



# НАБІР ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В

## HBV DNA Quantification Kit

Кат. №: **LUA-PCR.HBV.32**  
Кількість тестів: **32**

Дата останнього перегляду інструкції: **01-2022**  
Версія: **3**

### **ЗМІСТ**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 ВСТУП</b> .....   | <b>2</b>  |
| 1.1 Призначення використання .....                                 | 2         |
| 1.2 Інформація про збудника .....                                  | 2         |
| 1.3 Технічна допомога.....   | 2         |
| 1.4 Символи та скорочення .....                                    | 2         |
| <b>2 ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ</b> .....                                      | <b>3</b>  |
| <b>3 ОПИС І ПРИНЦИП ТЕСТУ</b> .....                                | <b>3</b>  |
| 3.1 Принцип аналізу TaqMan® .....                                  | 3         |
| 3.2 Пояснення кількісного тесту ДНК HBV .....                      | 3         |
| 3.3 Обмеження.....   | 4         |
| <b>4 ОЦІНКА ПРОДУКТИВНОСТІ</b> .....                               | <b>4</b>  |
| 4.1 Аналітична чутливість.....                                     | 4         |
| 4.2 Лінійний діапазон.....   | 5         |
| 4.3 Специфічність .....  | 5         |
| 4.3.1 Виявлення генотипу та кількісна оцінка.....                  | 5         |
| 4.3.2 Аналітична специфічність .....                               | 6         |
| 4.3.3 Діагностична специфічність.....                              | 6         |
| 4.4 Точність .....   | 7         |
| 4.5 Надійність.....  | 8         |
| 4.6 Діагностична оцінка .....                                      | 9         |
| <b>5 КОМПОНЕНТИ НАБОРУ, ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ</b> .....       | <b>10</b> |
| <b>6 НЕОБХІДНЕ ЛАБОРАТОРНЕ ОБЛАДНАННЯ ТА ДОДАТКИ</b> .....         | <b>11</b> |
| <b>7 ПРОЦЕДУРА</b> .....   | <b>11</b> |
| 7.1 Збір та обробка клінічних зразків.....                         | 11        |
| 7.2 Очищення ДНК HBV із клінічних зразків.....                     | 11        |
| 7.3 Внутрішній контроль .....                                      | 12        |
| 7.4 Загальна процедура кількісного аналізу.....                    | 12        |
| <b>8 ПРОТОКОЛ</b> .....  | <b>12</b> |
| 8.1 Підготовка внутрішнього контролю .....                         | 12        |
| 8.2 Застосування розчиненого ІС для ручного очищення .....         | 12        |
| 8.3 Застосування розчиненого ІС для автоматизованого очищення..... | 12        |
| 8.4 Приготування 25x суміші реагентів.....                         | 12        |
| 8.5 Приготування 1x Майстер-Мікс.....                              | 12        |
| 8.6 Підготовка кількісних стандартів.....                          | 13        |
| 8.7 Приготування реакційного набору.....                           | 13        |
| <b>9 АНАЛІЗ ДАНИХ</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>10 УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ</b> .....                             | <b>16</b> |

## 1 ВСТУП

### 1.1 Призначення використання

Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В призначений для кількісного визначення ДНК Вірусу гепатиту В (HBV) за допомогою ПЛР у реальному часі у зразках ЕДТА- або цитратної плазми та сироватки людини. Для очищення зразків підтверджено використання ручного методу (з Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA), а також автоматизованого методу (з Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX). Для ампліфікації та виявлення підтверджено використання Набору для кількісного визначення ДНК Вірусу гепатиту В (HBV) в поєднанні з такими пристроями ПЛР у реальному часі: qTOWER 2 & 3; CFX96; LightCycler® 480; 7500 Fast i Rotor-Gene® 3000/6000/Q, RealLine Cyler 48/96 i QuantStudio 5 Real-Time-PCR System. Аналіз призначений для клінічного ведення пацієнтів з Гепатитом В у поєднанні з клінічною картиною та іншими лабораторними маркерами інфекції HBV.

Цей тест призначений для оцінки вірусної відповіді на противірусну терапію, що вимірюється за змінами рівнів ДНК HBV у плазмі та сироватці. Крім того, під час противірусної терапії можна оцінити ймовірність стійкої вірусної відповіді.

**Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В не призначений для використання в якості скринінгового тесту для виявлення ДНК HBV в крові або продуктах крові або як діагностичний тест для підтвердження наявності інфекції HBV.**

### 1.2 Інформація про збудника

Вірус гепатиту В людини (HBV), який був відкритий Блумбергом у 1965 році, є ДНК-вірусом з невеликою оболонкою з геномом приблизно 3200 нуклеотидів, що викликає гострий і хронічний гепатит. Незважаючи на запровадження вакцини проти HBV у 1981 році, інфекція HBV все ще є серйозним тягарем для здоров'я у всьому світі. Багато досліджень виділяють хронічну інфекцію HBV як основний фактор ризику розвитку гепатоцелюлярної карциноми. Передача HBV відбувається вертикально і горизонтально через обмін рідиними організму. Рівень хронічності становить близько 5% у дорослих, але досягає 90% у інфекцій, набутих новонародженими. Через відсутність коректурної активності вірусної полімерази генетична мінливість HBV висока. На даний момент 9 генотипів HBV, А-І, філогенетично класифіковані на основі міжгрупової дивергенції у  $\geq 8\%$  всього геному, з можливим 10-м генотипом J, який на даний момент був виявлений лише в одного пацієнта. Генотипи А-Д, F, H і I далі диференціюються на кілька підгенотипів з різноманітною послідовністю щонайменше 4%. Генотипи HBV та певні підгенотипи демонструють чітке географічне переважання та відрізняються за клінічними проявами інфекції та відповіддю на противірусну терапію.



#### ЗВЕРНІТЬСЯ ДО ІНСТРУКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯ

Перед використанням необхідно уважно ознайомитися з цим вкладишем в упаковці. Наведені інструкції необхідно відповідним чином виконувати. Достовірність результатів не може бути гарантована, якщо є будь-які відхилення від вказівок у цій інструкції.

### 1.3 Технічна допомога

Якщо у вас виникли запитання або проблеми щодо будь-яких аспектів Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В, будь ласка, не соромтеся звертатися до нашої служби технічної підтримки, яка складається з експертів з багаторічним досвідом у сфері молекулярної діагностики. Для технічної допомоги зв'яжіться з нами на сайті виробника, як зазначено на обкладинці IFU.

### 1.4 Символи та скорочення

Для зручності довідки та орієнтації IFU використовує наступні попереджувальні та інформаційні символи, а також показану методологію:

| Символ | Інформація  |
|--------|---|
|        | <b>КАТ. №</b><br>Каталоговий номер  |
|        | <b>Вміст</b><br>Містить достатню кількість реагентів для <N> тестів   |
|        | <b>Умови зберігання</b>   |
|        | <b>Зверніться до інструкції з використання</b><br>Цієї інформації необхідно дотримуватися, щоб уникнути неправильного використання набору та компонентів набору.                            |
|        | <b>Використати до</b>   |
|        | <b>Номер лоту</b><br>Номер лоту набору чи компоненту  |
|        | <b>Символ IVD</b><br>Цей набір є медичним приладом для діагностики <i>in vitro</i>  |
|        | Виробник  |
|        | <b>Примітка/Увага</b><br>Дотримуйтесь зазначених таким чином приміток, щоб забезпечити правильну роботу пристрою та уникнути помилок при експлуатації для отримання правильних результатів. |

У IFU використовуються наступні аббревіатури:

|             |   |
|-------------|---|
| <b>Ct</b>   | Порогове значення циклу                       |
| <b>CV</b>   | Коефіцієнт варіації                           |
| <b>dNTP</b> | 2'-дезоксинуклеотид 5'-трифосфат              |
| <b>HBV</b>  | Вірус гепатиту В                              |
| <b>IC</b>   | Внутрішній контроль                           |
| <b>IFU</b>  | Інструкція з використання                     |
| <b>IU</b>   | Міжнародні одиниці                            |
| <b>NA</b>   | Нуклеїнова кислота                            |
| <b>NTC</b>  | Нешаблонний контроль                          |
| <b>PEI</b>  | Інститут Пауля-Ерліха, Ланген, Німеччина      |
| <b>WHO</b>  | Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) |

## 2 ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>ПРИМІТКА</b> | Уважно прочитайте цей розділ спочатку, щоб гарантувати свою безпеку та безперебійну роботу.<br>Дотримуйтесь усіх інструкцій з безпеки, пояснених у IFU, а також усіх повідомлень та інформації, які відображаються. |
|-----------------|---|

Зразки плазми та сироватки людини слід розглядати як потенційно інфекційні. Тому завжди носіть лабораторний халат і рукавички.

Завжди використовуйте чисте обладнання без нуклеаз.

Налаштування підготовки шаблону, збірка ПЛР-реагентів, ампліфікація та детекція повинні виконуватися в різних приміщеннях.

Будь ласка, будьте обережні під час піпетування матеріалу зразка, щоб уникнути перенесення забруднень.

Викидайте відходи зразків і аналізів відповідно до ваших внутрішніх правил безпеки.

Будь ласка, проводьте регулярне технічне обслуговування вашого обладнання, щоб переконатися, що необхідні температури, швидкість центрифугування та інтенсивність змішування (об/хв) (rpm) підтримуються належним чином.

|              |  |
|--------------|--|
| <b>УВАГА</b> | Не їжте і не пийте компоненти набору!<br>З набором повинен працювати тільки навчений персонал у лабораторних умовах! |
|--------------|--|

## 3 ОПИС І ПРИНЦИП ТЕСТУ

### 3.1 Принцип аналізу TaqMan®

TaqMan® ПЛР у реальному часі - це високочутливий аналіз, який поєднує ампліфікацію з онлайн-виявленням нуклеїнової кислоти, що представляє інтерес (мішень, шаблон), на основі флуоресценції. Аналіз заснований на традиційному наборі цільових і специфічних для внутрішнього контролю праймерів у поєднанні з флуоресцентно-міченими олігонуклеотидними пробами, додатково до бажаних цільових послідовностей. У присутності мішеней проби гібридизуються зі своїми додатковими до мішеней послідовностями. Taq ДНК полімераза з ферменту ПЛР у реальному часі має екзонуклеазну активність 5' → 3', яка гідролізує проби і витісняє флуоресцентний барвник із гасника. Ця подія призводить до збільшення сигналу флуоресценції, що є прямо пропорційним цільовій ампліфікації під час кожного циклу ПЛР.

### 3.2 Пояснення кількісного тесту ДНК HBV

Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В - це тест ампліфікації для кількісного визначення ДНК HBV у зразках плазми та сироватки людини. Аналіз здатний виявити всі 9 відомих генотипів HBV, A-I, шляхом застосування праймерів і проб, специфічних для S-гена вірусного геному. Кількісне визначення зразка виконується паралельним посиленням включеного стандарту кількісної оцінки.

Синтетичний внутрішній контроль включено для контролю всієї процедури від вилучення NA до ПЛР у реальному часі. Таким чином, ризик хибнонегативних результатів різко знижується, що призводить до підвищення діагностичної коректності. Ампліфікацію ДНК HBV у зразках і стандартах, а також IC вимірюють незалежно на різних довжинах хвилі завдяки пробам, міченим різними барвниками флуоресцентного репортера. Виявлення ДНК HBV проводиться на каналі FAM. Для моніторингу Внутрішнього Контролю набір надає два варіанти залежно від налаштування пристрою ПЛР у реальному часі та дозволяє виявляти на каналі Yakima Yellow/IC/JOE або Cy5.

Підготовку зразка вручну слід проводити за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA. Екстракція NA має виконуватися строго відповідно до інструкцій виробника з використанням «Протоколу 2: Виділення вірусної РНК/ДНК із 400 мкл (µl) сироватки/плазми за допомогою Спайк-Пробірки (Spiking Tube) IC».

Автоматизовану підготовку зразків слід проводити за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX у поєднанні з приладом автоматичного піпетування «CyBio Felix Basic Unit with Enclosure» разом із додатковим модулем для екстракції «CyBio Felix Extraction Set».

### 3.3 Обмеження

Цей тест затверджений для використання як з ЕДТА- чи цитратною плазмою так і з сироваткою людини. Гепаринізовану плазму слід виключити з аналізу (див. розділ «Надійність тесту»). Дуже високі концентрації ліпідів можуть гальмувати результати кількісного визначення. Якщо використовуються інші типи зразків, ніж рекомендовані, можуть бути отримані неправильні результати. Продукт повинен використовуватися тільки персоналом, який спеціально проінструктований та навчений процедурам діагностики *in vitro*. Для отримання оптимальних результатів ПЛР необхідне суворе дотримання IFU. Цей набір можна використовувати лише зі згаданими пристроями ПЛР у реальному часі та рекомендованими витратними матеріалами для ПЛР. Не використовуйте компоненти з простроченим терміном придатності та не змішуйте їх з компонентами з різних партій.

## 4 ОЦІНКА ПРОДУКТИВНОСТІ

Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В був валідований відповідно до загальних технічних специфікацій (CTS) для медичних пристроїв для діагностики *in vitro* (2002/364/EC).

Валідація Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В була виконана за допомогою двох процедур очищення, ручного очищення за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA та автоматичного очищення за допомогою Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX. Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В досягає порівнянних результатів з обома процедурами очищення, як показано в Аналітичній чутливості.

### 4.1 Аналітична чутливість

Аналітичну чутливість Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В визначали шляхом аналізу серії розведень Референсного матеріалу PEI ДНК HBV (№ 3620/05, генотип D). Аналітичну чутливість для використаних пристроїв qPCR було визначено, як узагальнено нижче в Таблиці 1a для ручного очищення нуклеїнової кислоти і Таблиці 1b для автоматичної екстракції.

Таблиця 1a: Визначені специфічні для пристрою межі виявлення та довірчі інтервали за допомогою ручного очищення нуклеїнової кислоти

| Пристрій qPCR                     | Межа виявлення (LOD) МО/мл (IU/ml) | 95 % Довірчий інтервал МО/мл (IU/ml) |      |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------|
| qTOWER <sup>3</sup> (qT)          | 10.0                               | 6.9                                  | 13.1 |
| CFX96 (CFX)                       | 10.4                               | 8.4                                  | 12.4 |
| LightCycler <sup>®</sup> 480 (LC) | 8.0                                | 6.4                                  | 9.6  |
| 7500 Fast (FS)                    | 7.3                                | 5.8                                  | 8.7  |
| Rotor-Gene <sup>®</sup> 3000 (RG) | 10.4                               | 8.4                                  | 12.4 |

Таблиця 1b: Визначені специфічні для пристрою межі виявлення та довірчі інтервали за допомогою автоматичного очищення нуклеїнової кислоти

| Пристрій qPCR                     | Межа виявлення (LOD) МО/мл (IU/ml) | 95 % Довірчий інтервал МО/мл (IU/ml) |      |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------|
| qTOWER <sup>3</sup> (qT)          | 6.1                                | 4.9                                  | 7.2  |
| CFX96 (CFX)                       | 6.8                                | 5.6                                  | 8.0  |
| LightCycler <sup>®</sup> 480 (LC) | 6.7                                | 5.7                                  | 7.8  |
| 7500 Fast (FS)                    | 8.3                                | 7.2                                  | 9.3  |
| Rotor-Gene <sup>®</sup> 3000 (RG) | 6.6                                | 5.4                                  | 7.9  |
| RealLine Cyler 48                 | 16.3                               | 11.8                                 | 20.8 |
| RealLine Cyler 96                 | 11.4                               | 9.3                                  | 13.5 |
| QuantStudio 5                     | 14.3                               | 12.0                                 | 16.6 |

Межу виявлення розраховували за допомогою аналізу PROBIT щонайменше 24-х повторень кожного розведення референсного матеріалу на кожному пристрої qPCR з достовірністю 95 % (див. Рисунок 1).

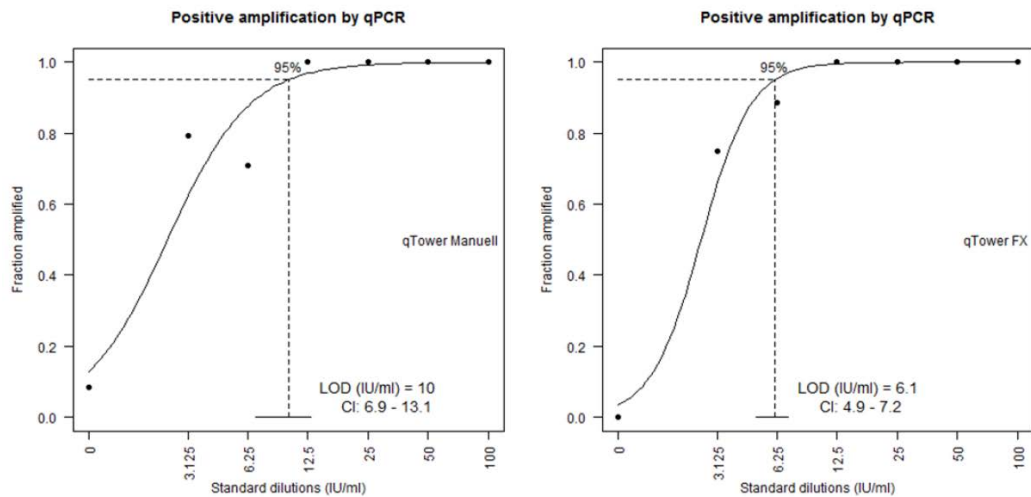


Рисунок 1: Аналіз PROBIT для визначення специфічних меж виявлення ПЛР-пристрою (LOD) з достовірністю 95 %, показаний для середнього значення для всіх приладу qTOWER<sup>3</sup> для ручного (ліворуч) та автоматизованого (FX) очищення (праворуч)

Окремі значення нижче межі виявлення можуть бути правдоподібними, але з більшою ймовірністю помилки. Щоб зменшити ймовірність цієї помилки, рекомендується 3 повторення таких зразків.

#### 4.2 Лінійний діапазон

Лінійний діапазон для кількісного визначення ДНК HBV був визначений шляхом аналізу серії розведень синтетичної ДНК HBV у діапазоні від  $2.5 \times 10^9$  до 8 МО/мл (IU/ml) та матеріалу нативного зразка від  $1 \times 10^8$  до 10 МО/мл (IU/ml). Очищення нуклеїнової кислоти вручну проводили для кожного рівня концентрації в трьох примірниках, і всі елюати кількісно визначали з  $n=1$  за допомогою пристроїв ПЛР у реальному часі CFX96, qTOWER<sup>3</sup>, LightCycler<sup>®</sup> 480, 7500 Fast і Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000. Аналіз проводили згідно з рекомендацією CLSI EP06-A [4].

Було показано, що Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В є лінійним протягом кроків  $8 \log_{10}$  у діапазоні концентрацій ДНК HBV від 9 МО/мл (IU/ml) до  $2.5 \times 10^9$  МО/мл (IU/ml). Нижня межа кількісного визначення, специфічна для аналізу (LLOQ), еквівалентна загальному LOD.

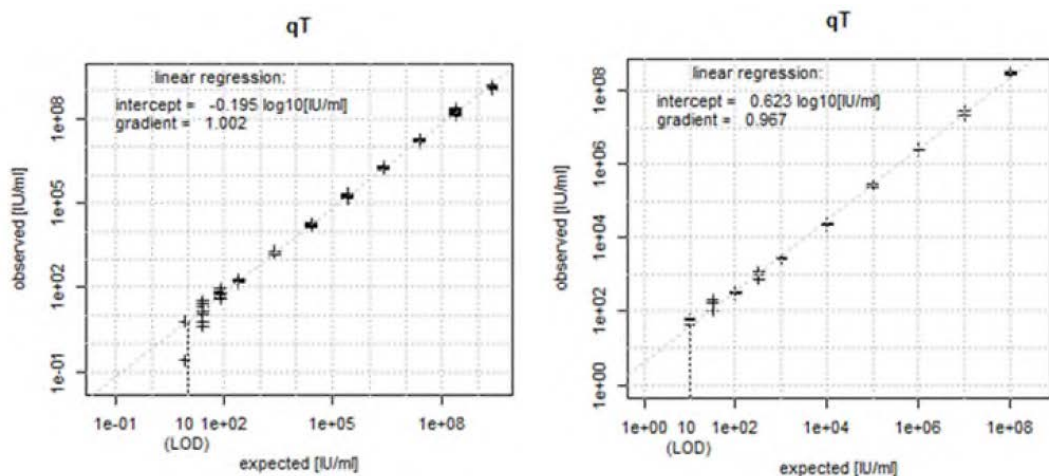


Рисунок 2: Лінійний діапазон кількісної оцінки Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В, на прикладі показано для пристрою qTOWER. Дані були отримані з використанням серії розведень  $8\text{-log}_{10}$  (8 МО/мл (IU/ml) -  $2.5 \times 10^9$  МО/мл (IU/ml)) синтетичної ДНК HBV (ліворуч) та серії розведень  $7\text{-log}_{10}$  (10 МО/мл (IU/ml) -  $1 \times 10^8$  МО/мл (IU/ml)) високого титру HBV зразка пацієнта (праворуч). Аналіз був лінійним протягом  $8 \log_{10}$  кроків, перевірених із специфічною для аналізу нижньою межею кількісної оцінки (LLOQ), еквівалентною загальному LOD

#### 4.3 Специфічність

##### 4.3.1 Виявлення генотипу та кількісна оцінка

Специфічність Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В для визначення та кількісної оцінки відомих генотипів/підтипів HBV була перевірена з використанням 1-ї Міжнародної референсної групи ВООЗ для генотипів вірусу Гепатиту В для аналізів PEI на основі методів ампліфікації нуклеїнових кислот, код 5086/08 (Версія 2, 28 Листопада 2011 року). Панель генотипів включає 15 зразків найбільш поширених генотипів HBV (A-G).

Були підготовлені серії напівлогарифмічних розведень для всіх зразків і екстрагована ДНК за допомогою ручного методу екстракції Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA з використанням початкового об'єму зразка 400 мкл ( $\mu$ l).

Результати кількісної оцінки Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В були в межах  $\pm 0.6 \log_{10}$  інтервалу прийнятності точності в порівнянні з результатами кількісної оцінки, отриманими в дослідженні ВООЗ.

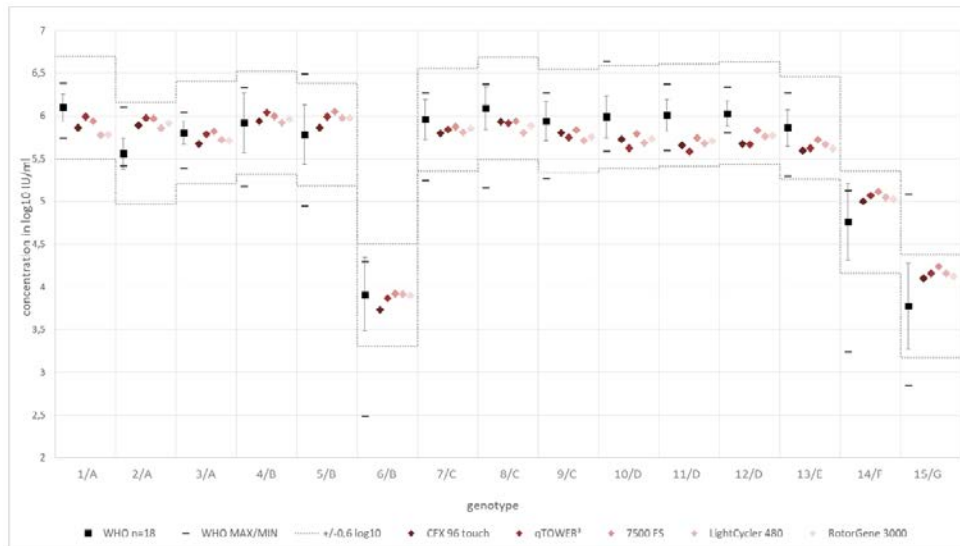


Рисунок 3: Порівняння результатів кількісної оцінки дослідження ВООЗ (середнє значення  $n = 18$  учасників, стандартне відхилення, мінімальні та максимальні значення) з результатами кількісної оцінки Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В для всіх пристроїв ПЛР у реальному часі

Теоретична специфічність для виявлення всіх інших підтверджених генотипів і підтипів HBV була доведена шляхом вирівнювання послідовностей основних олігонуклеотидів з даними про послідовності відповідних референсних штамів підтипів (дані не показані).

#### 4.3.2 Аналітична специфічність

Аналіз 13 не-HBV-позитивних зразків ДНК-вірусу людини (HSV типу 1 і 2; PVB19; EBV; HPV16; HPV18; HCMV) і двох зразків РНК-вірусу (HIV; HCV) підтвердив 100% аналітичну специфічність Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В (див. Таблицю 2).

Таблиця 2: Результати аналізу 15 не-HBV-позитивних зразків ДНК/РНК-вірусу людини

| Зразок                               | Виявлення HBV | Виявлення ІС |
|--------------------------------------|---------------|--------------|
| HBV позитивний контроль (n = 1)      | 1/1           | 1/1          |
| Вірусний негативний контроль (n = 1) | 0/1           | 1/1          |
| HSV тип 1 (n = 1)                    | 0/1           | 1/1          |
| HSV тип 2 (n = 1)                    | 0/1           | 1/1          |
| PVB19 (n = 2)                        | 0/2           | 2/2          |
| EBV (n = 1)                          | 0/1           | 1/1          |
| HPV16 (n = 1)                        | 0/1           | 1/1          |
| HPV18 (n = 1)                        | 0/1           | 1/1          |
| HCMV (n = 4)                         | 0/4           | 4/4          |
| HIV (n = 1)                          | 0/1           | 1/1          |
| HCV (n = 1)                          | 0/1           | 1/1          |

#### 4.3.3 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність виражається як негативний результат при відсутності цільового значення. 100 зразків пацієнтів із негативним результатом тесту на HBV компанією Biomex GmbH за допомогою набору ABBOTT PRISM® HBsAg Assay були визначені за допомогою Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В. Усі зразки показали негативні результати для ДНК HBV, тоді як результати були позитивні для Внутрішнього Контролю (див. Таблицю 3).

Таблиця 3: Діагностична специфічність

| Зразок                                   | Виявлення HBV | Виявлення ІС |
|--|---------------|--------------|
| HBV негативні зразки пацієнтів (n = 100) | 0/100         | 100/100      |

Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В показав аналітичну та діагностичну специфічність 100%.

#### 4.4 Точність

Дані точності представляють собою повну процедуру кількісного визначення ДНК HBV за допомогою Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В, з використанням Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA для ручної екстракції NA та Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX для автоматичної екстракції NA за допомогою CyBio Felix.

Серію розведень HBV-позитивного зразка пацієнта, що складається з 5 різних рівнів вірусного навантаження та діапазону кроків  $4\text{-log}_{10}$ , було проаналізовано за допомогою 3 різних партій Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В у 3 різні дні та на 5 різних ПЛР-пристроях у реальному часі (CFX96, qTOWER<sup>3</sup>, LightCycler<sup>®</sup> 480, 7500 Fast і Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000) для оцінки достовірності та точності (див. Таблицю 4).

Результати показали загальну надійну точність для Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В в межах інтервалу прийнятності точності  $\pm 0.6 \log_{10}$ , незалежно від різних параметрів (ручна та автоматична екстракція NA; різні дні аналізу, партії, пристрої для ПЛР).

Таблиця 4: Середня точність і достовірність, а також діапазон достовірності (різниця між найбільшим і найменшим середнім значенням) Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В щодо окремих факторів впливу

| Фактори впливу                       | Достовірність [ $\log_{10}$ МО/мл (IU/ml)] | Діапазон достовірності [ $\log_{10}$ МО/мл (IU/ml)] | Точність [CV%] |
|--------------------------------------|--|---|----------------|
| Автоматичний                         | 0.05                                       | Метод екстракції                                    | 13%            |
| Ручний                               | 0.20                                       | (0.15)  | 12%            |
| партія 1                             | -0.01                                      | Зарядка   | 14%            |
| партія 2                             | 0.16                                       | (0.23)  | 12%            |
| партія 3                             | 0.22                                       |   | 11%            |
| день 1                               | 0.15                                       | Повтор  | 12%            |
| день 2                               | 0.12                                       | (0.04)  | 13%            |
| день 3                               | 0.11                                       |   | 13%            |
| CFX                                  | 0.16                                       | Прилад ПЛР  | 13%            |
| qT                                   | 0.08                                       | (0.15)  | 13%            |
| FS                                   | 0.10                                       |   | 10%            |
| LC                                   | 0.22                                       |   | 11%            |
| RG                                   | 0.07                                       |   | 15%            |
| Розведення 1 (588.235 МО/мл (IU/ml)) | 0.08                                       | Розведення  | 8%             |
| Розведення 2 (58.824 МО/мл (IU/ml))  | 0.07                                       | (0.12)  | 9%             |
| Розведення 3 (5.882 МО/мл (IU/ml))   | 0.12                                       |   | 9%             |
| Розведення 4 (588 МО/мл (IU/ml))     | 0.17                                       |   | 12%            |
| Розведення 5 (58.8 МО/мл (IU/ml))    | 0.19                                       |   | 23%            |

Для очікуваних рівнів концентрації понад 100 МО/мл (IU/ml) середній коефіцієнт варіації становив близько 10%. При найменшій концентрації близько 60 МО/мл (IU/ml) коефіцієнт варіації збільшувався до 23% (див. Рисунок 4). Тому, якщо потрібен точний результат кількісного визначення в діапазоні від 100 МО/мл (IU/ml) до LOD, рекомендується повторити зразок із триразовими вимірюваннями.

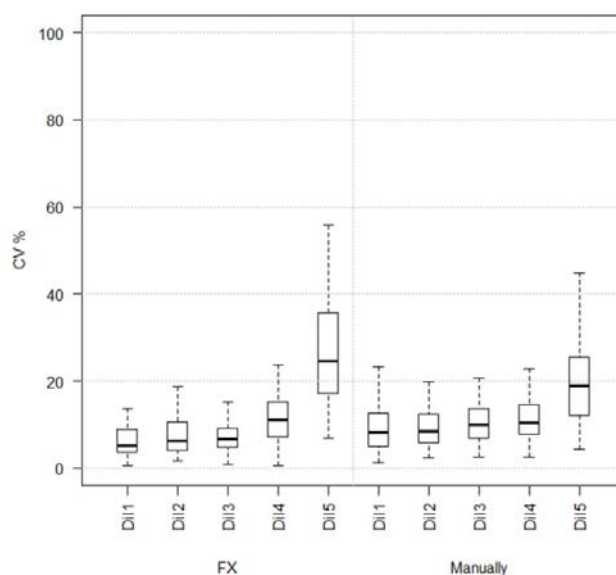


Рисунок 4: Точні дані Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В: Розподіл значень CV як функція стадії розведення та методу екстракції

#### 4.5 Надійність

Надійність виражає загальну частоту відмов в роботі Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В і була перевірена для повної процедури тестування з використанням Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX для автоматичної екстракції NA за допомогою CyBio Felix.

Загальну кількість 112 зразків, включаючи референсну плазму, розведену до 25 МО/мл (IU/ml) (що представляє 3-кратну концентрацію вірусу від 95 % граничного значення (cut-off) тесту), було проаналізовано на CFX96, qTOWER<sup>3</sup>, LightCycler<sup>®</sup> 480 та Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000. Ще 111 або 112 зразків, що містять референсну плазму, розведену до 30 МО/мл (IU/ml), аналізували за допомогою RealLine Cyclers 48/96, а також QuantStudio 5. Результати аналізу наведені в Таблиці 5.

Таблиця 5: Результати дослідження частоти відмов в роботі Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В

|                                    | (+) Результати | Частота відмов в роботі |
|------------------------------------|----------------|-------------------------|
| <b>CFX96</b>                       |                |                         |
| HBV-DNA (FAM)                      | 112/112        | 0 %                     |
| IC (VIC/Cy5)                       | 112/112        |                         |
| <b>qTOWER<sup>3</sup></b>          |                |                         |
| HBV-DNA (FAM)                      | 112/112        | 0 %                     |
| IC (YY/Cy5)                        | 112/112        |                         |
| <b>LightCycler<sup>®</sup> 480</b> |                |                         |
| HBV-DNA (FAM)                      | 112/112        | 0 %                     |
| IC (YY/Cy5)                        | 112/112        |                         |
| <b>7500 FS</b>                     |                |                         |
| HBV-DNA (FAM)                      | 112/112        | 0 %                     |
| IC (YY/Cy5)                        | 112/112        |                         |
| <b>Rotor-Gene<sup>®</sup> 3000</b> |                |                         |
| HBV-DNA (FAM)                      | 112/112        | 0 %                     |
| IC (YY/Cy5)                        | 112/112        |                         |
| <b>RealLine Cyclers 48</b>         |                |                         |
| HBV-DNA (FAM)                      | 112/112        | 0 %                     |
| IC (YY/Cy5)                        | 112/112        |                         |
| <b>RealLine Cyclers 96</b>         |                |                         |
| HBV-DNA (FAM)                      | 112/112        | 0 %                     |
| IC (YY/Cy5)                        | 112/112        |                         |
| <b>QuantStudio 5</b>               |                |                         |
| HBV-DNA (FAM)                      | 112/112        | 0 %                     |
| IC (YY/Cy5)                        | 112/112        |                         |

Ампліфікацію ДНК HBV за допомогою Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В не може бути знижено додаванням EDTA, білірубину та гемоглобіну.

Результати кількісного визначення зразків з високою концентрацією ліпідів можуть бути значно зменшені. Таким чином, результати, отримані з ліпемічної плазми або сироватки, слід ретельно інтерпретувати. Гепаринізовану плазму необхідно виключити з аналізу через її інгібуючу дію на активність Taq-полімераз.

Ефективність Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В під час сероконверсії аналізували за допомогою панелей попередньої сероконверсії PHM 937, PHM 939 та PHM 941, отриманих від SeraCare Life Sciences, Inc. (США). Дані кількісної оцінки ДНК HBV порівнювали з аналізом NAT, який використовувався для початкового кількісного визначення вірусного навантаження відповідної панелі сероконверсії. Результати показані на Рисунку 5.



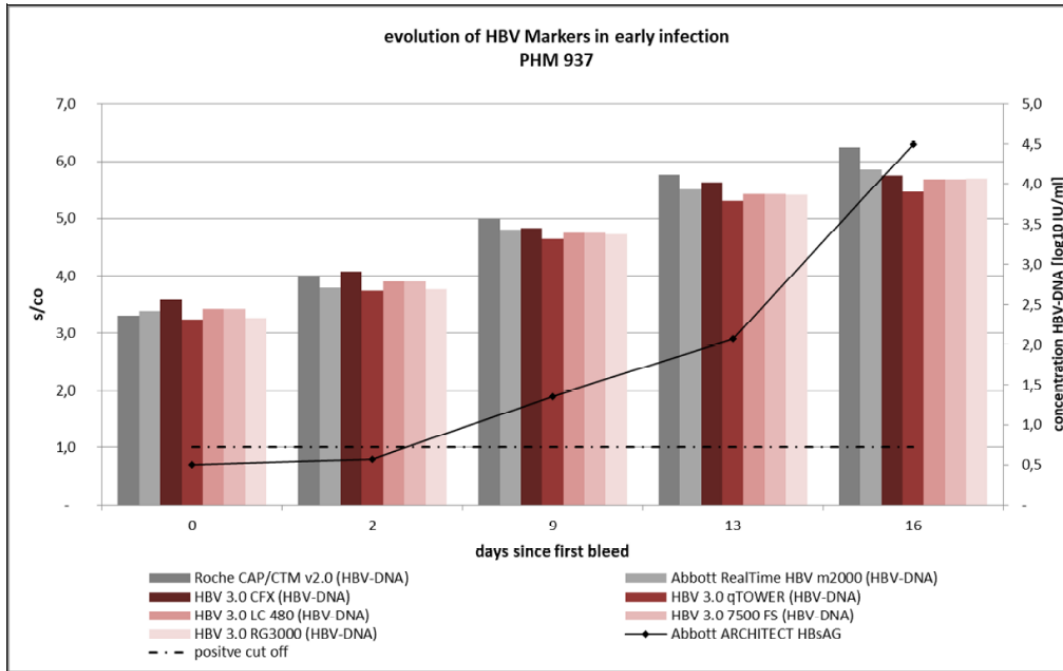


Рисунок 5: Ефективність Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В під час сероконверсії. Для кожного пристрою ПЛР результати кількісної оцінки ДНК HBV для кожного зразка зв'язали з початково вимірними рівнями антитіл HBsAg (Abbott ARCHITECT HBsAg) і порівнювали з результатами інших аналізів qPCR в реальному часі (аналіз CAP/CTM v2.0 (Roche) і Abbot RealTime HBV m2000). Результати показані для прикладу для панелі сероконверсії PHM937

У порівнянні з початково застосованими аналізами NAT Abbott m2000, CAP/CTM v2.0 (Roche) і Cobas® AmpliPrep/TaqMan (Roche), Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В показав порівнянну продуктивність.

#### 4.6 Діагностична оцінка

Діагностичну чутливість і лінійність Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В було проаналізовано за допомогою 106 позитивних зразків HBV ДНК пацієнтів на CFX96, qTOWER3, LightCycler® 480, 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000.

Діагностичну оцінку проводили з 59 зразками для ручної екстракції та 51 зразком для автоматичної екстракції за допомогою CyBio Felix. Кількісні дані порівнювали з результатами, отриманими заздалегідь за допомогою сертифікованого CE CAP/CTM v2.0 аналізу (Roche), виконуючи регресію Демінга. Результати показані на Рисунку 6.

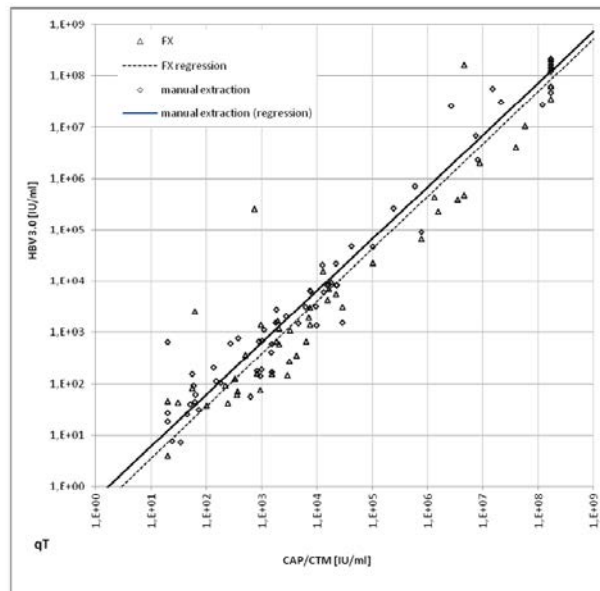


Рисунок 6: Діагностична оцінка: Діаграма розсіювання регресії Демінга, що порівнює Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В з аналізом CAP/CTM (Roche). Для кількісного визначення qTOWER дані наведені для прикладу

Регресія Демінга показала високий ступінь кореляції між результатами аналізу CAP/CTM (Roche) і Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В для ручного (див. Таблицю 6а), а також автоматичної екстракції нуклеїнових кислот за допомогою CyBio Felix (Таблиця 6б).

Таблиця 6а: Діагностична оцінка: Порівняння Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В з аналізом CAP/CTM v2.0 (Roche) для ручної екстракції нуклеїнової кислоти

| Ручна екстракція      | CFX96 | qTOWER3 | 7500 Fast | LightCycler® 480 | Rotor-Gene® 6000 |
|-----------------------|-------|---------|-----------|------------------|------------------|
| Кореляція             | 0.959 | 0.973   | 0.970     | 0.972            | 0.972            |
| 3 ± log <sub>10</sub> | 4/59  | 3/59    | 3/59      | 3/59             | 3/56             |

Таблиця 6б: Діагностична оцінка: Порівняння Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В з аналізом CAP/CTM v2.0 (Roche) для автоматичної екстракції нуклеїнової кислоти

| FX                    | CFX96 | qTOWER3 | LightCycler® 480 | Rotor-Gene® 6000 |
|-----------------------|-------|---------|------------------|------------------|
| Кореляція             | 0.94  | 0.95    | 0.95             | 0.95             |
| 3 ± log <sub>10</sub> | 4/50  | 3/51    | 3/51             | 3/51             |

**ПРИМІТКА** Стандарти кількісної оцінки Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В відкалібровані за референсним матеріалом PEI HBV-DNA (№ 3620/05), який сам був відкалібрований за 1-м міжнародним стандартом ВООЗ для ДНК HBV (код NIBSC: 97/746). Паралельно було перевірено 4-й міжнародний стандарт ВООЗ для ДНК HBV (код NIBSC: 10/266). Результати показали такі ж результати, як і для референсного матеріалу PEI.
















## 5 КОМПОНЕНТИ НАБОРУ, ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Кожен набір містить дві невеликі внутрішні коробки (1 і 2) і невелику сумку для зберігання наступних компонентів:

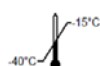
- коробка 1 для Ферменту для ПЛР у реальному часі RT PCR і Внутрішній Контроль IC,
- коробка 2 для Суміші реагентів Вірус гепатиту В/Внутрішній контроль HBV/IC RM та H<sub>2</sub>O класу ПЛР,
- сумка для Стандартів 1-4 Вірусу гепатиту В/Внутрішній контроль STD 1-4 HBV/IC.

**ПРИМІТКА** Фермент RT PCR має бути ПОВТОРНО УПАКОВАНИЙ у коробку 1 після прибуття. Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В доступний у 3 версіях, зведених у таблиці 7.

Таблиця 7: Версії набору та компоненти

|   |  32   |  96   |  192  |
|---|--|--|--|
| <b>КАТ. №</b>                             | LUA-PCR.HBV.32   | LUA-PCR.HBV.96   | LUA-PCR.HBV.192  |
| <b>IC<sup>1</sup></b>                     |  IC Спайк-пробірка (Spiking Tube) для 1 x 0.50 мл (мл) робочого розчину |  IC Спайк-пробірка (Spiking Tube) для 3 x 0.50 мл (мл) робочого розчину |  IC Спайк-пробірка (Spiking Tube) для 6 x 0.50 мл (мл) робочого розчину |
| <b>HBV/IC STD 1-4</b>                     | 4 смужки (4 x 4 лунки)   | 4 смужки (4 x 4 лунки)   | 4 смужки (4 x 4 лунки)   |
| <b>HBV/IC RM<sup>2</sup></b>              |  Суміш реагентів для 1 x 0.05 мл (мл) робочого розчину                  |  Суміш реагентів для 2 x 0.05 мл (мл) робочого розчину                  |  Суміш реагентів для 4 x 0.05 мл (мл) робочого розчину                  |
| <b>H<sub>2</sub>O для ПЛР<sup>3</sup></b> |  1 x 1.5 мл (мл)  |  2 x 1.5 мл (мл)  |  4 x 1.5 мл (мл)  |
| <b>RT PCR Фермент<sup>4</sup></b>         |  1 x 0.235 мл (мл)  |  1 x 0.660 мл (мл)  |  2 x 0.660 мл (мл)  |
| <b>IFU</b>                                | 1  | 1  | 1  |

### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ



Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В поставляється при кімнатній температурі, за винятком Ферменту RT PCR, який поставляється на сухому льоду. Після прибуття зберігайте Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В, включаючи **Фермент RT PCR** при -15 °C (°C) до -40 °C (°C) в темряві. Набір стабільний до закінчення терміну придатності при зберіганні в цих умовах.

### ВАЖЛИВО

<sup>1</sup>Відповідну кількість **IC** слід розчинити в **H<sub>2</sub>O для ПЛР** незадовго перед використанням. Залишок розчиненого **IC** можна відповідним чином розподілити на аліквоти та зберігати при -20 °C (°C). Збережені аліквоти можна використовувати до 60 днів. Можливе повторне заморожування та розморожування до 5 разів.

<sup>2</sup>Відповідну кількість Суміші реагентів **HBV/IC RM** слід розчинити в **H<sub>2</sub>O для ПЛР** незадовго перед використанням. Залишок розчиненого **HBV/IC RM** можна зберігати при -20 °C (°C). Заморожений **HBV/IC RM** можна використовувати до 60 днів. Можливе повторне заморожування та розморожування до 5 разів. Завжди оберігайте від світла!

<sup>3</sup>Можливе повторне заморожування та розморожування **H<sub>2</sub>O для ПЛР**.

<sup>4</sup>**Фермент RT PCR** загалом слід зберігати при -20 °C (°C). Можливе повторне заморожування та розморожування до 5 разів. Тим не менш, **Фермент RT PCR** слід завжди зберігати на підставці температури льоду під час використання.

## 6 НЕОБХІДНЕ ЛАБОРАТОРНЕ ОБЛАДНАННЯ ТА ДОДАТКИ

- HBV-позитивна контрольна плазма (наприклад, Міжнародний стандарт ВООЗ для ДНК вірусу гепатиту В для тесту NAT або Референсного препарату PEI HBV DNA [PEI код № 3620/05]). Надані стандарти кількісної оцінки можуть розглядатися як позитивний контроль.
- HBV-негативний контроль (наприклад, людська плазма або сироватка без ДНК HBV).
- Для автоматичного очищення:
  - «Базовий блок CyBio® Felix з корпусом» (Analytik Jena GmbH)
  - «Laptop - англійська операційна система» з програмним забезпеченням «Application Studio CyBio Felix eXtract»
  - «Набір для екстракції CyBio Felix»
- qTOWER 2 і 3 (Analytik Jena), CFX96 (Bio-Rad), LightCycler® 480 (Roche), 7500 Fast (Applied Biosystems) або Rotor-Gene® 3000/6000/Q (Corbett Research/Qiagen).
- Спеціальне програмне забезпечення в режимі реального часу для аналізу даних і звітності.
- Рекомендовані витратні матеріали для ПЛР для інструментів у режимі реального часу (див. таблицю нижче).
- Відповідні інструменти для піпеток та стерильні аерозольні бар'єрні наконечники для піпеток.
- Мікроцентрифуга.
- Планшетна центрифуга.
- Термічний змішувач.
- Вихровий змішувач.
- Пробірки по 1.5 мл (ml).
- Пробірки по 2.0 мл (ml).
- Рукавички, халат.

Таблиця 8: Рекомендовані витратні матеріали для ПЛР та інформація для замовлення

| Платформа ПЛР у реальному часі                | Пластикові складові ПЛР   | Герметизація   |
|---|---|--|
| <b>qTOWER 2 &amp; 3, CFX 96</b>               | 96-лунковий ПЛР-планшет 0.2 мл (ml), повністю оброблений, білий             | Оптична герметична фольга                                  |
|   | Джерело: Analytik Jena<br>Номер для замовлення 844-70038-0                  | Джерело: Analytik Jena<br>Номер для замовлення 846-050-258 |
| <b>LightCycler® 480</b>                       | LightCycler® 480 Багатофункційний планшет 96, білий                         | Ущільнювальна плівка LightCycler® 480                      |
|   | Джерело: Roche<br>Номер для замовлення 04729692001                          | Джерело: Roche<br>Номер для замовлення 04729757001         |
| <b>7500 Fast</b>                              | MicroAmp Fast Optical 96-лунковий реакційний планшет 0.1 мл (ml) (прозорий) | Ущільнювальна плівка LightCycler® 480                      |
|   | Джерело: ThermoFisher<br>Номер для замовлення 4346907                       | Джерело: Roche<br>Номер для замовлення 04729757001         |
| <b>Rotor-Gene® 3000/6000/Q</b>                | Смужкові пробірки та ковпачки, 0.1 мл (ml)                                  | Джерело: Qiagen<br>Номер для замовлення 981103             |
| <b>RealLine Cyler 48/96<br/>QuantStudio 5</b> | 96 x 0.2 мл () Transformer Netflex Планшет білий, високого профілю          | Ущільнювальна плівка та стрічки для мікропластин Axugen™   |
|   | Джерело: BIOplastics<br>Номер для замовлення B58709                         | Джерело: Axugen UC 500<br>Номер для замовлення 14-222-873  |

## 7 ПРОЦЕДУРА

### 7.1 Збір та обробка клінічних зразків

- Зібрати 5-10 мл (ml) крові за допомогою стандартних пробірок для забору зразків.
- Для плазми бажано використовувати ЕДТА або цитратний антикоагулянт; гепарин не застосовується через його інгібуючу дію на ПЛР.
- Сироватка: після збору цільної крові дайте крові згортатися, залишаючи її при кімнатній температурі до 30 хвилин. Видаліть згусток центрифугуванням при 1000-2000 x g протягом 10 хвилин [5].
- Плазма: клітини видаляють із плазми шляхом центрифугування протягом 10 хвилин при 1000-2000 x g. Переміщують у стерильні пробірки [5].
- Зберігати сироватку та плазму при температурі 2-8 °C (°C). Виконати тест до 5 днів [5].
- Зразки плазми або сироватки можна зберігати в глибоко замороженому вигляді протягом кількох місяців при температурі від -70 °C (°C) до -20 °C (°C) залежно від температури зберігання. Уникайте повторного заморожування та розморожування [6].

### 7.2 Очищення ДНК HBV із клінічних зразків

Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В був перевірений за допомогою ручного та автоматизованого методу очищення.

Для ручного очищення використовуйте набір Для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA (Кат. №: LUA-PCR.EXTR.50 для 50 реакцій; LUA-PCR.EXTR.250 для 250 реакцій). Виконайте етапи очищення ДНК HBV згідно з відповідними IFU, використовуючи «Протокол 2: Виділення вірусної РНК/ДНК з 400 мкл (µl) сироватки/плазми за допомогою IC Спайк-пробірки».

Для автоматичного очищення використовуйте набір Для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX (виробництва Roboscreen GmbH). Виконайте етапи очищення ДНК HBV згідно з відповідними IFU.

### 7.3 Внутрішній контроль

Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В містить ІС Спайк-пробірку, стабільно покриту нуклеїновою кислотою внутрішнього контролю та нуклеїновою кислотою-носієм.

Використання ІС разом із Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA або Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX завжди дозволяє контролювати всю процедуру та виявляти хибнонегативні результати через невдалу екстракцію або надлишок інгібіторів у зразку. Щоб оцінити очищення, значення Ct внутрішнього контролю, очищеного разом із негативною або позитивною плазмою ДНК HBV, має бути у специфічних для приладу діапазонах, зведених у Таблиці 16.

### 7.4 Загальна процедура кількісного аналізу

Чотири стандарти кількісної оцінки представлені у вигляді стандартних смужок, стабільно покритих певною кількістю синтетичної ДНК HBV. Стандарти калібровані за референсним матеріалом PEI ДНК HBV (№ 3620/05, відкалібрований за 1-м міжнародним стандартом WHO для ДНК HBV (код NIBSC: 97/746)). Стандартні значення наведені в МО/мл (IU/ml), тобто концентрацію ДНК HBV в аналізованому зразку можна розрахувати безпосередньо з референсної кривої без необхідності подальшого перетворення за рівнянням.

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>ПРИМІТКА</b> | Будь ласка, зверніть увагу, що наведені стандартні значення, а отже, і кількісна оцінка залежать від Набору для очищення NA, який використовується разом із Набором для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В. Таким чином, результати кількісної оцінки дійсні лише тоді, коли використовувалися Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA або Набір для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX у поєднанні із зазначеними пристроями для ПЛР у реальному часі та витратними матеріалами для конкретного пристрою. |
|-----------------|--|

## 8 ПРОТОКОЛ

### 8.1 Підготовка внутрішнього контролю

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>ПРИМІТКА</b> | Набір для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В був оцінений разом з Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA, а також Набором для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX для екстракції нуклеїнових кислот. Внутрішній контроль надається у вигляді ІС Спайк-пробірки у складі Набору для кількісного визначення ДНК вірусу гепатиту В. Підготуйте пробірку ІС відповідно до наведених нижче інструкцій і екстрагуйте NA, дотримуючись інструкцій Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA або Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX. |
|-----------------|--|

1. Коротко центрифугуйте ІС Спайк-пробірку на повній швидкості, щоб зібрати ліофілізований ІС на дні пробірки.
2. Додайте у флакон 520 мкл (μl) **Н<sub>2</sub>О для ПЛР**; закрийте пробірку, перемішайте шляхом короткого перемішування з наступним коротким центрифугуванням.
3. Інкубуйте при 37 °C (°C) протягом 5 хвилин за допомогою платформи для струшування (800-1000 об/хв (rpm)), перемішайте на вортексі з подальшим коротким центрифугуванням.

### 8.2 Застосування розчиненого ІС для ручного очищення

1. Додайте 10 мкл (μl) ресуспендованого ІС на 400 мкл (μl) об'єму зразка до Лізуючого Розчину відповідного Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA.
2. Дотримуйтесь інструкцій Набору для екстракції «Протокол 2: Виділення вірусної РНК/ДНК з 400 мкл (μl) сироватки/плазми за допомогою очищення ІС Спайк-пробірки».

### 8.3 Застосування розчиненого ІС для автоматизованого очищення

Дотримуйтесь інструкцій до Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX.

### 8.4 Приготування 25x суміші реагентів

1. Коротко центрифугуйте суміш реагентів **HBV/IC RM** на повній швидкості, щоб зібрати ліофілізовану суміш реагентів на дно пробірки.
2. Додайте 53 мкл (μl) **Н<sub>2</sub>О для ПЛР** до **HBV/IC RM**; закрийте пробірку, перемішайте шляхом короткого перемішування з наступним коротким центрифугуванням.
3. Інкубуйте при 37 °C (°C) протягом 5 хвилин за допомогою платформи для струшування (800-1000 об/хв (rpm)), перемішайте на вортексі з подальшим коротким центрифугуванням.

### 8.5 Приготування 1x Майстер-Мікс

1. Перед налаштуванням Майстер-Мікс кілька разів обережно переверніть **Фермент RT PCR** і коротко центрифугуйте.
2. Приготуйте 1x Майстер-Мікс відповідно до наведеної нижче таблиці. Перемішуйте на вортексі протягом щонайменше 10 секунд з подальшим коротким центрифугуванням.

Таблиця 9: Склад 1x Майстер-Мікс на реакцію

| Реагент                               | Об'єм для 1x запуску (мкл (μl)) | Кінцева концентрація |
|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| <b>Н<sub>2</sub>О для ПЛР</b>         | 7.75                            | -                    |
| <b>Суміш реагентів HBV/IC RM, 25x</b> | 1                               | 1x                   |
| <b>RT PCR фермент</b>                 | 6.25                            | 1x                   |
| <b>Всього</b>                         | 15                              |                      |

## 8.6 Підготовка кількісних стандартів

1. Відкрийте стандартну смужку **HBV/IC STD -4** і покладіть смужку на відповідну стійку температури льоду.
2. Додайте 25 мкл (μl) **H<sub>2</sub>O для ПЛР** до кожної лунки стандарту кількісної оцінки **HBV/IC STD 1-4**; перемішайте, піпетуючи кілька разів вгору і вниз.

Будьте обережні, використовуйте новий наконечник піпетки для кожного стандарту, щоб уникнути перенесення забруднення.

**ПРИМІТКА** Важливо змішувати стандарти кількісної оцінки **HBV/IC STD 1-4** шляхом піпетування вгору і вниз кілька разів. Не перемішуйте стандарти кількісної оцінки на вортексі!

Зберігайте стандарт кількісної оцінки на льоду або на стійці температури льоду до введення в ПЛР!

## 8.7 Приготування реакційного набору

1. Помістіть витратні матеріали для ПЛР у режимі реального часу (не надаються) на відповідну стійку температур льоду.
2. Додайте 15 мкл (μl) 1x Майстер-Мікс в лунки, призначені для кількісної оцінки зразків, NTC і додаткові чотири лунки для кожного із стандартів кількісної оцінки **HBV/IC STD 1-4**.
3. Додайте 10 мкл (μl) **H<sub>2</sub>O для ПЛР** у лунки, які слугують NTC. Додайте 10 мкл (μl) ресуспендованого **HBV/IC STD 1-4** у всі лунки, які слугують кількісними стандартами, що містять 1x Майстер-Мікс. Не перевищуйте кінцевий об'єм реакції 25 мкл (μl). Переконайтеся, що розчин **H<sub>2</sub>O для ПЛР** і розчин стандарту для кількісної оцінки належним чином змішані з Майстер-Мікс, піпетуючи кілька разів вгору і вниз.

**ПРИМІТКА** Після використання утилізуйте залишки розчину **HBV/IC STD 1-4**. Щоб уникнути забруднення, ми рекомендуємо запечатати стандарт кількісної оцінки відповідною кришкою (наприклад, паралілкою, не входить до набору).

4. Додайте 10 мкл (μl) елюату з екстракції NA (набір Для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA або набір Для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX) у відповідні лунки зразка, що містять 1x Майстер-Мікс. Не перевищуйте кінцевий об'єм реакції 25 мкл (μl). Переконайтеся, що Майстер-Мікс і елюат змішані належним чином.
5. Накрийте витратні матеріали для ПЛР у режимі реального часу. Центрифугуйте ПЛР-планшети протягом 1 хвилини при 1000 об/хв (rpm), щоб зібрати ПЛР-суміш на дно кожної лунки (не потрібно для пробірок Rotor-Gene®).
6. Запрограмуйте застосовані платформи ПЛР у реальному часі, як зазначено в Таблицях 10-13, та запустіть програму.

**ПРИМІТКА** Обов'язкова стандартна крива, отримана в процесі запуску, забезпечує значення критеріїв перевірки прогону - нахил та R2 (див. Таблицю 16).

Ніколи не використовуйте зовнішні стандартні криві для кількісної оцінки.

Таблиця 10: Програма ПЛР для qTOWER 2 і 3, CFX96

| Крок | Цикл | Профіль                   | Температура | Час       | Крок                |
|------|------|---------------------------|-------------|-----------|---------------------|
| 1    | 1    | Зворотна транскрипція     | 47 °C (°C)  | 15 хвилин | 5 °C (°C)/секунду   |
| 2    | 1    | Активация Taq             | 95 °C (°C)  | 2 хвилини | 5 °C (°C)/секунду   |
| 3    | 45   | Денатурація               | 95 °C (°C)  | 15 секунд | 2.5 °C (°C)/секунду |
|      |      | Нормалізація/Продовження* | 57 °C (°C)  | 1 хвилина | 5 °C (°C)/секунду   |

\*Збір даних: Виявлення флуоресценції (FAM; Cy5) для qTOWER 2 і 3

#для qTOWER 2 і 3 рекомендовані наступні попередні налаштування пристрою: Відкрити новий проект > Сканувати > Підсилення: для FAM = 4; для VIC/JOE = 3; для Cy5 = 5.

Таблиця 11: Програма ПЛР для 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000/6000/Q, RealLine Cycler 48/96

| Крок | Цикл | Профіль                   | Температура | Час       | Крок           |
|------|------|---------------------------|-------------|-----------|----------------|
| 1    | 1    | Зворотна транскрипція     | 47 °C (°C)  | 15 хвилин | Не регулюється |
| 2    | 1    | Активация Taq             | 95 °C (°C)  | 2 хвилини |                |
| 3    | 45   | Денатурація               | 95 °C (°C)  | 15 секунд |                |
|      |      | Нормалізація/Продовження* | 57 °C (°C)  | 1 хвилина |                |

\*Збір даних: Виявлення флуоресценції (FAM; Cy5) для RealLine Cycler 48/96 і для 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000/6000/Q (FAM; VIC/JOE та/або Cy5).

Таблиця 12: Програма ПЛР для QuantStudio 5

| Крок | Цикл | Профіль                   | Температура | Час       | Крок                 |
|------|------|---------------------------|-------------|-----------|----------------------|
| 1    | 1    | Зворотна транскрипція     | 47 °C (°C)  | 15 хвилин | 3.16 °C (°C)/секунду |
| 2    | 1    | Активация Taq             | 95 °C (°C)  | 2 хвилини | 3.16 °C (°C)/секунду |
| 3    | 45   | Денатурація               | 95 °C (°C)  | 15 секунд | 3.16 °C (°C)/секунду |
|      |      | Нормалізація/Продовження* | 57 °C (°C)  | 1 хвилина | 2.45 °C (°C)/секунду |

\*Збір даних: Виявлення флуоресценції (FAM; VIC та/або Cy5)

Таблиця 13: Програма ПЛР для LightCycler® 480

| Крок | Цикл | Профіль                   | Температура | Час       | Крок                |
|------|------|---------------------------|-------------|-----------|---------------------|
| 1    | 1    | Зворотна транскрипція     | 47 °C (°C)  | 15 хвилин | 4.4 °C (°C)/секунду |
| 2    | 1    | Активация Taq             | 95 °C (°C)  | 2 хвилини | 4.4 °C (°C)/секунду |
| 3    | 45   | Денатурація               | 95 °C (°C)  | 15 секунд | 2.5 °C (°C)/секунду |
|      |      | Нормалізація/Продовження* | 57 °C (°C)  | 1 хвилина | 2.2 °C (°C)/секунду |
| 4    | 1    | Охолодження               | 40 °C (°C)  | 30 секунд | Макс.               |

\*Збір даних: Виявлення флуоресценції (FAM; VIC та/або Cy5)

## 9 АНАЛІЗ ДАНИХ

Кожна ампліфікація ДНК пов'язана з генерацією сигналу флуоресценції, що вимірюється в каналі FAM (для ДНК HBV) та в каналі YY/VIC/JOE та/або Cy5 (для IC), що призводить до кривої сигмовидного росту (логарифмічної шкали). Аналіз даних виконується згідно з інструкціями виробника приладу для ПЛР у реальному часі за допомогою відповідного програмного забезпечення. Перевірте отримані дані, щоб переконатися, що запуск дійсний, і інтерпретуйте результати (Таблиця 14).

Таблиця 14: Інтерпретація результатів

| Канал FAM  | Канал YY/VIC/JOE або Cy5 | Інтерпретація   |
|--|--------------------------|---|
| <b>Інтерпретація результатів виявлення</b>               |                          |   |
| x  | x                        | Зразок дійсний - виявлення ДНК HBV зразка   |
| x  | -                        | Зразок недійсний - повторити зразок   |
| -  | x                        | Зразок дійсний - лише виявлення IC, ДНК HBV не виявляється/HBV-негативний зразок                                      |
| -  | -                        | Зразок недійсний - немає ампліфікації/виявлення взагалі, повторити зразок   |
| <b>Інтерпретація результатів кількісної оцінки</b>       |                          |   |
| < LOD/LLoQ   | x                        | Нижче нижньої межі виявлення аналізу. Для підтвердження позитивного результату рекомендується три повторення аналізу. |
| < 100 МО/мл (IU/ml)                                      | x                        | Область кількісної оцінки, схильна до коливань. Для точної кількісної оцінки рекомендується три повторення аналізу.   |
| ≥ 9 МО/мл (IU/ml) та ≤ 2.5x10 <sup>9</sup> МО/мл (IU/ml) | x                        | Розраховані результати знаходяться в межах лінійного діапазону аналізу.   |
| > 2.5x10 <sup>9</sup> МО/мл (IU/ml)                      | x                        | Вище верхньої межі охопленого лінійного діапазону аналізу. Рекомендується розбавити вихідний зразок.                  |

Концентрацію ДНК HBV у клінічних зразках визначають на основі стандартної кривої, отриманої в результаті аналізу смужки стандарту кількісної оцінки та значень Ct відповідних зразків. Концентрація ДНК HBV виражається в МО/мл (IU/ml). У таблиці 16 наведено концентрації стандартів кількісної оцінки ДНК HBV у разі використання Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA або Набору для екстракції вірусної РНК/ДНК - INSTANT Virus RNA/DNA Kit-FX.

Таблиця 15: Концентрації стандартів кількісної оцінки ДНК HBV

| HBV/IC STD 1-4 | HBV DNA [МО/мл (IU/ml)] |
|----------------|-------------------------|
| 1              | 25000000                |
| 2              | 250000                  |
| 3              | 2500                    |
| 4              | 250                     |

Встановлення порогу може суттєво вплинути на значення Ct.

Нижче наведено рекомендації щодо встановлення порогових значень:

- qTOWER 2 & 3: FAM: 6-7; PP: 5; Cy5: 5
- CFX96: FAM: 400-700; YY: 150-250; Cy5: 100-150
- LightCycler® 480:

### ПРИМІТКА

| Канал | Смуга шуму | Порогове значення | Точки придатності |
|-------|------------|-------------------|-------------------|
| FAM   | 0.7-1.6    | 1.5-5.9           | 4                 |
| YY    | 0.8-1.5    | 1.4-2.6           | 4                 |
| Cv5   | 0.5-0.9    | 1.0-2.4           | 4                 |

- 7500 Fast: FAM: 0.1-0.2; PP: 0.04-0.05; Cy5: 0.04-0.1
- Rotor-Gene® 3000/6000/Q: FAM: 0.03-0.05; YY: 0.015-0.03; Cy5: 0.03-0.05

- RealLine Cyclер 48/96: FAM: ~500; Cy5: ~700
- QuantStudio 5: FAM: ~200 000; PP: ~60 000; Cy5: ~90 000

Критеріями для перевірки прогону є нахил і значення R<sup>2</sup> стандартної кривої (див. Таблицю 16). Области очікуваних значень Ct стандартів відносяться до власних даних валідації і повинні використовуватися як орієнтири для встановлення порогових значень (див. Таблиці 17-19).

Якщо нахил та/або R<sup>2</sup> виходять за межі діапазону (Таблиця 16), один із чотирьох стандартів кількісної оцінки може бути виключений (найбільш віддалений від лінії регресії), оскільки трьох кількісних стандартів достатньо для дійсних результатів.

У такому випадку не може бути виведено жодне право на гарантію на весь продукт.

Таблиця 16: Критерії перевірки запуску

| Параметр  | qTOWER 2 & 3, CFX96, LightCycler® 480, 7500 Fast, Rotor-Gene® 3000/6000/Q, RealLine Cyclер 48/96, QuantStudio 5 |
|---|---|
| Діапазон нахилу   | від -3.10 до -3.60  |
| Коефіцієнт лінійної регресії (R <sup>2</sup> ) референсної кривої має бути від 0.98 до 1.00 (не застосовується до аналізу LightCycler®480).         |   |
| Очікувані значення Ct для IC стандартів кількісної оцінки (залежно від встановленого порогового значення, див. вище)                                |   |
| YY/VIC/JOE  | ≤ 40  |
| Cy5   | ≤ 38  |
| Очікувані значення Ct для IC у HBV-негативних зразках пацієнтів і HBV-позитивних зразках (залежно від встановленого порогового значення, див. вище) |   |
| YY/VIC/JOE  | ≤ 40  |
| Cy5   | ≤ 38  |

Таблиця 17: Орієнтовні значення Ct для стандартів кількісної оцінки на qTOWER 2 і 3, LightCycler® 480 і CFX 96

| HBV/IC<br>STD 1 - 4 | Очікуваний приріст між значеннями Ct | qTOWER 2 і 3 |             | LightCycler® 480 |             | CFX 96  |             |
|---------------------|--------------------------------------|--------------|-------------|------------------|-------------|---------|-------------|
|                     |                                      | середнє      | від - до    | середнє          | від - до    | середнє | від - до    |
| 1                   |                                      | 14.8         | 14.0 - 15.6 | 15.4             | 13.7 - 17.2 | 15.2    | 14.2 - 16.1 |
| 2                   | 1 до 2<br>+ ~ 6.64                   | 21.4         | 20.7 - 22.2 | 22.2             | 20.5 - 23.8 | 21.8    | 21.0 - 22.7 |
| 3                   | 2 до 3<br>+ ~ 6.64                   | 28.3         | 27.5 - 29.1 | 28.9             | 27.2 - 30.7 | 28.5    | 27.6 - 29.5 |
| 4                   | 3 до 4<br>+ ~ 3.32                   | 31.6         | 30.7 - 32.4 | 32.3             | 30.6 - 34.0 | 32.0    | 31.0 - 33.0 |

Таблиця 18: Орієнтовні значення Ct для стандартів кількісної оцінки на 7500 Fast і Rotor-Gene® 3000/6000/Q

| HBV/IC<br>STD 1 - 4 | Очікуваний приріст між значеннями Ct | 7500 Fast |             | Rotor-Gene® 3000/6000/Q |             |
|---------------------|--------------------------------------|-----------|-------------|-------------------------|-------------|
|                     |                                      | середнє   | від - до    | середнє                 | від - до    |
| 1                   |                                      | 14.7      | 13.7 - 15.6 | 12.5                    | 11.4 - 13.6 |
| 2                   | 1 до 2<br>+ ~ 6.64                   | 21.4      | 20.6 - 22.2 | 19.1                    | 17.9 - 20.4 |
| 3                   | 2 до 3<br>+ ~ 6.64                   | 28.1      | 27.3 - 29.0 | 25.6                    | 24.6 - 26.7 |
| 4                   | 3 до 4<br>+ ~ 3.32                   | 31.5      | 30.6 - 32.3 | 28.9                    | 27.7 - 30.1 |

Таблиця 19: Керівні значення Ct для стандартів кількісної оцінки на RealLine Cyclor 48/96 і Quant Studio 5

| HBV/IC<br>STD 1 - 4 | Очікуваний<br>приріст між<br>значеннями Ct | RealLine Cyclor 48 |             | RealLine Cyclor 96 |             | Quant Studio 5 |             |
|---------------------|--|--------------------|-------------|--------------------|-------------|----------------|-------------|
|                     |  | середнє            | від – до    | середнє            | від – до    | середнє        | від – до    |
| 1                   |  | 13.8               | 12.3 – 14.8 | 13.9               | 13.4 – 14.8 | 14.4           | 13.5 – 15.4 |
| 2                   | 1 до 2<br>+ ~ 6.64                         | 20.6               | 19.2 – 21.3 | 20.9               | 20.3 – 21.2 | 21.4           | 20.4 – 22.3 |
| 3                   | 2 до 3<br>+ ~ 6.64                         | 27.3               | 25.8 – 28.1 | 27.7               | 27.1 – 28.0 | 28.1           | 27.2 – 29.1 |
| 4                   | 3 до 4<br>+ ~ 3.32                         | 30.7               | 29.1 – 31.3 | 20.9               | 30.7 – 31.5 | 31.6           | 30.9 – 32.4 |











## 10 УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

| Проблема/ймовірна причина  | Коментарі та пропозиції   |
|--|---|
| <b>Сигналу немає взагалі</b>   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Вимірювання флуоресценції не активовано</li> <li>Вибрано помилкові канали</li> <li>Неправильна програма циклу</li> <li>Неправильне застосування набору</li> <li>Умови зберігання не відповідають інструкціям, термін придатності Набору для виявлення завершився</li> </ul>                   | <p>Прочитайте посібник користувача пристрою ПЛР у реальному часі.</p> <p>Виберіть канал FAM для ДНК HBV і канал YY/VIC/JOE або Cy5 для IC.</p> <p>Перевірте налаштування приладу, повторіть запуск.</p> <p>Прочитайте інструкцію по застосуванню.</p> <p>Перевірте умови зберігання та термін придатності.</p>  |
| <b>Низький сигнал флуоресценції, зафіксований як для цілі, так і для IC, кількість цільових копій занижена</b>   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Цільова ДНК деградована</li> <li>Забруднені оптичні лінзи (Rotor-Gene®)</li> <li>Термоблок та/або оптика забруднені (формат блоку з 96 лунками)</li> </ul>  | <p>Використовуйте витратні матеріали та реагенти без ДНКази та РНКази, зберігайте ДНК на льоду. Ознайомтеся з інструкцією із застосування Набору для екстракції.</p> <p>Дивіться розділ «Технічне обслуговування» відповідної брошури до приладу, або очищайте лінзи раз на місяць за допомогою абсолютного ізопропанолу та ватних тампонів.</p> <p>Дивіться розділ «Технічне обслуговування» відповідної брошури до приладу, альтернативно заповніть кожну лунку ізопропанолом, інкубуйте 10 хвилин при 50 °C (°C), видаліть ізопропанол і промийте водою.</p> |
| <b>Відсутній або слабкий сигнал для IC у HBV-негативному зразку</b>  |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Неправильна програма циклу</li> <li>Надлишок інгібіторів у зразку/втрата ДНК під час екстракції</li> <li>Неправильний матеріал зразка (наприклад, гепаринізована плазма)</li> <li>Умови зберігання не відповідають інструкціям, термін придатності Набору для виявлення завершився</li> </ul> | <p>Перевірте налаштування приладу, повторіть запуск.</p> <p>Використовуйте рекомендований набір для екстракції та точно дотримуйтеся інструкцій виробника.</p> <p>Отримайте свіжу ЕДТА-плазму або сироватку.</p> <p>Перевірте умови зберігання та термін придатності.</p>   |
| <b>Неочікувано низькі значення Ct для IC, особливо з високими стандартами або зразками високого вірусного навантаження</b>   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Передресна передача сигналів між цільовими та IC каналами запису (особливо YY/VIC/JOE)</li> </ul>   | <p>Відкалібруйте прилад за допомогою очищених флуоресцентних барвників або повторіть запуск із використанням каналу Cy5 для виявлення IC.</p>   |
| <b>Несигмоїдні криві зростання стандартів кількісної оцінки, неприпустимо високе відхилення Ct від очікуваних значень</b>  |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Часте заморожування/розморожування або неправильне зберігання розчиненої суміші реагентів</li> <li>Умови зберігання не відповідають інструкціям, термін придатності Набору для виявлення завершився</li> </ul>  | <p>Прочитайте IFU, перевірте умови зберігання, приготуйте нову суміш реагентів.</p> <p>Перевірте умови зберігання та термін придатності.</p>  |
| <b>Різна поведінка ампліфікації зразка ДНК HBV і стандартів, непаралельні криві росту в експоненційній фазі реакції</b>  |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Надлишок інгібіторів у зразку</li> <li>Неправильний матеріал зразка</li> </ul>  | <p>Використовуйте рекомендований набір для екстракції, точно дотримуйтеся інструкцій виробника; проконсультуйтеся з лікуючим лікарем щодо лікування пацієнта.</p> <p>Використовуйте рекомендований тип зразка.</p>  |
| <b>Записаний сигнал FAM для HBV-негативних зразків/NTC</b>   |   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Забруднення з ДНК HBV або ампліконами ДНК</li> </ul>  | <p>Повторіть екстракцію та/або ПЛР з новими реагентами; дезактивуйте інструменти та робоче місце.</p>   |



Якщо у вас виникли додаткові запитання, на які немає відповіді, будь ласка, зв'яжіться з нашою технічною службою.

#### СИМВОЛИ

|  |  |   |                                    |
|--|--|---|------------------------------------|
|               | Код продукту   |  | Температура зберігання             |
|               | Прилад для діагностики <i>in vitro</i>   |  | Дивіться інструкцію з використання |
|               | Номер лоту   |  | Виробник                           |
|               | Термін придатності   |  | Кількість тестів                   |
| <br>UA.TR.116 | Знак відповідності технічним регламентам з ідентифікаційним номером призначеного органу з оцінки відповідності, який був залучений на етапі контролю виробництва |  | Дата виготовлення                  |

Вся продукція IVD, вироблена компанією, перебуває під контролем сертифікованої Системи управління якістю, схваленої Уповноваженим органом з оцінки відповідності. Кожна партія проходить контроль якості та випускається на ринок лише за умови відповідності технічним регламентам та критеріям прийнятності.



#### ВИРОБНИК:

ТОВ «ЛАБЮЕЙ»

Україна, 76018

м. Івано-Франківськ, вул. Петлюри, 25

Моб.: +38 (067) 000-20-22

E-mail: [info@labua.com.ua](mailto:info@labua.com.ua)



UA.TR.116