirizzo adv@eurobio-scientific.com o telefonicamente al numero +33 (0)1.69.79.64.80.



7 avenue de Scandinavie
ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis
FRANCE

Description of changes:

Version	Description
8.02	Change of the address according to the K-bis update
8.03	Correction of the enzyme volume, table 10.4 of the IFU in CZ and EN.