

**ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДНК  
ВІРУСУ ГЕПАТИТУ В**

 Кат. №: **LUA-PCR.HBV.25**  
 Кількість тестів: **25**

 Дата випуску інструкції: **11-07-2022**  
 Версія: **0**
**Кількісне визначення ДНК HBV (QT)**
**ПЛР у режимі реального часу для кількісного визначення геному вірусу Гепатиту В**

- тільки для діагностичного використання «in vitro» -

**A. ПРИЗНАЧЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ**

Набір для **Кількісного визначення ДНК HBV** ПЛР у режимі реального часу з кодом **LUA-PCR.HBV.25** призначений для кількісного виявлення ДНК вірусу Гепатиту В у плазмі людини з одночасним контролем реакції ампліфікації за допомогою **Внутрішнього контролю (IC)**. Набір призначений для використання в поєднанні з клінічними спостереженнями та лабораторними маркерами як індикатор прогнозу захворювання та для використання як допоміжний засіб при оцінці вірусної відповіді на противірусне лікування.

Набір адаптований для використання на Термоциклерах для визначення в режимі реального часу ABI 7500 Sequence Detection System® (програмне забезпечення SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems™) або MX3000P (програмне забезпечення MxPro версії 4.01, Stratagene™\*\*\*).

\*Applied Biosystems є зареєстрованою торговою маркою, а ABI PRISM® є торговою маркою Applied Corproation або її дочірніх компаній у США та/або деяких інших країнах.

\*\*\*Stratagene є зареєстрованою торговою маркою.  
ТОВ «ЛАБЮЕЙ» не є власником даних зареєстрованих торгових марок.

**B. ВСТУП**

Вірус гепатиту В є вірусом, що належить до сімейства Гепаднавірусів. Його геном являє собою невелику кільцеву неповну двоспиральну ДНК, яка стала повним і суперзгорнутим геномом (сссDNA), коли вірус потрапляє в гепатоцити носія. Нещодавно було ідентифіковано вісім генотипів (від А до Н). Вірус має високу швидкість реплікації і високу частоту мутацій. Ці мутації призводять до накопичення у кожній інфікованій особини множинних генетичних варіантів, які називаються квазівидами. Все більше даних показують, що природний анамнез і реакція на лікування можуть відрізнятися залежно від генотипу HBV інфікованого. Однак реальна кореляція між генотипом і наслідком захворювання повністю не зрозуміла. Зараження вірусом Гепатиту В є глобальною проблемою громадського здоров'я, що стосується 350 мільйонів людей у всьому світі. Він може перерости в хронічну форму (СНВ) і може бути причиною захворювання печінки або гепатоцелюлярної карциноми (НСС). В даний час деякі спостереження показали, що тяжкість ураження печінки під час інфекції модулюється силою імунної відповіді носія. Завдяки цьому можна розпізнати два типи інфекції: гостру і хронічну.

При гострій інфекції HBV у сироватці крові можна виявити *поверхневий* антиген Гепатиту В (HBsAg), ядерний антиген IgM (HBcIgM), антиген *e* (HBeAg), але рівень АЛТ не підвищується, поки інфекція не буде добре встановлена. Рівні ДНК HBV, як правило, дуже високі, коливаючись від 200 мільйонів МО/мл (IU/ml) до 200 мільярдів МО/мл (IU/ml).

Хронічна інфекція HBV може мати 5 фаз: 1) Імунна толерантність (високі рівні HBeAg, HBsAg і висока швидкість реплікації ДНК вірусу HBV); 2) Імунна реактивність (HBeAg/HBsAg позитивний, високий або низький рівень ДНК HBV щодо перинатальної або дорослої інфекції, коливання АЛТ); 3) Стан неактивного носія (сероконверсія HBeAg проти HBsAg, HBsAg позитивний, нормальний АЛТ, дуже низька або невиявлена ДНК HBV < 3 log); 4) HBeAg-негативний хронічний гепатит (HBeAg-негативний/HBeAb-позитивний або повернення до HBeAg-позитивного, коливання рівнів ДНК HBV, підвищення або коливання АЛТ. Відсутність HBeAg у деяких пацієнтів на цій фазі пов'язана з мутацією в геномі HBV); 5) Перенесена інфекція (HBsAb позитивний, HBsAg негативний, нормальний АЛТ, негативний або дуже низький рівень ДНК HBV < 2.3 log). Діагностика та клінічний моніторинг HBV-інфекції засновані на виявленні імунологічних, серологічних маркерів та циркулюючого вірусного геному (ДНК HBV), як зазначено вище. Рівні ДНК HBV у сироватці або плазм відображають реплікацію вірусу та потенційну інфекційність, тому кількісна оцінка вірусного навантаження HBV є важливою для оцінки та лікування пацієнтів із хронічною інфекцією HBV. Нові рекомендації EASL рекомендують вірусне навантаження HBV, щоб визначити, яких

хронічних пацієнтів слід лікувати та яку терапію застосовувати (інтерферон або аналог NUC-нуклеозиту). Основною метою всіх видів терапії є зниження рівня ДНК HBV нижче 2.3 log таким чином, щоб запобігти прогресуванню до цирозу печінки або НСС.

**C. ПРИНЦИП ТЕСТУ**

Набір LUA-PCR.HBV.25 використовує технологію ПЛР у реальному часі для виявлення та кількісної оцінки ДНК HBV у клінічних зразках плазми.

Специфічність аналізу в першу чергу забезпечується вибором специфічних праймерів і проб, а також підбором жорстких умов реакції.

**ДНК HBV**, виділену зі зразка плазми, екстрагують та ампліфікують разом із неспорідненою послідовністю (**IC**), введеною в кожен зразок на початку підготовки зразка. Ця IC служить для демонстрації того, що весь процес протікає належним чином для кожного з них.

Ампліфікований продукт виявляють і визначають кількісно за стандартною кривою за допомогою проби флуоресцентного контрольного барвника, специфічного для послідовності HBV. Побудова стандартної кривої дозволяє визначити вірусне навантаження.

Аналіз стандартизований відповідно до 2-го міжнародного стандарту Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) для Вірусу гепатиту В (код NIBSC 97/750). Результати представлені в одиницях на мілілітр (МО/мл (IU/ml)) або копіях/мл (ml).

Цей аналіз не призначений для використання як скринінговий тест на HBV або як діагностичний тест для підтвердження наявності HBV-інфекції.

**D. КОМПОНЕНТИ**

Стандартний формат продукту з кодом LUA-PCR.HBV.50 містить реагенти для 50 тестів.

Компонент	Вміст	LUA-PCR.HBV.50 50 тестів
<b>A</b> КОД: ALL/MM Кольорове кодування: блакитний	Майстер-мікс	x 2 флакони/0.40 мл (ml)
<b>B</b> КОД: HBV/CB Кольорове кодування: жовтий	Ліофілізовані Праймери/Проби	x 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
<b>C</b> КОД: ALL/C Кольорове кодування: червоний	MG Вода	x 3 флакони/1.5 мл (ml)
<b>NTC</b> КОД: ALL/NTC Кольорове кодування: білий	Негативний контроль	x 1 флакон/1.5 мл (ml)
<b>STD</b> КОД: HBV/STD Кольорове кодування: червоний	Ліофілізований калібратор стандартної кривої	x 4 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
<b>IC</b> КОД: ALL/IC Кольорове кодування: зелений	Ліофілізований Внутрішній контроль	x 2 флакони (розчинити з об'ємом ALL/C, зазначеним на етикетці флакона)
Вкладиш інструкції	Інструкція по застосуванню	1

**Важлива примітка:** За запитом Лабюей може надати реагенти для 25, 100, 150 тестів, як зазначено нижче:

1. Компонент А	x1 флакон/0.4 мл (ml)	x4 флакони/0.4 мл (ml)	x6 флаконів/0.4 мл (ml)
2. Компонент В	x1 флакон	x4 флакони	x6 флаконів
3. Компонент С	x2 флакони/1.5 мл (ml)	x3 флакони/1.5 мл (ml)	x5 флаконів/1.5 мл (ml)
4. NTC	x1 флакон/1.5 мл (ml)	x1 флакон/1.5 мл (ml)	x1 флакон/1.5 мл (ml)
5. IC	x1 флакон	x4 флакони	x6 флаконів
6. STD	x2 флакони	x4 флакони	x6 флаконів
7. Інструкція	1	1	1
<b>Кількість тестів</b>	<b>25</b>	<b>100</b>	<b>150</b>
<b>Код</b>	<b>LUA-PCR.HBV.25</b>	<b>LUA-PCR.HBV.100</b>	<b>LUA-PCR.HBV.150</b>

## Е. ЗБЕРІГАННЯ ТА СТАБІЛЬНІСТЬ

Набір LUA-PCR.HBV.25 необхідно зберігати при +2...+8 °C (°C).

Після розчинення Компонент В (кодування HBV/CB) і Компонент І.С. (кодування ALL/IC) стабільні протягом 30 днів при -20 °C (°C). Але Компонент STD (кодований HBV/STD) стабільний протягом 15 днів при -20 °C (°C). Розморозьте тільки один раз розчинені компоненти.

## Ф. МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ, АЛЕ НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ З НАБОРОМ

1. Калібровані мікропіпетки (0.5 мкл (µl) < об'єм < 1000 мкл (µl)).
2. Набір для екстракції ДНК.
3. MG EtOH.
4. Термоблок.
5. Термошейкер.
6. Мікроцентрифуга.
7. Штативи для пробірок об'ємом 2 мл (ml) та 1.5 мл (ml).
8. Стерильні фільтровані наконечники з аерозольним бар'єром.
9. 0.2 мл (ml) мікропробірки, рекомендовані виробниками приладів для ПЛР у реальному часі.
10. Одноразові рукавички без тальку.
11. Термоциклер для ПЛР у реальному часі (\*).
12. Абсорбуючі паперові серветки.
13. Вортекс або подібні інструменти для змішування.

(\*) **Увага:** Дійсне калібрування чистих барвників (файл компонентів Pure Spectra) і фону (файл компонентів фону) має виконуватися регулярно.

## Г. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. Набором повинен користуватися лише кваліфікований та належним чином підготовлений технічний персонал під наглядом лікаря, відповідального за лабораторію.
2. Технічний персонал повинен пройти глибоку підготовку щодо використання Термоциклерів у реальному часі, маніпуляції з реагентами молекулярної біології та протоколів ампліфікації ПЛР у реальному часі.
3. Для проведення такого типу аналізу набір необхідно використовувати в лабораторії, сертифікованій та кваліфікованій національним органом у цій галузі (Міністерством охорони здоров'я чи аналогічним органом).
4. Весь персонал, який бере участь у проведенні аналізу, повинен носити захисний лабораторний одяг, рукавички без тальку та окуляри. Слід уникати використання будь-яких гострих (голки) або ріжучих (лез) пристроїв. Весь залучений персонал повинен бути навчений процедурам біобезпеки, як рекомендовано Центром контролю захворювань, Атланта, США, а також повідомляється в публікації Національного інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
5. Весь персонал, який займається обробкою зразків, повинен бути вакцинований проти ВГВ та ВГА, для яких вакцини доступні, безпечні та ефективні.
6. Лабораторне середовище слід контролювати таким чином, щоб уникнути забруднень, таких як пил або мікроорганізми, що утворюються в повітрі.
7. Компоненти А і В світлочутливі. Захистіть їх від впливу сильного світла.
8. Зверніть **особливу увагу** під час розчинення ліофілізованого вмісту пробірок, спостерігаючи за тим, щоб порошок, присутній на стінках пробірки, у випадку, коли центрифугування було недостатнім, включався в об'єм води, що використовується для розчинення.
9. Неправильне розчинення ліофілізованого вмісту пробірки може поставити під загрозу результат.
10. Уникайте вібрації поверхні стелю, де проводиться випробування.
11. Отримавши набір, зберігайте його при температурі 2...+8 °C (°C) у холодильнику з контролем температури або в холодній кімнаті.
12. Не обмінюйте компоненти між різними партіями наборів. Рекоменується, щоб компоненти між двома наборами однієї партії не мінялися місцями.
13. Переконайтеся, що реагенти прозорі та не містять видимих важких частинок або скупчень. Якщо ні, порекомендуйте керівнику лабораторії розпочати необхідні процедури із заміни набору.
14. Етап екстракції дуже важливий для отримання правильного результату. Уважно дотримуйтесь інструкцій, рекомендованих у посібнику користувача.
15. Під час екстракції деякі кроки мають вирішальне значення. Ключовим етапом процедури очищення є **центрифугування**. Важливо отримати осад, і супернатант має бути прозорим. Наступне **повне** ресуспендування гранул є життєво важливим для забезпечення максимального відновлення нуклеїнової кислоти.
16. **Неправильна швидкість центрифугування** може призвести до утворення гранул, які буде важко ресуспендувати. **Неправильне**

**розчинення** гранули може призвести до помилки в кількісній оцінці. У цьому випадку зверніться до «оптимізації центрифугування», зазначеної в посібнику користувача.

17. Уникайте перехресного забруднення між зразками, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх після кожного зразка.
18. Уникайте перехресного забруднення між реагентами набору, використовуючи одноразові наконечники та змінюючи їх між використанням кожного з них.
19. Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності, зазначеного на зовнішньому контейнері.
20. Розглядайте всі зразки як потенційно інфекційні. З усіма зразками крові/плазми/амніотичної рідини людини слід поводитись на рівні 2 біобезпеки, як це рекомендує Центр контролю за захворюваннями, Атланта, США, відповідно до публікацій Інституту охорони здоров'я: «Біобезпека в мікробіологічних та біомедичних лабораторіях», вид. 1984 рік.
21. Зберігайте та екстрагуйте позитивні матеріали (зразки, контрольні та амплікони) окремо від інших реагентів та використовуйте окреме приміщення для роботи з ними.
22. Розчиніть ліофілізовані реагенти з правильною кількістю, зазначеною на етикетках, води молекулярного класу (компонент С з кодом: ALL/C), що постачається в наборі.
23. Виконуйте всі робочі операції якомога швидше.
24. Робочий процес лабораторії має відбуватися в односпрямованому напрямку, починаючи з Зони екстракції та переходячи до зон Ампліфікації та Аналізу даних. Не повертайте зразки, обладнання та реагенти в зону, де були виконані попередні дії.
25. Використання одноразового пластикового посуду рекомендується для приготування рідких компонентів або для перенесення компонентів на автоматизовані робочі місця, щоб уникнути перехресного забруднення.
26. Відходи, що утворились під час використання набору, слід утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів хімічних та біологічних речовин. Зокрема, рідкі відходи, що утворюються внаслідок процедур екстракції, повинні бути оброблені як потенційно інфекційний матеріал та інактивовані перед утилізацією. Не допускайте контакту відходів екстракції з відбілювачем.
27. Випадкові розливи зразків та під час роботи повинні бути адсорбовані паперовими рушниками, змоченими побутовим відбілювачем, а потім водою. Потім рушники слід утилізувати у належні контейнери, призначені для лабораторних/лікарняних відходів.
28. Інші відходи, що утворюються внаслідок використання набору (приклад: наконечники, що використовуються для зразків), слід обробляти як потенційно інфекційні та утилізувати відповідно до національних директив та законів, що стосуються лабораторних відходів.
29. Контроль лабораторії на наявність продукту ампліфікації. Рекоменується контролювати лабораторну поверхню та обладнання на предмет забруднення.

## Н. ЗРАЗКИ: ПІДГОТОВКА І РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Кров забирається асептично шляхом венепункції, і плазма готується із застосуванням стандартних методик підготовки зразків для клінічного лабораторного аналізу.
2. Зразки цільної периферичної крові для екстракції ДНК повинні бути зібрані в EDTA згідно з лабораторною процедурою, транспортуватися та зберігатися при +2/+8 °C (°C) максимум 3 дні. Не заморожуйте зразки цільної периферичної крові, щоб уникнути лізису клітин і втрати вірусного навантаження.
3. Не спостерігалося впливу внаслідок підготовки зразка з цитратом або EDTA.  
Увага: Гепарин ( $\geq 10$  МО/мл (IU/ml)) впливає на реакції ПЛР. Не слід використовувати зразки, зібрані в пробірки, що містять гепарин як антикоагулянт. Також не можна використовувати зразки пацієнтів із гепарином.
4. Уникайте будь-якого додавання консервантів до зразків.
5. Зразки повинні бути чітко ідентифіковані кодами або назвами, щоб уникнути неправильного тлумачення результатів.
6. Гемолізовані («червоні») та помітно гіперліпемічні («молочні») зразки слід відкинути, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів. Зразки, що містять залишки фібрину або важких частинок чи мікробні нитки та тіла, слід відкидати, оскільки вони можуть призвести до хибних результатів.
7. Зразки плазми з високою кількістю ліпідів можуть спричинити незначне відновлення або відсутність відновлення нуклеїнової кислоти. У цьому випадку гранула буде маленькою або її не буде

- зовсім. Візьміть свіжий зразок і дотримуйтесь інструкції з усунення несправностей, яка міститься в посібнику користувача.
8. Плазму, якщо вона не використовується негайно, після збору необхідно аліквотувати та зберігати при -20 °С.. -80 °С (°C). Зразки можна зберігати замороженими при температурі -20 °С.. -80 °С (°C) протягом кількох місяців. Будь-які заморожені зразки не слід заморожувати/розморозжувати більше одного разу, оскільки це може вплинути на результат тесту.
  9. Зразки плазми для екстракції ДНК необхідно відбирати відповідно до звичайних лабораторних процедур, транспортувати та зберігати при +2-8 °С (°C) протягом максимум 4 годин. Зразки плазми можна зберігати замороженими при -20 °С (°C) максимум 30 днів або при -70 °С (°C) протягом більш тривалого періоду. Уникайте повторних циклів заморожування/розморозжування.
  10. Для оптимального зберігання зразків ми рекомендуємо розділити їх на кілька аліквот (мінімальний об'єм 500 мкл (μl), що необхідно для одного сеансу екстракції) і зберігати замороженими при -20 °С (°C) максимум 30 днів або -70 °С (°C) протягом більш тривалого періоду.
  11. **Пам'ятайте, що необхідна попередня аналітична обробка зразка плазми. Усі зразки необхідно розвести 1:2 у фосфатному буферному розчині (500 мкл (μl) зразка + 500 мкл (μl) PBS) перед екстрагуванням.**
  12. Відсутність кроку, зазначеного вище, викликає помилку кількісної оцінки.
  13. Використовуючи заморожені зразки, розморозьте зразки безпосередньо перед етапом екстракції, щоб уникнути розпаду нуклеїнової кислоти.

## I. ПІДГОТОВКА КОМПОНЕНТІВ І ПОПЕРЕДЖЕННЯ

### Майстер-мікс:

**Компонент А.** Готовий до використання. Перед використанням добре перемішайте на вортексі.

**ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент А чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.**

### Праймери/Проби:

**Компонент В.**

- Центрифугуйте флакон при 12000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований Компонент В з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 15 хвилин при кімнатній температурі (15 °С (°C) < КТ < 25 °С (°C)).
- Перемішайте на вортексі, уникаючи утворення піни.

**ПОПЕРЕДЖЕННЯ: Компонент В чутливий до світла. Захистіть його від впливу сильного світла.**

### MG вода:

**Компонент С.** Готовий до використання.

### NTC або Негативний Контроль:

**ALL/NTC.** Готовий до використання.

### Стандартна крива:

**Компонент STD.**

- Центрифугуйте флакон при 12000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований компонент HBV/STD з відповідним об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 15 хвилин при кімнатній температурі (15 °С (°C) < КТ < 25 °С (°C)).
- Перемішайте на вортексі, уникаючи утворення піни.
- Підготуйте 5 безнуклеазних флаконів для приготування стандартної кривої.
- Налаштуйте серійне розведення 1:10 у **Компоненті С** (вода MG), щоб отримати точки стандартної кривої, як описано в таблиці нижче:

Підготовка Стандартної кривої		
STD	Калібратор 200000 МО/мкл (IU/μl)	Об'єм Компонента С (MG вода) зазначений на етикетці флакона
STD 1	20000 МО/мкл (IU/μl)	10 мкл (μl) (STD) + 90 мкл (μl) Компонента С (MG вода)
STD 2	20002 МО/мкл (IU/μl)	10 мкл (μl) (STD) + 90 мкл (μl) Компонента С (MG вода)
STD 3	200 МО/мкл (IU/μl)	10 мкл (μl) (STD) + 90 мкл (μl) Компонента С (MG вода)
STD 4	20 МО/мкл (IU/μl)	10 мкл (μl) (STD) + 90 мкл (μl) Компонента С (MG вода)
STD 5	2 МО/мкл (IU/μl)	10 мкл (μl) (STD) + 90 мкл (μl) Компонента С (MG вода)

### Внутрішній контроль:

**Компонент І.С.**

- Центрифугуйте флакон при 12000 об/хв (rpm) протягом 1 хвилини.
- Обережно відкрийте кришку флакона, уникаючи дисперсії порошку.
- Однорідно розчиніть Ліофілізований компонент І.С. з об'ємом Компонента С (код: ALL/C), зазначеним на етикетці флакона.
- Тримайте його на столі принаймні 15 хвилин при кімнатній температурі (15 °С (°C) < КТ < 25 °С (°C)).
- Перемішайте на вортексі, уникаючи утворення піни.

## L. ПРИЛАДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В КОМБІНАЦІЇ З НАБОРОМ

1. **Мікропіпетки:** Повинні бути відкалібровані, щоб вносити коректний об'єм, необхідний для аналізу, а також повинно проводитися регулярне знезараження (побутовий спирт, 10% розчин відбілювача, дезінфікуючі засоби медичного призначення) тих частин, які можуть випадково контактувати зі зразком. Їх також слід регулярно обслуговувати, щоб показати точність 1% та правдивість +/- 5%. Також слід регулярно проводити дезактивацію розливів або залишків компонентів набору.
2. **Пристрій для екстракції:** Набір LUA-PCR.HBV.25 призначений для використання тільки в комбінації з набором QIAamp UltraSense virus, код 53706 (QIAGEN). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання, наданої виробником.
3. **Термоциклери в режимі реального часу:** Набір LUA-PCR.HBV.25 призначений для використання для поєднання з Термоциклерами реального часу ABI PRISM 7500, програмним забезпеченням SDS версії 1.3.1 (Applied Biosystems), MX3000P®, програмним забезпеченням MxPro версії 4.01 (Stratagene™). Кінцеві користувачі повинні суворо дотримуватися Інструкції з використання приладів, наданої виробниками.

## M. КОНТРОЛЬ ТА МАНІПУЛЯЦІЇ ДО ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

1. Перевірте термін придатності набору, надрукований на зовнішній етикетці коробки з набором. Не використовуйте, якщо термін придатності минув.
2. Переконайтеся, що рідкі компоненти не забруднені частинками або скупченнями, видимими неозброєним оком. Перевірте, чи на дні флаконів з ліофілізованими компонентами присутній добре сформований агрегат. Переконайтеся, що при транспортуванні не сталося поломки і не пролило рідини всередині коробки.
3. Розчиніть Ліофілізовані компоненти з відповідною кількістю Компонента С (MG вода), як зазначено на етикетці.
4. Увімкніть Термоциклер, перевірте налаштування та переконайтеся, що використовуєте правильний протокол аналізу.
5. Суворо дотримуйтесь посібника користувача, наданого виробниками, для правильного налаштування термоциклерів для визначення в режимі реального часу.
6. Перевірте, чи встановлені мікропіпетки на необхідний об'єм.
7. Перевірте, чи все інше обладнання доступне та готове до використання.
8. У разі виникнення проблем не продовжуйте тестування і повідомте про це керівника.

## N. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

Аналіз повинен проводитися відповідно до того, що повідомляється нижче.

### N.1 Екстракція вірусного ДНК

Крок екстракції геномної ДНК HBV має проводитися виключно в поєднанні з таким набором:

Матеріал	Опис	Код набору	Виробник
Плазма	QIAamp UltraSens virus®	53706	Qiagen™

1. Перш ніж почати, встановіть стільки пробірок, скільки є зразків для екстракції.
2. Додайте 500 мкл (μl) стерильного Фосфатного буферного розчину (PBS) у кожну пробірку.
3. Додайте 500 мкл (μl) зразка. Так, щоб загальний об'єм становив 1 мл (ml).
4. Додайте 10 мкл (μl) ALL/IC. IC додається на цьому кроці, щоб оцінити, чи правильно проведено екстракцію ДНК.
5. Виконайте процес екстракції, як зазначено в посібнику користувача.
6. Рекомендований об'єм елюювання становить 70 мкл (μl).
7. Виділення ДНК необхідно проводити відповідно до інструкцій виробника та всіх наших порад (див. Розділ Н).

У таблиці нижче ми підсумовуємо доаналітичний процес

Доаналітичний процес				
Код зразка	Об'єм PBS	Об'єм зразка	Об'єм ALL/IC	Загальний об'єм
Призначений визначений код	500 мкл (μl)	500 мкл (μl)	10 мкл (μl)	1010 мкл (μl)

ДНК, екстрагована зі зразка і не використана в аналізі, повинна зберігатися замороженою (-20...-80 °C (°C)).

### N.2 Постановка реакції

Набір **LUA-PCR.HBV.25** призначений для використання виключно в комбінації зі стандартом ABI PRISM 7500 (програмне забезпечення SDS версії 1.3.1, Applied Biosystems), Mx3000P® (програмне забезпечення MxPro версії 4.01, Stratagene™).

#### N.2.1 Підготовка ПЛР

**Важливо:** Приклад схеми розподілу наведено в Розділі О. Будь ласка, зверніться до нього перед початком операцій, описаних нижче.

- Підготуйте компоненти, як описано в Розділі І.
- Підготуйте необхідну кількість реакційних пробірок або 96-лунковий реакційний планшет для досліджуваних зразків та для Стандартної кривої (підготовленої, як описано в розділі І).

**Важлива примітка:** Використовуйте лише оптичні пробірки або мікропланшети, рекомендовані виробниками термоциклерів для визначення в режимі реального часу.

- Врахуйте, що зразки, якщо це можливо, повинні бути аналізовані в двох або трьох примірниках.
- Включіть принаймні 1 пробірку для NTC (негативний контроль).
- Приготуйте **Ампліфікаційну Суміш** для **Зразків, NTC та стандартної кривої**, як показано в таблиці нижче:

Таблиця 1 - Внутрішній контроль (I.C.) як Ампліфікаційний контроль

Підготовка Ампліфікаційної суміші			
Кількість реакцій		x1	x10
A	Майстер-Мікс	12.5 мкл (μl)	125 мкл (μl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (μl)	20 мкл (μl)
I.C.	Внутрішній контроль	0.5 мкл (μl)	5 мкл (μl)
Загальний об'єм		15 мкл (μl)	150 мкл (μl)

Таблиця 2 - Внутрішній контроль (I.C.) як Екстракційний та Ампліфікаційний контроль

#### Підготовка Ампліфікаційної суміші

Кількість реакцій		x1	x10
A	Майстер-Мікс	12.5 мкл (μl)	125 мкл (μl)
B	Праймери/Проби	2 мкл (μl)	20 мкл (μl)
I.C.	Внутрішній контроль	0.5 мкл (μl)	5 мкл (μl)
Загальний об'єм		15 мкл (μl)	150 мкл (μl)

У цьому випадку (табл. 2) внутрішній контроль (IC) включають у зразок перед екстракцією.

#### N.2.2 Процедура ампліфікації

- Додайте 15 мкл (μl) Ампліфікаційної суміші в кожну реакційну пробірку або лунку мікропланшета.
- Додайте 10 мкл (μl) **Зразків, NTC та стандартної кривої** до реакційних пробірок.
- Коротко центрифугуйте реакційні пробірки при 2000 об/хв (rpm).
- Не залишайте реакційні пробірки при кімнатній температурі (КТ) більше ніж на 30 хвилин і під впливом світла (накрийте пробірки).
- Щільно закрийте реакційні пробірки.
- Завантажте реакційні пробірки в Тримач Термоблоку Термоциклера для визначення в режимі реального часу.
- Після операцій налаштування, описаних у Розділі N3 (Програмування приладу), запустіть Термоциклер.

**Важлива примітка:** Ліофілізовані компоненти після розчинення в Компоненті С (MG вода) стабільні не більше 3 годин при зберіганні на льоду або при температурі 2-8 °C (°C).

Наприкінці робочого дня належним чином викиньте залишки матеріалу Точок розведення STD.

Невикористаний об'єм Компонента В, STD та I.C. можна аліквотувати та заморожувати при -20 °C (°C). Аліквоти **необхідно розморозити лише один раз** і використовувати, як зазначено в **Розділі E**.

#### N.3 Програмування приладу

Для програмування приладу зверніться до Інструкції з експлуатації приладу (вказівки щодо абсолютних кількісних показників), наданої виробниками.

**Важлива примітка:** Для Mx3000P встановіть «Налаштування підсилення фільтра»:

$$ROX = x1, FAM = x8, JOE = x1$$

#### N.3.1 Температурний профіль

Температурний профіль наведено в таблиці нижче:

Крок	Цикл	Температура	Час
1	1	50 °C (°C)	2 хвилини
1	1	95 °C (°C)	15 хвилин
2	45	95 °C (°C)	15 секунд
		60 °C (°C) (*)	1 хвилина

**ВАЖЛИВА ПРИМІТКА: (\*)** крок для збору даних у реальному часі.

**Попередження:** Зверніть увагу, щоб налаштувати Термоциклер для визначення в режимі реального часу з правильним Температурним Профілем, дотримуючись посібника користувача, наданого виробником приладу.

#### N.3.2 Вибір Детекторів

Дотримуючись інструкцій з експлуатації Термоциклерів для визначення в режимі реального часу (ABI 7500 та Mx3000P®), виберіть Детектори, зазначені в таблиці нижче:

Виявлення	Репортер	Гасник
HBV	FAM	Не присутній
Внутрішній Контроль (I.C.)	JOE	Не присутній
Пасивний Стандарт	ROX	Не присутній

## О. СХЕМА АНАЛІЗУ

Нижче наведено приклад схеми розподілу для Кількісного аналізу:

### Мікропланшет або пробірки

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

Легенда: NTC = Негативний Контроль; STD 1, 2, 3, 4 = Стандартна крива ДНК HBV, Зразок 1, 2 = Зразки, що оцінюються.

## Р. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

### Р.1 Налаштування перед початком аналізу

Перш ніж почати інтерпретацію даних:

- Встановіть «**Baseline/Початкові умови**» (рівень фонові флуоресценції), як зазначено нижче:

«Baseline/Початкові умови»	
ABI™ PRISM 7500 SDS	<b>Початкові умови вручну</b> Запуск циклера = 3 Кінець циклера = 10
MX3000P® (Stratagene™)	<b>Адаптивні початкові умови</b> <u>Важливе зауваження: Не використовуйте алгоритм Mx4000 v1.00 - v3.00</u>

- Встановіть вручну «**Threshold/Попіг**» флуоресценції FAM/JOE.

«Threshold/Попіг»	FAM	JOE
ABI™ PRISM 7500 SDS	0.15	0.1
MX3000P® (Stratagene™)	0.15	0.03

### Р.2 Аналіз даних

Перевірка на калібраторі STD 1 проводиться щоразу, коли використовується набір, щоб перевірити, чи відповідають його значення Ct очікуваному і зазначеному в таблиці нижче.

Перевірка FAM	ABI7500 SDS; Mx3000P
STD 1 (20000 МО/мкл (IU/μl))	19 ≤ Ct (Пороговий цикл) ≤ 22

Крім того, значення Нахилу і R<sup>2</sup> перевіряються, щоб перевірити якість виконання. Повинні бути виконані наступні вимоги.

Перевірка FAM	Вимоги
Нахил	-3.1 < Нахил < -3.9

Перевірка FAM	Вимоги
Ефективність	R <sup>2</sup> > 0.98

## Q. ІНТЕРПРЕТАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ТА УСУНЕННЯ НЕСПРАВНОСТЕЙ

Передбачається, що для кожного зразка флуоресценція FAM (позитивне/негативне значення Ct) і флуоресценція Внутрішнього Контролю JOE підтверджують виявлення HBV, як описано в таблиці нижче:

HBV FAM	Внутрішній Контроль JOE	Результат Аналізу
ЗРАЗОК ПОЗИТИВНИЙ	+	ВІРНО
ЗРАЗОК НЕГАТИВНИЙ	-	ВІРНО**
	Ct < 42	ВІРНО
	Ct > 42 або невизначено	НЕДІЙСНИЙ***

### ВАЖЛИВО:

(\*\*) Висока початкова концентрація ДНК HBV зразка (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу внутрішнього контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.

(\*\*\*) У цьому випадку проблеми можуть виникнути на етапі ампліфікації (неефективна ампліфікація або її відсутність) або під час етапу екстракції (наявність інгібіторів), що призводить до неправильного результату та хібнонегативних значень. Процедура тестування

необхідно повторити, використовуючи свіжий зразок, отриманий від пацієнта.

Для кожного позитивного зразка, виявленого з набором, код LUA-PCR.HBV.25, можна застосувати правильне кількісне визначення вірусного навантаження HBV, як зазначено в таблиці нижче:

ABI™ PRISM® 7500 SDS - STRATAGENE™ Mx3000P®	
<b>Дані запуску HBV (МО/мл (IU/μl))</b>	<b>Вірусне навантаження HBV (МО/мл (IU/ml))</b>
Кількість > 2.0E+07	Вірусне навантаження HBV > 2.0E+07
5.0E+01 ≤ Кількість ≤ 2.0E+07	<b>КІЛЬКІСНА ОЦІНКА</b>
Кількість < 5.0E+01	Вірусне навантаження HBV < 5.0E+01

\***ВАЖЛИВА ПРИМІТКА:** Для кількісного визначення зразків див. розділ В.

Результати, отримані з набором, код LUA-PCR.HBV.25, необхідно інтерпретувати з урахуванням клінічних симптомів та інших лабораторних параметрів, пов'язаних із станом пацієнта.

Можливі наступні результати:

### Таблиця усунення несправностей

	FAM	JOE	Результат	Перевірити
ЗРАЗОК невідомий	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Позитивний</i>	<b>ВАЖЛИВО:</b> Висока початкова концентрація ДНК HBV (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу Внутрішнього Контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.
ЗРАЗОК невідомий	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Інгібування, помилка в процедурі або не функціонування приладів	1. щоб компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення HBV і JOE для І.С. виявлення; 4. що аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки; 7. щоб процедура екстракції була виконана правильно, як зазначено в <b>Розділі N</b> .
ЗРАЗОК невідомий	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ <i>Негативний</i>	
STD	+	+/-	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	<b>ВАЖЛИВО:</b> Висока початкова концентрація ДНК HBV (позитивний сигнал FAM) може призвести до ЗНИЖЕНОГО або ВІДСУТНЬОГО флуоресцентного сигналу Внутрішнього Контролю І.С. за рахунок конкуренції реагентів.
STD	-	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення HBV і JOE для І.С. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався; 6. що потенційні інгібітори ПЛР не забруднили пробірки.
STD	-	+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Помилки в піпетуванні або в процедурі	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. що вибрані барвники для виявлення є FAM для виявлення HBV і JOE для І.С. виявлення; 4. що Аналіз було виконано з правильними налаштуваннями приладу; 5. що набір правильно зберігався.
NTC	-	+	КОРЕКТНИЙ РЕЗУЛЬТАТ	
NTC	+	+	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ: Забруднення	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки; 3. щоб робоче місце та інструменти знезаражували через регулярні проміжки часу; 4. що набір зберігався належним чином.
NTC	+	-	УВАГА! МОЖЛИВІСТЬ:	1. що компоненти були підготовлені правильно; 2. що в процедурі аналізу не було допущено жодної помилки;

			Забруднення	3. щоб робоче місце та інструменти знезаражували через регулярні проміжки часу; 4. що набір зберігався належним чином.
--	--	--	-------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Якщо результати тесту співпадають з **КОРЕКТНИМ РЕЗУЛЬТАТОМ**, зазначеним вище, перейдіть до наступного розділу.  
Якщо виникає одна чи інша проблема, описана у таблиці вище, після перевірки повідомте про будь-які залишкові проблеми керівнику для подальших дій.

## R. КІЛЬКІСНА ОЦІНКА

Калібратори STD розглядаються як очищені зразки, і той самий об'єм, 10 мкл (μl), використовується.

Для створення стандартної кривої слід використовувати всі п'ять стандартних калібраторів і визначити їх як стандартні з конкретною концентрацією.

Усі калібратори STD визначаються як МО/мкл (IU/μl).

Для розрахунку **початкової концентрації** зразків, що аналізуються, необхідно застосувати наступне рівняння:

$$\text{Результати (МО/мл (IU/ml))} = \frac{\text{Отриманий результат (МО/мкл (IU/μl))} \times \text{Об'єм елююваного зразка (мкл (μl))}}{\text{Об'єм зразка (мл (ml))}}$$

### Важлива примітка:

*\*Як зазначено в розділах H і N, початковий об'єм зразка становить 0.5 мл (ml).*

*\*\*Кількісну оцінку зразків можна повідомити як у МО/мл (IU/ml), так і в копіях/мл (ml). Коефіцієнт перетворення становить 2.5 (1 МО/мл (IU/ml) = 2.5 копій/мл (ml)).*

### Приклад:

Об'єм зразка, використаного для екстракції = 0.5 мл (ml)

Отриманий результат (МО/мкл (IU/μl)) = 20

Об'єм елюювання = 70 мкл (IU/μl)

$$\text{Результат (МО/мл (IU/ml))} = \frac{20 \text{ (МО/мкл (IU/μl))} \times 70 \text{ мкл (μl)}}{0.5 \text{ мл (ml)}}$$

**Результат (МО/мл (IU/ml)) = 2800**

**Результат (копії/мл (ml)) = Результат (МО/мл (IU/ml)) x 2/5 = 2800 x 2.5 = 7000**

### Важливі примітки:

1. *Інтерпретація результатів повинна проводитися під наглядом відповідального лабораторії, щоб зменшити ризик помилок у судженнях та невірних інтерпретацій.*
2. *Коли результати випробувань передаються з лабораторії до центру інформатики, необхідно звернути увагу, щоб уникнути помилкової передачі даних.*

## S. РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Оцінка продуктивності була проведена відповідно до того, що повідомляється у Загальних Технічних Специфікаціях або CTS (ст. 5, Розділ 3 Директиви IVD 98/79/EC).

Оцінку ефективності проводили в лабораторіях на матеріалах, наданих Fondazione Irccs Cà Granda-Ospedale Ospedale Maggiore Policlinico Milano Italy.

### S.1 АНАЛІТИЧНА ЧУТЛИВІСТЬ

Аналітична чутливість кількісного молекулярного методу відноситься до найменшої кількості цільового маркера, яку можна правильно виявити.

У контексті CTS це може бути виражено як: **межа виявлення** або **межа кількісної оцінки**:

**Межа виявлення (LOD):** Це найменша концентрація цільового значення, яку може виявити система із ймовірністю 95%.

У наборі з кодом LUA-PCR.HBV.25 **LOD** було визначено шляхом тестування серійного розведення стандартної кривої при граничній концентрації, яку готували в HBV-негативній плазмі.

Кожне розведення екстрагували та ампліфікували. Всього було перевірено 24 повтори для кожного з них у трьох різних запусках. Результати аналізували з програмою PriProbit версії 1.63 для отримання концентрації ДНК HBV, виявленої з ймовірністю 95%. Оскільки LUA-PCR.HBV.25 можна використовувати в комбінації з різними інструментами, ми визначаємо LOD для кожного з них. Дані наводяться нижче:

Межа виявлення (LOD)	
ABI™PRISM® 7500 SDS	10 МО/мл (IU/ml)
(Stratagene™) MX3000P®	30 МО/мл (IU/ml)

### S.1.1 Динамічний діапазон та Лінійність

**Межа кількісного визначення** була визначена шляхом вимірювання **Лінійності** або **Динамічного діапазону**.

**Лінійність** - це міра ступеня наближення кривої до прямої. Вона виражається значенням **SLOPE/НАХИЛ**.

**Динамічний діапазон** - це діапазон концентрацій стандартних точок, для яких кінцеве вихідне значення (пороговий цикл Ct) системи прямо пропорційне концентрації кожної точки.

Межами динамічного діапазону є нижня і верхня межі кількісного визначення (**Межа кількісного визначення**).

Для набору LUA-PCR.HBV.25 лінійність (аналітичне вимірювання) була визначена шляхом тестування в трьох повторюваннях різних концентрацій стандартної кривої в діапазоні від 2.0E+08 МО/мкл (IU/μl) до 6.24E-02 МО/мкл (IU/μl). Серію розведень було відкалібровано відповідно до 2-го міжнародного стандарту ВООЗ для Вірусу гепатиту В (код: 97/750). Дані для кожного інструменту вказані в таблиці 1:

Таблиця 1

Межа кількісного визначення (аналітичне вимірювання)		
прилад	верхня	нижня
ABI™PRISM® 7500 SDS	2.0+0.8 МО/мкл (IU/μl)	2.5E-0.1 МО/мкл (IU/μl)
(Stratagene™) MX3000P®	2.0+0.8 МО/мкл (IU/μl)	2.5E-0.1 МО/мкл (IU/μl)

Крім того, верхню та нижню межі кількісного визначення було визначено з урахуванням етапу очищення за допомогою набору QIAamp Ultrasense virus. Спочатку були підготовлені точки серійного розведення стандартної кривої в пулі зразка негативної плазми в діапазоні від 2.0E+07 МО/мл (IU/ml) до 5.0E+01 МО/мл (IU/ml), кожне розведення аналізували з двома партіями. По-друге, таким же чином ми проаналізували Панель кількісної оцінки ДНК HBV (Acrometrix).

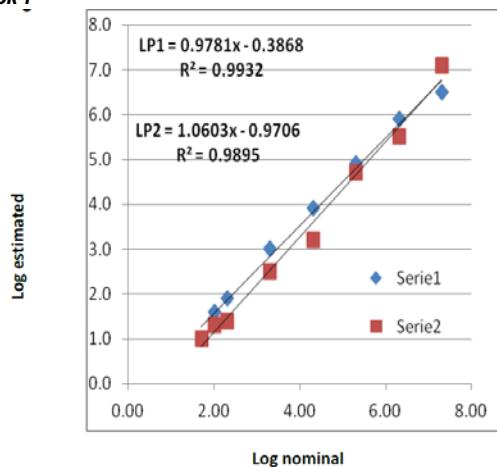
Межі кількісного визначення наведені в таблиці 2:

Таблиця 2

Межа кількісного визначення		
Прилад	Верхня межа	Нижня межа
ABI™PRISM® 7500 SDS (Stratagene™) MX3000P®	2.0+0.7 МО/мл (IU/ml)	5.0E+0.1 МО/мл (IU/ml)

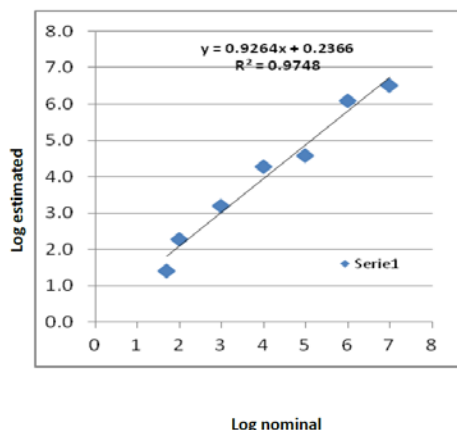
Наведений нижче Малюнок 1 стосується ABI 7500SDS та **стандартної кривої в зразку негативної плазми**:

Малюнок 1



Наведений нижче Малюнок 2 стосується Mx3000P та **панелі кількісної оцінки ДНК HBV (Acrometrix)**:

Малюнок 2



Коефіцієнт  $R^2$  показує хорошу кореляцію. Аналогічний результат був отриманий з іншим інструментом.

Верхня межа кількісного визначення для позитивних зразків становить  $7.3 \log (2.0+07 \text{ MO/мл (IU/ml)})$ , а нижня межа кількісного визначення становить  $1.69 \log (5.0+01 \text{ MO/мл (IU/ml)})$ .

### 5.2 АНАЛІТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ

Аналітична специфічність полягає у здатності методу виявляти та кількісно визначати тільки цільовий маркер.

Аналітичну специфічність аналізу ДНК HBV вивчали наступним чином:

1. Набір праймерів/проб було обрано, аналізуючи цільову послідовність геному за допомогою відповідного програмного забезпечення (Primer Express v.3.0 від Applied Biosystem Inc.).
2. Набір праймерів/проб і цільова послідовність геному контролюються програмним забезпеченням «BLAST», щоб перевірити, чи будь-яка з нуклеотидних послідовностей, депонованих у світових геномних банках, має гомологію з HBV, та програмним забезпеченням «ClustalX», щоб порівняти цільові послідовності геному різних генотипів HBV.
3. Специфічність була покращена шляхом підбору жорстких умов реакції.
4. Плазму пацієнтів, інфікованих мікроорганізмами, які потенційно інтерферують, були отримані з Fondazione Ircss Cà Granda-Ospedale Maggiore Policlinico Мілан - Італія та протестовані.

Результати представлені в наступній таблиці:

Кількість зразків	Організм	Результат
12	HIV	негативний
10	HCV	негативний
7	CMV	негативний
1	Ентеровірус	негативний
1	VZV	негативний
1	HH6	негативний
1	HSV1	негативний
1	HSV2	негативний
1	EBV	негативний

### 5.3 ДІАГНОСТИЧНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ТА ЧУТЛИВІСТЬ

#### 5.3.1 Діагностична специфічність

Діагностична специфічність - це ймовірність того, що пристрій дає негативний результат за відсутності цільового маркера. Отже, **справжній негативний** зразок - це зразок, який, як відомо, є негативним для цільового маркера та правильно класифікований пристроєм.

#### Негативні зразки HBV ДНК

СПРАВЖНІЙ НЕГАТИВНИЙ	100
ХИБНО ПОЗИТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	100
<b>СПЕЦИФІЧНІСТЬ %</b>	<b>100</b>

На основі отриманих результатів діагностична специфічність для **LUA-PCR.HBV.25** становить **100%**, так що система задовольняє критерії прийнятності ( $\geq 99.5\%$ ).

#### 5.3.2 Діагностична чутливість

**Діагностична чутливість** - це ймовірність того, що прилад дає позитивний результат при наявності цільового маркера. Отже, **справжній позитивний** зразок - це зразок, який, як відомо, є позитивним для цільового маркера і правильно класифікований пристроєм.

Для набору з кодом LUA-PCR.HBV.25 цей параметр вивчався шляхом дослідження зразків плазми, позитивних на ДНК HBV, наданих Fondazione Ircss Cà Granda-Ospedale Maggiore Policlinico Мілан - Італія, в тому ж запуску і тоді було розраховано відсоток (%) позитивних зразків.

Позитивні зразки дали позитивний результат за допомогою використовуваного набору **Abbott Real Time HBV**, в лабораторії, яка їх надала.

#### Позитивні зразки HBV ДНК

СПРАВЖНІЙ ПОЗИТИВНИЙ	100
ХИБНО НЕГАТИВНИЙ	0
ЗАГАЛЬНА КІЛЬКІСТЬ ЗРАЗКІВ	100
<b>ЧУТЛИВІСТЬ %</b>	<b>100</b>

Крім того, діагностичну чутливість аналізу було перевірено за допомогою Панелі QCMD (HBVDNA08, HBVDNA10A, HBVDNA11A) у двох примірниках у різних запусках. Отримані результати відповідали очікуванню.

На основі результатів отримана **Діагностична Чутливість системи була розрахована і становить 100%**.

<b>Діагностична Чутливість</b>	100%
<b>Діагностична Специфічність</b>	$\geq 99.5\%$

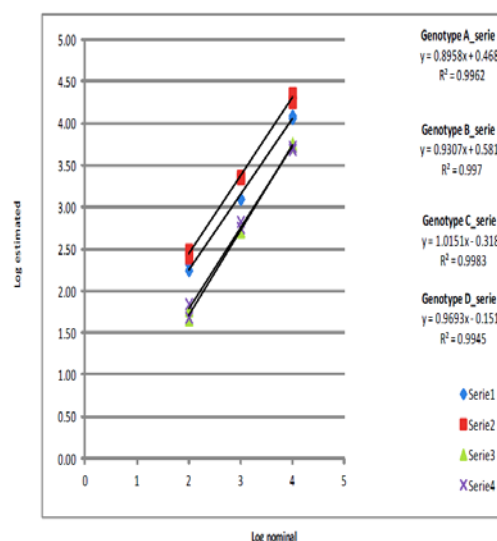
#### Т. ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНА ОЦІНКА ВІДПОВІДНОГО ГЕНОТИПУ HBV

Відповідно до CTS набір з кодом LUA-PCR.HBV.25 оцінили на ефективність виявлення генотипів та кількісного визначення. Для аналізу були протестовані генотипи, включені до Панелі генотипування QCMD 2010 (HBVGT10) і 2011 (HBVGT11).

Набір з кодом LUA-PCR.HBV.25 здатний виявити всі генотипи, включені в панель, крім **Генотипу Н** (він був виявлений з меншою ефективністю, ніж очікувалося).

Набір з кодом LUA-PCR.HBV.25 також був оцінений для розведення відповідних генотипів (A, B, C і D) від 10000 копій/мл (ml) (4000 MO/мл (IU/ml)) до 100 копій/мл(ml) (40 MO/мл (IU/ml)).

На графіку показано регресійний аналіз з результатами.



Як показано, коефіцієнт кореляції коливався від 0.994 до 0.998.

#### У. ТОЧНІСТЬ

Точність показує ступінь надійності системи. Кожній процедурі вимірювання властива випадкова зміна, яка називається «випадкова помилка». Випадкова помилка не має числового значення, але визначається дисперсією вимірювання як стандартне відхилення (DevST) і коефіцієнт варіації (CV%). Зазвичай точність аналізу відноситься до узгодження між повторними вимірюваннями одного і того ж матеріалу.

У наборі LUA-PCR.HBV.25 **точність** виражалася як варіабельність в межах аналізу та мінливість між аналізами. Були перевірені в одному запуску

(внутрішній аналіз) і в трьох різних запусках (між аналізами) усі 5 стандартних точок кривої у 8 повтореннях для кожного з них.

Потім розраховували варіабельність в межах і між аналізами.

За відсутності встановлених міжнародних параметрів в Європейській IVD Директиві CTS ми визначили наступне значення прийнятності для HBV ДНК:

**Коефіцієнт варіації в межах аналізу (CV%) ≤ 10%.**

**Коефіцієнт варіації між аналізами (CV%) ≤ 10%.**

#### V. ОБМЕЖЕННЯ

1. Тільки для діагностики in vitro.
2. Перед використанням цього набору рекомендується уважно прочитати та зрозуміти інструкцію.
3. Для отримання достовірних результатів тесту необхідно суворе дотримання протоколу.
4. Оптимальне виконання цього тесту вимагає відповідного збору зразків, зберігання, транспортування та поводження зі зразками та реагентами.
5. Згідно з нашими порадами, набір призначений для використання лише для зразків плазми.
6. Робоче середовище лабораторії, обладнання, прилади та реагенти повинні контролюватися відповідно до належної лабораторної практики, щоб уникнути забруднення на всіх етапах, починаючи від екстракції до ампліфікації. Низький рівень позитивного результату може виникнути внаслідок перехресного забруднення під час обробки зразка з високою кількістю копій ДНК. У будь-якому випадку відповідно до рекомендацій щодо лікування необхідно збільшити на 1 log, щоб вплинути на ведення пацієнта.
7. Крім того, рекомендації щодо лікування вимагають проведення двох послідовних вимірювань підвищених показників перед зміною режиму лікування пацієнта.
8. Дотримуйтесь робочого процесу, а саме, точного піпетування зразків/реагентів, так і відповідного налаштування приладу термоциклера.
9. Будьте обережні при введенні концентрації стандартів під час налаштування аналізу. Рекомендується виражати концентрації стандартів у МО/мкл (UI/μl), як зазначено в **Розділі I**.
10. Позитивний результат має великі медичні, соціальні, психологічні та економічні наслідки.
11. Рекомендується розглядати конфіденційність, відповідне консультування та медичну оцінку як суттєвий аспект послідовності тестування.

#### СИМВОЛИ

	Код продукту		Температура зберігання
	Прилад для діагностики in vitro		Дивіться інструкцію з використання
	Номер лоту		Виробник
	Термін придатності		Кількість тестів
 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