

## Nome del prodotto

Kit di rilevamento dell'acido nucleico per il virus dell'epatite B (PCR-Fluorescence Probing)

### Valutazione dell'imballaggio

24 test/kit, 48 test/kit, 96 test/kit

### Inteso Use

Questo kit viene utilizzato per rilevare quantitativamente il contenuto di acido nucleico del virus dell'epatite B (HBV) nei campioni clinici di siero umano e plasma umano. Viene utilizzato principalmente per valutare il livello di replicazione del virus nei pazienti con infezione da HBV, lo screening rapido dell'HBV e il monitoraggio della diagnosi clinica e del trattamento. Gli operatori sperimentali dovrebbero aver ricevuto una formazione professionale in amplificazione genica o in biologia molecolare dei metodi e possedere qualifiche operative sperimentali pertinenti. Il laboratorio dovrebbe avere ragionevoli precauzioni di sicurezza biologica e procedure protettive. I risultati delle prove di questo reagente non devono essere utilizzati come unico indicatore per la valutazione delle condizioni del paziente e la condizione deve essere analizzata in modo completo in combinazione con le manifestazioni cliniche del paziente e altri test di laboratorio.

### Principio di prova

Questo kit basato sulla tecnologia di fluorescenza PCR in tempo reale, i primer specifici e le corrispondenti sonde fluorescenti sono destinati al genoma dell'HBV sono progettati per un rilevamento altamente specifico. Rilevando i cambiamenti dei segnali fluorescenti, è possibile rilevare l'HBV dal siero o dal campione di plasma.

### Componenti principali

Elementi	Nome	Spec. ( 24 test / kit)	Spec. ( 48 test/ kit)	Spec. ( 96 test/ kit)	Costituenti
Kit di amplificazione PCR	PCR Buffer	800µL×1 Tubo	1.6mL ×1 Tubo	1.6mL ×2 Tubo	Primers, Probes, dNTPs
	Polimerasi Mix	60µL×1 Tubo	120µL×1 Tubo	240µL×1 Tubo	DNA polimerasi, UDG
Controllo qualità	Controllo Positivo	300µL×1 Tubo	600µL×1 Tubo	1200µL×1 Tubo	Frammento del gene Target
	Controllo Negativo	300µL×1 Tubo	600µL×1 Tubo	1200µL×1 Tubo	soluzione salina
Calibratori	Riferimento quantitativo 1 2×10 <sup>6</sup> UI/mL	300µL×1 Tubo	600µL×1 Tubo	1200µL×1 Tubo	Frammento del gene Target
	Riferimento quantitativo 2 2×10 <sup>5</sup> UI/ml	300µL×1 Tubo	600µL×1 Tubo	1200µL×1 Tubo	Frammento del gene Target
	Riferimento quantitativo 3 2×10 <sup>4</sup> UI/mL	300µL×1 Tubo	600µL×1 Tubo	1200µL×1 Tubo	Frammento del gene Target
	Riferimento quantitativo 4 2×10 <sup>3</sup> UI/ml	300µL×1 Tubo	600µL×1 Tubo	1200µL×1 Tubo	Frammento del gene Target

### Note:

I componenti di lotti diversi non devono essere miscelati.

Il materiale è necessario ma non fornisce: tubo fluorescente PCR speciale a parete sottile, si consiglia di utilizzare i prodotti pertinenti di Axygen, selezionare i materiali di consumo corrispondenti in base all'uso dello strumento.

### Condizioni di conservazione e validità

Il kit deve essere conservato alla temperatura -20±5°C in buio ed evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti (in caso di congelamento e scongelamento, non devono superare le 4 volte), con un periodo di validità di 12 mesi. Può essere conservato a 2 ~ 8 ° C dopo l'apertura del coperchio, con un periodo di validità di 30 giorni. Il kit deve essere trasportato in una ghiacciaia.

### Strumenti applicabili

Singuway Singu 9600, Singuway Singu 9600 pro, Bio-Rad CFX96, ABI 7500, TianLong Gentier 96E.

### Requisito del campione

#### 1. Raccolta dei campioni

Questo kit è adatto per campioni di siero o plasma. Quando si raccolgono campioni di siero, prelevare il sangue venoso del soggetto, prelevare 2 ml con un ago per iniezione sterile, raccogliarlo in un tubo centrifugo sterile, lasciarlo a 2 ~ 30 ° C per non più di 4 ore, centrifugare a 1600 g per 20 minuti, aspirare il siero (non aspirare i globuli rossi) e trasferirlo in un'altra provetta di centrifuga sterile per l'uso; quando si raccolgono campioni di plasma, utilizzare un ago per iniezione sterile per raccogliere 2 ml di sangue venoso in una provetta di centrifuga contenente EDTA come anticoagulante (l'anticoagulante eparina non è disponibile) e posizionarlo a 2 ~ 30 ° C per non più di 4 ore. Centrifugare a 1600 g per 20 minuti a 2 ~ 30 ° C e trasferire il plasma separato in un tubo di centrifuga sterile per l'uso.

#### 2. Conservazione del campione

I campioni per il rilevamento devono essere conservati nelle seguenti condizioni: meno di 24 ore a 2 ~ 8 ° C, meno di 1 mese a -20 ± 5 ° C. E il congelamento e lo scongelamento ripetuti devono essere evitati (il congelamento e lo scongelamento non devono superare 3 volte).

#### 3. Trasportazione

Per il trasporto dei campioni deve essere utilizzata una scatola di trasferimento del ghiaccio.

## Metodo di prova

1. Estrazione di acido nucleico (nell'area di elaborazione del campione del laboratorio)

1.1 Sconsiglia di utilizzare il kit di estrazione dell'acido nucleico virale, la colonna centrifuga o il metodo del tallone magnetico di SINGUWAY BIOTECH INC. L'acido nucleico è stato estratto da circa 300µL di campione riferito alle istruzioni del kit di estrazione dell'acido nucleico.

1.2 Il controllo positivo, il controllo negativo e il riferimento quantitativo 1~4 sono stati estratti contemporaneamente ai campioni da testare.

2. Preparazione del reagente PCR (nell'area di preparazione del reagente)

2.1 Preparare la soluzione di reazione PCR secondo la seguente composizione ("n" è il numero di reazioni necessarie): aggiungere **32,5µL×n PCR Buffer and 2,5µL×n Polimerasi Mix** in un nuovo tubo e mescolare bene.

(Note: assicurarsi che il buffer PCR sia completamente disciolto prima dell'uso, e che la soluzione di reazione PCR debba essere centrifugata prima dell'uso per

assicurarsi che tutto il liquido sia affondato sul fondo)

2.2 Miscelare nuovamente la soluzione di reazione PCR preparata nella fase precedente, quindi imballare **separatamente 35µL/tubo** nel tubo di reazione PCR. Transfer il tubo di reazione contenente la soluzione di reazione PCR all'area di elaborazione del campione.

3. Aggiungo campioni (nell'area di elaborazione del campione)

25µL dei campioni trattati, controllo negativo estratto, controllo positivo e riferimento quantitativo 1 ~ 4 sono stati rispettivamente aggiunti al tubo di reazione PCR contenente la soluzione di reazione PCR. Coprire il cappuccio, mescolare bene ed eseguire una breve rotazione per consentire alla soluzione di reazione di affondare sul fondo del tubo (Figura 1).

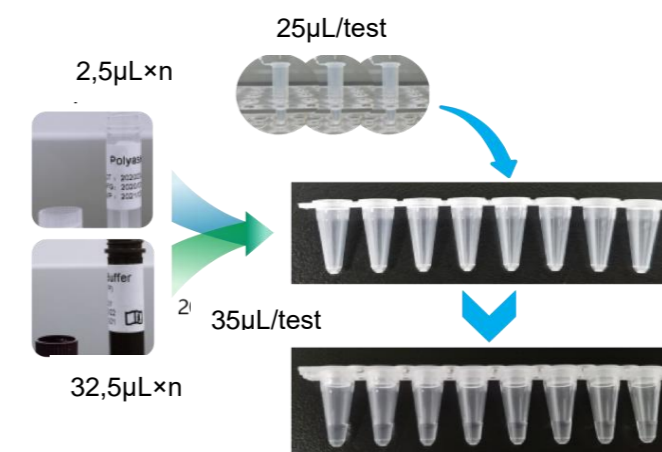


Figure1. Schema schematico del funzionamento sperimentale.

4. Amplificazione PCR (nell'area di prova di amplificazione)

4.1 Caricare il tubo di reazione PCR in uno strumento PCR a tempo reale per l'amplificazione.

4.2 Configurazione del programma di amplificazione:

Passo	Ciclo	Temperatura (°C)	Tempo(min:sec)	Raccogli il segnale di fluorescenza
1	1	50	2:00	No
2	1	95	0:30	No
3	45	95	0:05	No
		60	0:30*	Sì

\*: Impostato su 32 secondi su ABI7500.

Selezione del canale di rilevamento dello strumento:

Channel	FAM	ESAGONALE/VIC
Signal	HBV	IC

4.3 Impostazione del campione: inserire il nome e il tipo di ciascun campione nella finestra di impostazione del campione corrispondente del software dello strumento. Il riferimento quantitativo HBV è impostato su: "Standard" e inserire i parametri indicati nel kit. I campioni di prova e i controlli sono impostati su "Sconosciuto" o "Campione".

#### 5. Standard QC

5.1 HBV quantitative reference 1~4: Tutti i tests sono positivi, e il coefficiente di correlazione della curva standard  $R^2 \geq 0.98$ .

5.2 Controllo negativo: se il canale FAM non ha una curva di crescita logaritmica significativa (HBV DNA dovrebbe essere 0,0 UI/mL), mentre il canale HEX/VIC è positivo e  $Ct \leq 37$ .

5.3 Controllo positivo: il risultato del canale FAM è positivo e  $Ct \leq 37$ .

5.4 Gli elementi di cui sopra devono essere soddisfatti contemporaneamente in un esperimento, altrimenti questo esperimento non è valido e l'esperimento deve essere ripetuto.

#### 6. Analisi dei risultati

6.1 Dopo l'esperimento, analizzare secondo il software degli strumenti correlati, regolare la tolleranza al rumore al di sopra del rumore di base.

6.2 Il principio di impostazione della soglia è che la linea di soglia supera di poco il punto più alto della normale curva di controllo negativa (linea di rumore irregolare), 6-15 aree di circolazione sono state generalmente selezionate per la linea di base.

6.3 Registrare il valore Ct del campione e le concentrazioni di HBV DNA calcolate mediante l'analisi automatica dello strumento.

#### Valore di cut-off (CO) o intervallo di riferimento

La soglia di riferimento Ct value di questo kit è pari a 37.

#### Giudizio dei risultati

1. Determinazione dell'HBV nel risultato negativo:

Se il canale FAM non ha una curva di crescita logaritmica significativa (HBV DNA dovrebbe essere 0,0 UI/mL), mentre il canale HEX/VIC è positivo e Ct ≤ 37, il risultato è HBV negativo (-).

2. Determinazione dei risultati positivi dell'HBV:

Se il canale FAM ha una curva di crescita logaritmica e il valore Ct è ≤ 37, il risultato ha determinato che l'HBV è positivo e i risultati quantitativi sono stati analizzati automaticamente dal software.

3. Area grigia sperimentale:

Se il canale FAM ha una curva di crescita logaritmica e un valore 37 < Ct < 45, il risultato viene determinato come situato nell'area grigia sperimentale e il campione deve essere sottoposto a un nuovo test. Se c'è un'evidente curva di crescita logaritmica nel risultato del nuovo test, il risultato può essere giudicato positivo; se non esiste una curva di crescita logaritmica evidente, il risultato è negativo.

4. Le operazioni di "retest" menzionate nei passaggi 3 sono le seguenti:

Si raccomanda di concentrare il campione: prelevare 1 ml di campione ben miscelato; centrifuga 12000rpm per 5min a 4°C; rimuovere con cura il surnatante e lasciare circa 300µL di strato inferiore come campione. Quindi eseguire l'estrazione e l'amplificazione come il campione generale.

#### Interpretazione dei risultati dei test

1. Se i risultati del test soddisfano i criteri per i risultati negativi, il formato del rapporto è: il campione non rileva HBV DNA e la concentrazione è inferiore alla sensibilità del kit.

2. Se i risultati del test soddisfano i criteri per i risultati positivi, il formato del rapporto è: HBV DNA viene rilevato nel campione e i valori rilevati sono descritti nei seguenti modi:

a. Quando il risultato quantitativo è compreso tra 20 UI/mL e 2×10<sup>9</sup> UI/mL, comunicare direttamente il risultato quantitativo;

b. Quando il risultato quantitativo è 10 UI/MI < HBV DSU < 20 UI/mL, indica che la carica virale è bassa. Questo valore è solo di riferimento e il valore corrispondente può essere segnalato. Si consiglia di tracciare attentamente questo campione.

c. Quando il risultato quantitativo è > 2×10<sup>9</sup> UI/mL, il valore corrispondente può essere riportato in base al valore misurato effettivo, oppure il campione può essere diluito con plasma umano normale nell'intervallo lineare della rilevazione quantitativa di questo kit e quindi ri-misurato.

#### Limitazioni del metodo di test

1. Possibilità di analisi dei risultati falsi negativi.

1.1 Lacorretta raccolta, trasporto ed elaborazione dei campioni o goccioline di virus troppo basse nei campioni possono causare risultati falsi negativi.

1.2 Sebbene nella progettazione del kit vengano selezionati frammenti relativamente conservativi per l'amplificazione e il rilevamento, esiste la possibilità di una mutazione parziale dei geni patogeni. Sebbene la probabilità di mutazione della regione conservata selezionata per l'amplificazione e il rilevamento sia molto piccola, teoricamente non può essere completamente evitata.

1.3 Altri fattori non verificati.

2. Se la contaminazione incrociata non è stata ben controllata durante la raccolta, il trasporto e la lavorazione dei campioni, possono verificarsi risultati falsi positivi.

#### Indice di performance del prodotto

Questo kit rileva i "Materiali di riferimento nazionali per HBV DNA" del China National Institute for Food and Drug Control, secondo i seguenti requisiti prestazionali:

1. Tasso di conformità di riferimento negativo: non si verifica alcuna reazione positiva e il tasso di conformità negativo (-/-) è 8/8.

2. Tasso di conformità di riferimento positivo: non si verifica alcuna reazione negativa e il tasso di conformità positiva (+/+) è 9/9.

3. Limite minimo di rilevamento (sensibilità di analisi):

La sensibilità al saggio di questo reagente era di 10 UI/mL.

4. Accuratezza quantitativa: la sostanza quantitativa di riferimento è diluita a 1,0×10<sup>4</sup>UI/mL, 1,0×10<sup>3</sup>UI/mL, 5,0× 10<sup>2</sup>UI/mL, e i campioni di ciascun livello sono testati in tre repliche e la deviazione assoluta dei risultati della prova (UI/mL) inferiore a 0,5.

5. Linearità: L'intervallo lineare quantitativo di questo kit è 20 UI / mL ~ 2×10<sup>9</sup> UI / mL. Il coefficiente di correlazione lineare (valore R) è superiore a 0,980.

6. Precisione: diluire il materiale di riferimento della sensibilità a 1,0×10<sup>4</sup>UI/mL, 1,0×10<sup>3</sup>UI/mL, completare 10 test di replica per entrambi i livelli di campioni e il coefficiente di variazione (valore CV del logaritmo del risultato quantitativo) dei risultati del test (UI/mL) a entrambi i livelli è inferiore al 5,0 %.

7. Specificità:

a. Creazione di cross: il kit non ha amplificazione non specifica per campioni di HAV, HCV, HIV, HDV, TTV, CT, UU, NG, HSV, HCMV, HPV e TB.

b. Interferenza: bilirubina, emoglobina libera e trigliceridi non hanno interferito con i risultati dei test; Interferone, lamivudina, adefovir ed entecavirid non interferiscono con i risultati del test.

#### Avviso

1. Questo prodotto viene utilizzato solo per la diagnosi in vitro, si prega di leggere attentamente questo manuale prima dell'uso.

2. Al fine di evitare qualsiasi potenziale pericolo biologico nel campione, il campione in esame è considerato una sostanza infettiva per evitare il contatto con la pelle e le mucose; si raccomanda di utilizzare il campione nell'armadio di biosicurezza che può impedire il deflusso della nebbia d'aria e il funzionamento e il trattamento del campione devono soddisfare i requisiti delle leggi e delle norme pertinenti.

3. La sostanza di controllo positiva del kit è l'acido nucleico sintetico artificiale che non ha potenziale infettività; Sebbene abbia superato i test di HBs-Ag, HBV1 / 2-Ab, HCV-Ab e altri articoli, fino ad ora, non esiste un test in grado di garantire la sicurezza assoluta, quindi i componenti di cui sopra

devono essere trattati come sostanza infettiva durante l'operazione.

4. Gli operatori sperimentali devono aver ricevuto la formazione professionale di amplificazione genica o di individuazione di metodi biologici molecolari e possedere la pertinente qualifica di funzionamento sperimentale. Il laboratorio è dotato di adeguati impianti di prevenzione della biosicurezza e procedure di protezione e la gestione del laboratorio deve essere effettuata in stretta conformità con le specifiche di gestione dei pertinenti laboratori nazionali di biologia molecolare e dei laboratori clinici di amplificazione genica. Il processo sperimentale deve essere effettuato in diversi settori quali l'area di preparazione dei reagenti, l'area di preparazione dei campioni, l'area di amplificazione e l'area di analisi del prodotto. In ogni fase dell'operazione sperimentale devono essere utilizzati strumenti e attrezzature speciali e le forniture in ciascuna fase di ciascuna zona non devono essere utilizzate in modo intercambiabile. Devono essere stabiliti requisiti rigorosi per il flusso di personale e il flusso d'aria in ciascuna sezione al fine di evitare la massima contaminazione incrociata. I materiali di consumo, come il tubo centrifugo, la testa di aspirazione, ecc. per l'esperimento devono essere adeguate procedure di pulizia e controllo qualità per evitare la contaminazione da RNase e DNase o l'amplificazione di inibitori reattivi con risultati falsi negativi.

5. Ogni componente del kit deve essere conservato completamente fuso e scosso prima dell'uso, ma è necessario evitare ripetuti congelamenti-scongelamenti. Il reagente nel tubo della centrifuga deve essere centrifugato per alcuni secondi prima dell'uso.



















6. Dopo aver completato l'estrazione dell'acido nucleico del campione, si consiglia di condurre immediatamente l'esperimento successivo. In caso contrario, conservare il campione a -20±5°C e completare il test entro una settimana. I prodotti di pirolisi del campione conservati a -20±5 °C devono essere scongelati a 2 ~ 30 °C prima dell'aggiunta del campione e utilizzati dopo una centrifugazione di breve durata.

7. Quando i reagenti sono confezionati separatamente, le bolle devono essere evitate per quanto possibile. Prima di caricare, si prega di prestare attenzione a verificare se il coperchio di ciascun tubo di reazione è stretto, in modo da evitare perdite di sostanze fluorescenti e contaminazione dello strumento.

8. Dopo l'esperimento, 50ppm ~ 2000ppm ipoclorito di sodio o alcool al 75% e lampada a raggi ultravioletti sono necessari per trattare il tavolo e la pipetta.

9. I rifiuti sanitari generati nel test devono essere trattati in conformità con le normative locali.

#### Simboli

Etichetta	Istruzione	Etichetta	Istruzione	Etichetta	Istruzione
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Cautela		Numero di catalogo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Non riutilizzare		Codice lotto
	Rischi biologici		Conservare asciutto		Data di fabbricazione
	Oggetti fragili, maneggiare con cura		Fabbricante		Data di scadenza
	Ascensionale		Contiene un numero sufficiente per i test <n>		Non utilizzare se la confezione è danneggiata
	Limite di impilamento per numero		Limite di temperatura		Ombreggiamento

#### Informazioni di base

Produttore: SINGUWAY BIOTECH INC.

Aggiungi: B1302, Life Science Park, Shen Cheng Tou Innovation Factory, Julongshan A Road, Xiuxin Community, Kengzi Street, Pingshan

District, Shenzhen City, 518122 Guangdong, P.R. Cina

Tel.: +86-755-23704711 Web: www.singuway.com

#### Data di approvazione e data di modifica del disciplinare

Maggio 10, 2022