NAMANGAN DAVLAT UNIVERSITETI
ILMIY AXBOROTNOMASI, [2026-8]
ISSN:2181-1458
ISSN:2181-0427

03.00.00-BIOLOGIYA
journal.namdu.uz
BIOLOGICAL

UO‘ K: 578.891:577.21:616.36-002.2

HBV INFEKSIYASINING REAL VAQT PZR DIAGNOSTIKASIDA PLAZMIDAGA ASOSLANGAN EKZOGEN ICHKI NAZORATNI TANLASH VA BAHOLASH

O.B.Alimuhamedova
Kichik ilmiy xodim, O‘ zR FA S.Yu.Yunusov nomidagi O‘ simlik moddalari kimyosi instituti, Toshkent, O‘ zbekiston. E-mail: orzugulalimuhamedova@gmail.com; ORCID: 0009-0002-8152-4836
J.M.Abduraxmonov
PhD, katta ilmiy xodim, O‘ zR FA S.Yu.Yunusov nomidagi O‘ simlik moddalari kimyosi instituti, Toshkent, O‘ zbekiston. E-mail: jaloliddin0919@mail.ru; ORCID: 0000-0002-3954-3251
A.B.Baymirzayev
kichik ilmiy xodim, O‘ zR FA S.Yu.Yunusov nomidagi O‘ simlik moddalari kimyosi instituti, Toshkent, O‘ zbekiston. E-mail: asadali.baymirzaev@gmail.com; ORCID: 0009-0009-1291-7522
S.A.Ikramov
PhD, katta ilmiy xodim, O‘ zR FA S.Yu.Yunusov nomidagi O‘ simlik moddalari kimyosi instituti, Toshkent, O‘ zbekiston. E-mail: kramovss@gmail.com; ORCID: 0000-0001-6504-1936
E.G.Yusupova
k.f.d., katta ilmiy xodim, O‘ zR FA S.Yu.Yunusov nomidagi O‘ simlik moddalari kimyosi instituti, Toshkent, O‘ zbekiston. E-mail: kofeechek@rambler.ru; ORCID: 0009-0005-5427-4570
Sh.S.Azimova
b.f.d., professor, O‘ zR FA S.Yu.Yunusov nomidagi O‘ simlik moddalari kimyosi instituti, Toshkent, O‘ zbekiston. E-mail: genlab_icps@yahoo.com; ORCID: 0000-0003-1803-7728
mukotaba uchun mas’ul muallif.

Annotatsiya: *Gepatit B virusi (HBV) DNKsini real vaqt polimeraza zanjir reaksiyasi (PZR) yordamida aniqlashda natijaning ishonchliligi butun preanalitik zanjirga bog‘ liq: nuklein kislotalarning ekstraksiya jarayonida yo‘ qolishi yoki reaksiyaning ingibirlanishi, ayniqsa past virus yuklamasida, yolg‘ on manfiy xulosaga olib kelishi mumkin. Ishning maqsadi — dupleks real vaqt PZR tizimi uchun plazmidaga asoslangan ekzogen ichki nazoratni (IN) tanlash, uning ishchi darajasini absolyut nusxa soniga keltirish va analitik parametrlarga ta’sirini baholash. HBV markerlari bo‘ yicha manfiy sog‘ lom donorlar (n = 10) va HBV infeksiyasi tasdiqlangan bemorlar (n = 350) plazmasi namunalari tahlil qilindi. IN sifatida Saccharomyces cerevisiae α-factor prepro sekretor signal hududidan kelib chiqqan geterologik ketma-ketlikni saqlovchi rekombinant pPICZα-asosli plazmida qo‘ llanildi; u lizis eritmasi qo‘ shilganidan so‘ ng, ekstraksiyadan oldin kiritilib, klinik DNK bilan birga «SOREX-DNA» to‘ plami yordamida ajratib olindi. HBV mahsuloti FAM, IN mahsuloti JOE kanalida QuantStudio 5 platformasida qayd etildi. IN ning ishchi darajasi taxminan 100 nusxa/reaksiyani tashkil etdi; valid klinik ekstraktlarda uning o‘ rtacha Cq qiymati 29,0 ± 0,4 (diapazon 28,1–29,8), validlik ko‘ rsatkichi esa 355/360 (98,6%) bo‘ ldi. HBV uchun aniqlash chegarasi IN bilan ham, INsiz ham 5,15 nusxa/reaksiya (≈ 257,5 nusxa/ml) darajasida saqlanib qoldi (ΔCq = 0,12 ± 0,08; p > 0,05). Yuqori virus yuklamasida (10^8 MB/ml) IN signali 1,1–1,8 siklga kechikdi, biroq bu HBV ning miqdoriy hisob-kitobiga ta’sir ko‘ rsatmadi. Shunday qilib, ekstraksiyadan oldin kiritilgan geterologik plazmida IN, nusxa soni to‘ g‘ ri tanlanganda, jarayon darajasidagi sifat nazoratini ta’minlaydi va asosiy nishonning analitik sezgirligini pasaytirmaydi.*

Kalit so‘ zlar: gepatit B virusi, HBV DNK, real vaqt PZR, qPCR, ichki nazorat, ekzogen nazorat, plazmida, PZR ingibitsiyasi, nuklein kislota ekstraksiyasi, molekulyar diagnostika.

ВЫБОР И ОЦЕНКА ЭКЗОГЕННОГО ВНУТРЕННЕГО КОНТРОЛЯ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМИДЫ ДЛЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ HBV В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Аннотация: *Надёжность выявления ДНК вируса гепатита B (HBV) методом ПЦР в реальном времени определяется всей преаналитической цепочкой, а не только стадией амплификации: потери нуклеиновых кислот при экстракции и ингибирование реакции могут приводить к ложноотрицательным результатам, особенно при низкой вирусной нагрузке. Целью работы был подбор и оценка экзогенного внутреннего контроля (ВК) на основе плазмиды для*

дуплексной ПЦР-системы реального времени, предназначенной для выявления ДНК HBV. Исследованы образцы плазмы здоровых доноров, отрицательных по маркёрам HBV (n = 10), и пациентов с клинически и серологически подтверждённой HBV-инфекцией (n = 350). В качестве ВК использована рекомбинантная плазмида на основе pPICZα, несущая гетерологичную последовательность из области препро-секреторного сигнала α-фактора Saccharomyces cerevisiae; ВК вносили в каждый образец сразу после добавления лизирующего буфера, до стадии экстракции, и выделяли совместно с клинической ДНК с помощью сорбционного набора «SOREX-DNA» . Продукт HBV регистрировали по каналу FAM, ВК — по каналу JOE на платформе QuantStudio 5. Перевод рабочего разведения в абсолютные единицы дал уровень ВК около 100 копий на реакцию. В валидных клинических экстрактах среднее значение Cq для ВК составило 29.0 ± 0.4 (диапазон 28.1–29.8), доля валидных сигналов ВК — 355/360 (98,6%). Предел обнаружения HBV сохранялся на уровне 5,15 копий/реакцию (≈ 257,5 копий/мл) как с ВК, так и без него; различие Cq при низкоположительных концентрациях было статистически незначимым (ΔCq = 0.12 ± 0.08; p > 0.05). При высокой вирусной нагрузке (10^8 МЕ/мл) Cq для ВК запаздывал на 1.1–1.8 цикла без ущерба для количественной оценки HBV и чувствительности канала FAM.

Ключевые слова: *вирус гепатита В, ДНК HBV, ПЦР в реальном времени, qPCR, внутренний контроль, экзогенный контроль, плазмида, ингибирование ПЦР, экстракция нуклеиновых кислот, молекулярная диагностика.*

SELECTION AND EVALUATION OF A PLASMID-BASED EXOGENOUS INTERNAL CONTROL FOR REAL-TIME PCR DIAGNOSIS OF HBV INFECTION

Annotation: *Reliable detection of hepatitis B virus (HBV) DNA by real-time PCR depends on the entire pre-analytical chain: nucleic acid loss during extraction or reaction inhibition may produce false-negative results, particularly at low viral loads. This study aimed to select a plasmid-based exogenous internal control (IC) for a duplex real-time PCR assay detecting HBV DNA and to convert its working level into absolute copy numbers. Plasma samples from HBV-negative healthy donors (n = 10) and from patients with confirmed HBV infection (n = 350) were analysed. A recombinant pPICZα-based plasmid carrying a heterologous sequence derived from the Saccharomyces cerevisiae α-factor prepro secretory signal region was added to each sample immediately after the lysis solution, before extraction, and co-extracted with clinical DNA using the silica-sorption «SOREX-DNA» kit. HBV product was recorded in the FAM channel and the IC in the JOE channel on a QuantStudio 5 platform. The IC input was approximately 100 copies per reaction; in valid extracts the mean IC Cq was 29.0 ± 0.4 (range 28.1–29.8) and IC validity reached 355/360 (98.6%). The HBV limit of detection remained 5.15 copies/reaction (≈ 257.5 copies/mL) both with and without the IC (ΔCq = 0.12 ± 0.08; p > 0.05). At high viral loads (10^8 IU/mL) the IC Cq was delayed by 1.1–1.8 cycles without compromising HBV quantification. A heterologous plasmid IC added before extraction therefore provides process-level quality control without degrading analytical sensitivity.*

Key words: *hepatitis B virus, HBV DNA, real-time PCR, qPCR, internal control, exogenous control, plasmid, PCR inhibition, nucleic acid extraction, molecular diagnostics.*

Kirish

Molekulyar diagnostikada natijaning ishonchliligi ko‘ pincha amplifikatsiya bosqichining texnik sifati bilan tenglashtiriladi. Amalda esa yolg‘ on manfiy xulosaning asosiy manbalari analitik zanjirning undan oldingi bo‘ g‘ inlarida — namunani saqlash, lizis, sorbsiya va elyusiya bosqichlarida — shakllanadi. Nuklein kislotalarning qisman yo‘ qolishi yoki ajratib olish reagentlarining reaksiya aralashmasiga o‘ tishi ko‘ p hollarda hech qanday tashqi belgi bermaydi: reaksiya rasman «bajarilgan», ammo nishon signali yo‘ q. Aynan shu holat diagnostik xatoning eng xavfli ko‘ rinishidir.

Gepatit B virusi infeksiyasi bunday xatoning oqibatlari ayniqsa og‘ ir bo‘ ladigan sohalardan biridir. Jahon sog‘ liqni saqlash tashkilotining baholashiga ko‘ ra, 2022 yil holatiga dunyo bo‘ yicha 254 million kishi surunkali HBV infeksiyasi bilan yashagan; virusli gepatitlar sababli o‘ lim 2019-yildagi 1,1 milliondan 2022-yilda 1,3 millionga ko‘ tarilgan va bu o‘ limlarning 83% i aynan gepatit B hissasiga to‘ g‘ ri keladi [1, 2]. HBV DNK yuklamasi davolashni boshlash to‘ g‘ risidagi qarorda, terapiya samaradorligini kuzatishda va transmissiya xavfini baholashda markaziy laborator marker hisoblanadi [1, 3]. O‘ zbekiston tarixan HBV bo‘ yicha endemik mamlakat hisoblanadi: 2016 yil uchun surunkali HBV (HBsAg-musbat) tarqalishi 8,3% — taxminan 2,5 million kishi deb baholangan, ammo ularning atigi ~10% i tashxis olgan [15]. 2022–2024 yillarda o‘ tkazilgan milliy skrining doirasida bir milliondan ortiq kishi tekshirilib, umumiy HBsAg tarqalishi 2,89% ni tashkil etgan; vaksinatsiya dasturi qamrab olgan tug‘ ilish kogortalarida ko‘ rsatkich sezilarli pasaygan [16]. Donor qonini skrining qilishda esa bitta aniqlanmagan musbat namuna transfuziya orqali yuqish xavfini yuzaga keltiradi.

Ushbu muammoning uslubiy yechimi — namuna ichiga kiritiladigan ichki nazorat (IN). Agar nazorat ekstraksiyadan oldin qo‘ shilsa va asosiy nishon bilan birga ajratib olinib amplifikatsiya qilinsa, u faqat PZR bosqichini emas, balki lizis, nuklein kislota tiklanishi va ingibitsiyani ham qamrab oladi. Bunday nazorat mavjud bo‘ lgandagina HBV signali qayd etilmagan namuna asosli ravishda haqiqiy manfiy deb talqin qilinishi mumkin.

Shu bilan birga, ichki nazoratni dupleks formatga kiritish o‘ z-o‘ zidan yechim emas. Nazorat nishoni reaksiya komponentlari uchun asosiy nishon bilan raqobatlashadi va uning miqdori noto‘ g‘ ri tanlansa, past nusxadagi HBV DNKsining amplifikatsiyasini bostirishi mumkin. Demak, IN ni loyihalashdagi asosiy vazifa — signalni maksimal darajaga chiqarish emas, balki nazoratning barqarorligi bilan asosiy nishonning sezgirligi o‘ rtasida muvozanat topishdir.

Mazkur ishning maqsadi — HBV DNKsini aniqlashga mo‘ ljallangan dupleks real vaqt PZR tizimi uchun plazmidaga asoslangan ekzogen IN ni tanlash, uning ishchi darajasini nisbiy suyultirmadan absolyut nusxa soniga keltirish hamda ekstraksiya nazorati, ingibitsiyani aniqlash, multipleks raqobat va analitik sezgirlik nuqtai nazaridan baholashdan iborat.

Adabiyotlar tahlili

qPCR sifat standartlari va nazoratlar tizimi

qPCR natijalarining qayta ishlab chiqarilishi test dizayni, validatsiya hajmi va hisobotning shaffofligi bilan bevosita bog‘ liq. MIQE tavsiyalari va ularning 2025 yilda qayta ko‘ rib chiqilgan MIQE 2.0 tahriri namuna bilan ishlash tartibi, nuklein kislota ajratish usuli, praymer va zond ketma-ketliklari, reaksiya sharoitlari, amplifikatsiya samaradorligi, aniqlash va miqdoriy aniqlash chegaralari, shuningdek musbat, manfiy va ichki nazoratlarning to‘ liq bayonini talab qiladi [4, 5]. MIQE 2.0 klinik multipleks qPCR uchun ichki nazorat asosiy nishon bilan bir turdagi nuklein kislota (DNK nishoni uchun — DNK, RNK nishoni uchun — RNK) bo‘ lishini hamda infeksion diagnostikada imkon qadar namuna tayyorlashdan oldin kiritilishini ma’qullaydi — bu ekstraksiyadan amplifikatsiyagacha bo‘ lgan butun zanjirni qamrab olish imkonini beradi [4].

PZR ingibitsiyasi analitik xato manbai sifatida

Qon va uning komponentlarida amplifikatsiyani susaytiruvchi moddalarning mavjudligi ko‘ p yillar davomida hujjatlashtirilgan: gemoglobin va laktoferrin bevosita ingibitor xususiyatiga ega [8], kengroq sharhlarda esa geparin, immunoglobulinlar, tuzlar, spirtlar va sorbsion reagentlarning qoldiqlari ham muhim omillar sifatida qayd etiladi [7, 9]. Ingibitsiya amplifikatsiya samaradorligini pasaytiradi va Cq qiymatini kechiktiradi; aniqlash chegarasiga yaqin konsentratsiyalarda esa natijani manfiy tomonga siljitishi mumkin. Shu sababli diagnostik amplifikatsiya tizimlarida faqat tashqi seriya nazoratlari bilan cheklanish yetarli emas — namuna ichidagi jarayon nazorati zarur [6].

Endogen va ekzogen ichki nazoratlar

Ichki nazoratlar kelib chiqishiga ko‘ ra ikki turga bo‘ linadi. Endogen nazorat sifatida inson genlaridan foydalanish qo‘ shimcha shablon talab qilmaydi va namunaning hujayraviy tarkibi haqida ma’lumot beradi. Biroq plazma va zardob kabi asosan hujayrasiz matritsalarda inson genom DNKsining miqdori past va namunadan namunaga sezilarli darajada o‘ zgaruvchan bo‘ ladi, bu esa nazoratning me’yoriy diapazonini belgilashni qiyinlashtiradi. Ma’lum konsentratsiyada tashqaridan kiritiladigan ekzogen DNK nishoni bu cheklovdan xoli bo‘ lib, ekstraksiya samaradorligi va ingibitsiyani standartlashtirilgan tarzda nazorat qilish imkonini beradi [6].

Multipleks raqobat va xalqaro kalibrlash

Ekzogen IN dizaynidagi markaziy masala — dupleks reaksiyadagi raqobat. Nazorat darajasi juda past bo‘ lsa, u stoxastik tarzda aniqlanmasligi yoki qisman ingibitsiyani ishonchli ko‘ rsatmasligi mumkin; haddan tashqari yuqori bo‘ lsa, past nusxadagi HBV DNKsi bilan praymer, zond va polimeraza uchun raqobatga kirishadi. Ilgari ishlab chiqilgan HBV real vaqt PZR tizimlarida ko-ekstraksiya qilinadigan (klinik namuna bilan birga ajratib olinadigan) geterologik nazorat DNKlari ekstraksiya va amplifikatsiya nosozligini aniqlash uchun muvaffaqiyatli qo‘ llanilgan [10, 11]. Shuningdek, juda yuqori HBV yuklamasida asosiy nishonning kuchli amplifikatsiyasi IN signalini susaytirishi mumkin; bu holat aniq HBV-musbat natijani bekor qilmaydi, ammo tegishli talqin qoidasi validatsiya bosqichida oldindan belgilanishi shart [4, 10].

Miqdoriy HBV diagnostikasida metrologik izchillik ham muhim ahamiyatga ega. JSSTning HBV DNK xalqaro standartlari natijalarni MB/ml (IU/mL) da yagona shkalada ifodalash uchun asos yaratadi [14], ko‘ p markazli baholashlar esa testlarning aniqlash chegarasi, chiziqli diapazoni, takrorlanuvchanligi va laboratoriyalararo mosligini alohida ko‘ rsatish zarurligini tasdiqlaydi [12, 13]. Shunga ko‘ ra, yangi ichki nazoratni baholash uning o‘ z amplifikatsiyasi bilan cheklanmasligi, balki HBV aniqlash chegarasi va past-musbat namunalarning Cq qiymatlariga sezilarli ta’sir ko‘ rsatmasligi bilan ham isbotlanishi kerak.

Tadqiqot metodologiyasi

Tadqiqot dizayni va klinik namunalar

Ichki nazoratni baholash uchun ikki mustaqil namuna guruhi shakllantirildi. Birinchi guruh — HBV markerlari bo‘ yicha manfiy deb tasdiqlangan sog‘ lom donorlarning plazma namunalari (n =10); ular ekstraksiya jarayonining fon barqarorligini va IN signalining bazaviy taqsimotini aniqlash uchun xizmat qildi. Ikkinchi guruh — klinik va serologik jihatdan HBV infeksiyasi tasdiqlangan bemorlarning namunalari (n = 350); ular dupleks sharoitda IN va HBV signallari o‘ rtasidagi o‘ zaro ta’sirni tekshirish imkonini berdi. Namunalar tanlashda gemolizga uchragan hamda lipemik alikvotlar hisobga olinmadi.

HBV holati tijorat reaktiv to‘ plami AmpliSens® HBV-Monitor-FRT (Moskva, Rossiya) va QuantStudio 5 (Applied Biosystems, AQSh) real vaqt PZR tizimi yordamida mustaqil ravishda qayta tasdiqlandi. Plazma alikvotalari nuklein kislotalar ajratib olingunga qadar −80 °C haroratda saqlandi. Nuklein kislota degradatsiyasining oldini olish maqsadida takroriy muzlatish-eritish sikllariga yo‘ l qo‘ yilmadi (har bir alikvota uchun bir martadan oshmadi).

Barcha namunalar shaxsni identifikatsiya qiluvchi ma’lumotlarsiz, anonimlashtirilgan holda tahlil qilindi; ish Xelsinki deklaratsiyasining amaldagi tahririga va muassasa etika komissiyasi tasdiqlagan tartibga rioya qilgan holda bajarildi.

Ekzogen ichki nazorat konstruksiyasi va ishchi darajasi

Ekzogen ichki nazorat (IN)

Ekzogen ichki nazorat (IN) sifatida laboratoriya sharoitida tayyorlangan, pPICZα A vektori (umumiy uzunligi 3593 juft asos) asosida konstruksiya qilingan rekombinant plazmida qo‘ llanildi. Nishon ketma-ketlik pPICZα turidagi ekspressiya vektorlari tarkibiga kiruvchi *Saccharomyces cerevisiae* α-factor prepro sekretor signal hududidan kelib chiqqan geterologik DNK qismidan iborat. Ushbu hudud vektorning 941–1207 nukleotidlari oralig‘ ida, ya’ni 5′ *AOX1* promotori va ko‘ p sonli klonlash sayti (MCS) orasida joylashgan bo‘ lib, uzunligi 267 juft asosni, GC-tarkibi esa 42% ni tashkil etadi.

Nishon hududning HBV genomi bilan gomologiyaga ega emasligi *in silico* tekshirildi. 267 j.a. li α-factor ketma-ketligi NCBI BLASTn dasturi yordamida (megablast va blastn algoritmlari, nr/nt ma’lumotlar bazasi, qidiruv *Hepatitis B virus* [taxid:10407] bo‘ yicha cheklangan holda, tekshiruv sanasi — 2025-yil 15-yanvar solishtirildi. E-value chegarasi 10 ga teng bo‘ lganda ham ahamiyatli o‘ xshashlik aniqlanmadi ("No significant similarity found"). Bundan tashqari, tanlangan IN praymer-zond tizimi HBV-pozitiv namunalarda nospetsifik signal bermasligi, HBV praymerlari esa IN plazmidasida signal bermasligi eksperimental yo‘ l bilan tasdiqlandi.

Rekombinant plazmida *Escherichia coli* TOP10 shtammiga elektro-transformatsiya usulida kiritildi. Transformatsiya qilingan hujayralar 25 mkg/ml Zeocin™ tutgan past tuzli LB-agarda (pH 7,5) tarkibli selektiv muhitda ekilib, 37 °C haroratda 14-16 soat davomida inkubatsiya qilindi va hosil bo‘ lgan klonlarning seleksiyasi amalga oshirildi.

Plazmida DNKsi *E. coli* hujayralaridan ishqoriy lizis usuli bilan ajratib olinib, keyinchalik fenol-xloroform aralashmasi yordamida tozalandi. Olingan preparatning tozaligi va konsentratsiyasi spektrofotometrik usulda baholandi: A260/A280 nisbati 1,88 ni tashkil etdi, bu 1,8–2,0 oralig‘ idagi maqbul ko‘ rsatkichga mos keladi. Preparatning butunligi 0,7% li agaroza gelida elektroforez qilish orqali tasdiqlandi.

Tanlangan klonlarning autentikligi ikki mustaqil usulda tasdiqlandi. Birinchidan, ajratib olingan plazmida DNKsi α-factor hududiga xos praymerlar yordamida PZR da tekshirildi; kutilgan o‘ lchamdagi 200 j.a. mahsulotning hosil bo‘ lishi nishon ketma-ketlikning mavjudligini ko‘ rsatdi. Ikkinchidan, plazmidaning umumiy o‘ lchami restriksion tahlil orqali baholandi. Halqasimon plazmida agaroza gelida o‘ zining haqiqiy molekulyar o‘ lchamiga muvofiq migratsiyalanmaydi: superо‘ ralgan, bo‘ shashgan halqasimon va bir zanjiri kesilgan shakllar turlicha tezlikda harakatlanadi, shu sababli molekulyar-og‘ irlik markeriga nisbatan o‘ lchamni baholab bo‘ lmaydi. Faqat chiziqli DNK o‘ zining haqiqiy uzunligiga mos ravishda yuradi.

Shu maqsadda 1 mkg plazmidaga FastDigest EcoRI va FastDigest KpnI restriktazalari (Thermo Scientific, AQSh) bilan 37 °C haroratda 15 daqiqa davomida ishlov berildi va mahsulot 0,8% li agaroza gelida elektroforez qilindi. Asosiy fragment 3556 j.a. o‘ lchamda, ya’ni pPICZα A vektorining kutilgan uzunligiga mos holatda qayd etildi (marker: 1 kbp DNA Ladder Plus) [10]. Har ikkala restriksiya sayti MCS tarkibida joylashgani sababli nishon α-factor hududi (941–1207 n.) butunligicha saqlanadi. Shu tariqa klonlarning aynan pPICZα A asosidagi rekombinant plazmidani tutishi ham nishon ketma-ketlik darajasida (PZR), ham butun vektor o‘ lchami darajasida (restriksion tahlil) tasdiqlandi. Chiziqli shakl bir vaqtning o‘ zida ikkinchi vazifani ham bajaradi: u nusxalar sonini massadan hisoblashda barcha molekulalarning bir xil topologik shaklda bo‘ lishini ta’minlaydi va turli halqasimon shakllarning amplifikatsiyaga har xil ta’sirini bartaraf etadi. Shuning uchun keyingi barcha ishlarda aynan chiziqli preparat qo‘ llanildi — u geldan elektroelyutsiya usuli bilan ajratib olindi.

Geldan ajratib olingan chiziqli DNK preparatining konsentratsiyasi spektrofotometrik usulda o‘ lchanib, 350 ng/mkl ni tashkil etdi. Nusxalar soni quyidagi formula asosida hisoblandi:

$$\text{nusxa/mkl} = (C\ [\text{ng/mkl}] \times 6{,}022\times10^{23}) / (N\ [\text{j.a.}] \times 660 \times 10^{9}),$$

bu yerda C — DNK konsentratsiyasi, N — chiziqli molekulaning uzunligi (3556 j.a.). Hisob natijasida preparatdagi konsentratsiya $8{,}98\times10^{10}$ nusxa/mkl ga teng bo‘ ldi. Undan ketma-ket suyultirish yo‘ li bilan avval taxminan 1 : 18 000 nisbatda oraliq stok eritma ($5{,}01\times10^{6}$ nusxa/mkl, ya’ni $5{,}01\times10^{9}$ nusxa/ml) tayyorlandi, so‘ ngra undan 1 : 100 000 suyultirish yo‘ li bilan 50 nusxa/mkl konsentratsiyali ishchi eritma olindi. Eritmalar ishlatilgunga qadar –20 °C haroratda, bir martalik aliqvotlar holida saqlandi.

IN har bir namunaga nukleinlar kislotalarini ajratib olish bosqichida, lizis eritmasi qo‘ shilganidan so‘ ng darhol 10 mkl hajmda qo‘ shildi, ya’ni har bir namunaga ~500 nusxa IN to‘ g‘ ri keldi. Ekstraksiya 50 mkl elyuat hajmida yakunlanganini hisobga olganda, elyuatdagi nazariy konsentratsiya ~10 nusxa/mkl ni, PZR reaksiyasiga 10 mkl elyuat

kiritilganda esa ~100 nusxa/reaksiyani tashkil etadi (100% chiqish samaradorligi shartida). IN ni ekstraksiya bosqichida kiritish uni bir vaqtning o‘ zida ham nukleinlar kislotalarini ajratib olish samaradorligining, ham amplifikatsiya ingibirlanishining nazorati sifatida ishlatish imkonini berdi.

Validatsiyani qayta ishlab chiqarish mumkin bo‘ lishi uchun nisbiy suyultirma absolyut miqdorga keltirildi. Oraliq stok eritmaning 1 : 100 000 nisbatdagi suyultirmasidan har bir klinik namunaga lizis eritmasi qo‘ shilganidan so‘ ng 10 μL qo‘ shildi; hisob-kitob zanjiri 1-jadvalda keltirilgan. Tanlangan daraja IN ning o‘ z aniqlash chegarasidan yetarlicha yuqori, ammo HBV ning past nusxali amplifikatsiyasiga sezilarli raqobat tug‘ dirmaydigan oraliqda joylashgan.

Jadval 1

Ichki nazoratning ishchi darajasini absolyut nusxa soniga keltirish

Bosqich	Qiymat	Izoh
Chiziqli DNK preparati (o‘ lchangan)	350 ng/μL ≈ $8{,}98\times10^{10}$ nusxa/μL	Spektrofotometrik o‘ lchash; N = 3556 j.a.
Oraliq stok eritma	5.01×10^{6} nusxa/μL (5.01×10^{9} nusxa/mL)	Preparatdan ~1 : 18 000 suyultirish
Ishchi suyultirma	1 : 100 000	Nuklein kislotasiz buferda
Suyultirilgan preparat	≈ 50 nusxa/μL	—
Har bir namunaga qo‘ shilgan hajm	10 μL	Lizis eritmasidan so‘ ng
Namunaga kiritilgan umumiy nusxa	≈ 5.0×10^{2} nusxa	—
Kirish plazma hajmi / elyusiya hajmi	100 μL / 50 μL	«SOREX-DNA» to‘ plami
Elyuatdagi nazariy konsentratsiya	≈ 10 nusxa/μL	100% tiklanish sharoitida
Reaksiyaga kiritilgan elyuat hajmi	10 μL	—
Reaksiyadagi nusxalar soni	≈ 100 nusxa/reaksiya	Yakuniy ishchi daraja

Izoh: hisob-kitob 100% tiklanish sharoitiga asoslangan nazariy qiymatlarni beradi; haqiqiy nusxalar soni raqamli PZR yoki kalibrlash egri chizig‘ i yordamida tasdiqlanishi lozim.

DNK ajratib olish

Ichki nazorat qo‘ shilgan plazma namunalaridan DNK O‘ zR FA S.Yu.Yunusov nomidagi O‘ simlik moddalari kimyosi institutida ishlab chiqilgan, sorbsiya usuliga asoslangan «SOREX-DNA» tijorat to‘ plami yordamida ishlab chiqaruvchi yo‘ riqnomasiga muvofiq ajratib olindi. Kirish plazma hajmi 100 μL, elyusiya hajmi 50 μL ni tashkil etdi. Har bir ekstraksiya seriyasida ikkita musbat jarayon nazorati (PKO1, PKO2) va bitta manfiy nazorat (OKO — nuklein kislotasiz matritsa + IN) parallel ravishda olib borildi; ushbu nazorat kontaminatsiyani aniqlash bilan bir qatorda ekstraksiya samaradorligining yuqori chegarasini belgilash imkonini berdi.

Dupleks real vaqt PZR

Amplifikatsiya va fluoressent signalni qayd etish QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, AQSh) platformasida bajarildi. HBV ga xos mahsulot FAM kanalida, ichki nazorat mahsuloti esa JOE kanalida ro‘ yxatga olindi. HBV uchun nishon sifatida Core (C) genining yuqori darajada konservativ hududi (HBV genomining 1777–2473 nukleotidlari) tanlandi. Ichki nazoratga xos praymerlar va JOE/BHQ-1 belgili zond mualliflar tomonidan loyihalangan; ular bo‘ yicha intellektual mulk hujjatlari rasmiylashtirilish bosqichida bo‘ lgani sababli ketma-ketliklar ushbu maqolada keltirilmaydi va asosli so‘ rov asosida mas’ul muallifdan olinishi mumkin. Har bir reaksiyaning umumiy hajmi 25 μL bo‘ lib, tarkibida 1× PZR buferi, 2,5–4 mM $MgCl_2$, 0,8 mM dNTP aralashmasi, har bir praymerdan 0,2–0,8 μM, zonddan 0,2 μM, 2,5 U SynTaq DNK-polimeraza, 10 μL ajratib olingan DNK va yakuniy hajmgacha nukleazasiz suv bo‘ ldi. Ichki nazorat praymerlari va zondining reaksiyadagi yakuniy konsentratsiyasi: har bir praymerdan 0,4 μM, zond 0,1 μM ni tashkil etdi. Har bir tajribada kalibrlash standartlari (KR1, KR2) va shablonsiz nazorat parallel ravishda qo‘ yildi.

Jadval 2

Dupleks real vaqt PZR termosikllash dasturi

Bosqich	Harorat, °C	Vaqt	Fluoressensiyani o‘ lchash	Sikllar soni
1. Dastlabki denaturatsiya	95	5 daqiqa	–	1
2. Dastlabki amplifikatsiya	95	10 soniya	–	5
	60	20 soniya	–	

Bosqich	Harorat, °C	Vaqt	Fluoressensiyani o‘ lchash	Sikllar soni
	72	15 soniya	–	
3. Asosiy amplifikatsiya	95	10 soniya	–	40
	60	20 soniya	Signal o‘ qiladi (FAM, JOE)	
	72	15 soniya	–	

Izoh: fluoressensiya 40 siklli asosiy bosqichning 60 °C qismida ikkala kanal bo‘ yicha o‘ qildi.

Nazoratlar va natijalarni talqin qilish

Har bir seriyada kamida to‘ rt turdagi nazorat qo‘ llanildi: shablonsiz nazorat (NTC), manfiy ekstraksiya nazorati, HBV-musbat nazorat va ichki nazorat saqlovchi matritsa nazorati. Talqin qoidasi quyidagicha belgilandi: FAM kanalida belgilangan chegaradan kechikmagan valid Cq qayd etilsa, namuna HBV-musbat; FAM signali qayd etilmasa yoki belgilangan chegaradan yuqori bo‘ lsa, ammo JOE kanalidagi IN valid diapazonda aniqlansa, namuna HBV-manfiy deb baholandi. IN signali ham, HBV signali ham qayd etilmagan namuna invalid deb hisoblanib, qayta ekstraksiyaga yuborildi. Cq chegaralari quyidagicha belgilandi: FAM kanali uchun Cq ≤ 38,0), JOE kanali (IN) uchun Cq 27,5–30,5. Atipik amplifikatsiya egri chiziqlari bazaviy chiziq va chegara qo‘ lda qayta belgilanib, natija ikki mustaqil operator tomonidan ko‘ rib chiqildi tartibida baholandi. Takrorlar qoidasi: chegaraviy natijalar Cq 36,0–38,0 oralig‘ ida ikki takrorda qayta tekshirildi va kamida bitta takrorda signal qayd etilganda musbat deb baholandi.

Analitik baholash

Ichki nazoratni baholash o‘ zaro bog‘ liq uch yo‘ nalishda amalga oshirildi: (i) turli klinik namunalarda IN Cq qiymatlari taqsimoti orqali jarayon nazoratining barqarorligi va takrorlanuvchanligi; (ii) keng HBV DNK diapazonida multipleks raqobat; (iii) bir xil matritsa va ekstraksiya sharoitida IN bilan va INsiz HBV analitik sezgirligining taqqoslanishi.

Cq qiymatlari o‘ rtacha ± standart og‘ ish ko‘ rinishida keltirildi. Takrorlanuvchanlik standart og‘ ish va variatsiya koeffitsienti (CV%) orqali ifodalandi. IN bilan va INsiz olingan juft Cq qiymatlari taqsimotga qarab juft (Shapiro–Wilk) t-test yoki Wilcoxon belgili rangli testi bilan taqqoslandi; ahamiyatlilik darajasi $\alpha = 0,05$ (ikki tomonlama) qilib belgilandi. HBV aniqlash chegarasi takrorlarning kamida 95% ida aniqlanadigan konsentratsiya sifatida belgilandi: C_{95} va uning 95% ishonch oralig‘ i probit-regressiya yordamida hisoblanib, har bir konsentratsiya darajasi uchun 20 takror qo‘ llanildi. Kalibrlash egri chizig‘ i parametrlari (R^2, qiyalik) va amplifikatsiya samaradorligi MIQE tavsiyalariga muvofiq E = 10^(−1/qiyalik) − 1 formulasi bo‘ yicha aniqlandi. Statistik tahlil Python 3.10 dasturlash tilida scipy.stats kutubxonasi yordamida bajarildi.

Natijalar va ularning tahlili

Klinik namunalar va test validligi

Jami 360 ta plazma namunasi tahlil qilindi, jumladan 10 ta sog‘ lom donor va 350 ta HBV-musbat bemor namunasi. Oldindan belgilangan seriya va namuna validligi mezonlari qo‘ llanganda birlamchi tekshiruvda 355/360 (98,6%) namuna valid natija berdi. 5 ta namuna dastlab IN signalining yo‘ qligi tufayli invalid deb baholandi; qayta ekstraksiyadan so‘ ng ham ularning barchasida IN signali tiklanmadi va namunalar yakuniy invalid deb hisobdan chiqarildi.

Ichki nazorat signalining barqarorligi va takrorlanuvchanligi

Tanlangan ishchi darajada (≈ 100 nusxa/reaksiya) valid klinik ekstraktlarda IN ning o‘ rtacha Cq qiymati 29.0 ± 0.4 ni tashkil etdi; umumiy diapazon 28.1–29.8 oralig‘ ida bo‘ ldi. Bu 1.7 siklga teng tor oraliq bo‘ lib, ekstraksiya samaradorligining namunadan namunaga sezilarli o‘ zgarmaganini ko‘ rsatadi. IN validligi 355/360 (98,6%) ni tashkil etdi. HBV-manfiy va HBV-musbat guruhlar bo‘ yicha alohida ko‘ rsatkichlar hamda seriya ichidagi va seriyalararo o‘ zgaruvchanlik 3-jadvalda keltirilgan. IN ning qabul diapazoni natijalar olingandan keyin emas, balki validatsiya rejasida oldindan belgilangan mezon asosida talqin qilindi.

Jadval 3

Ichki nazoratning validatsiya ko‘ rsatkichlari

Ko‘ rsatkich	Olingan qiymat	Qabul mezoni
IN ishchi darajasi	≈ 100 nusxa/reaksiya	IN LoD dan ≥ 10 marta yuqori
Klinik namunalarda IN Cq (o‘ rtacha ± SD)	29.0 ± 0.4	Cq 27.5–30.5
IN Cq diapazoni (min–maks)	28.1–29.8	—
Valid IN signali ulushi	355/360 (98,6%)	≥ 95%

Ko‘ rsatkich	Olingan qiymat	Qabul mezoni
HBV LoD (INsiz)	5,15 nusxa/reaksiya ≈ 257,5 nusxa/ml)	—
HBV LoD (IN bilan)	5,15 nusxa/reaksiya ≈ 257,5 nusxa/ml)	INsiz LoD dan ≤ 2 marta farq
Past-musbat namunalarda ΔCq (IN bilan − INsiz)	0.12 ± 0.08 ($p > 0.05$)	$\lvert\Delta Cq\rvert \le 0.5$
Yuqori HBV yuklamasida (10^8 MB/ml) IN Cq siljishi	1.1–1.8 sikl	IN signali yo‘ qolmasligi

Yuqori HBV DNK konsentratsiyasida multipleks raqobat

Raqobat 10^2 dan 10^8 MB/ml gacha bo‘ lgan HBV konsentratsiyalari diapazonida baholandi. Yuqori virus yuklamasida (10^8 MB/ml) IN signalining Cq ko‘ rsatkichi 1.1–1.8 siklga kechikdi, biroq signalning to‘ liq yo‘ qolishi kuzatilmadi va HBV DNKsining miqdoriy hisob-kitobiga hamda FAM kanalining analitik sezgirligiga salbiy ta’sir qayd etilmadi. Multipleks qPCR tamoyillariga muvofiq, juda yuqori nishon yuklamasida IN signalining susayishi kutiladigan hodisa bo‘ lib, aniq HBV-musbat natijani bekor qilmaydi; shunga qaramay, ushbu test uchun qabul qilinadigan qoida validatsiya natijalari asosida oldindan belgilanishi lozim [4, 10].

Ichki nazoratning HBV analitik sezgirligiga ta’siri

HBV aniqlash chegarasi ichki nazoratsiz ham, tanlangan IN darajasi bilan ham 5,15 nusxa/reaksiya (≈ 257,5 nusxa/ml) darajasida saqlanib qoldi. 10 MB/ml past-musbat darajada aniqlanish ulushi INsiz 19/20 — 95% va IN bilan 19/20 — 95% ni tashkil etdi. Past-musbat namunalarda HBV Cq qiymatlari o‘ rtasidagi farq statistik jihatdan ahamiyatsiz bo‘ ldi ($\Delta Cq = 0.12 \pm 0.08$; $p > 0.05$). Bu natijalar tanlangan IN konsentratsiyasi HBV ning klinik ahamiyatli analitik sezgirligini saqlab qolishini ko‘ rsatadi va 5.4-bo‘ limda bayon etilgan raqobat cheklovining amalda bartaraf etilganini tasdiqlaydi.

Natijalarning muhokamasi

Ekstraksiyadan oldin, lizis bosqichida kiritilgan jarayon nazorati faqat amplifikatsiyani nazorat qiluvchi yondashuvga qaraganda sezilarli darajada kuchliroq sifat kafolatini beradi, chunki u nuklein kislotalarni sorbsiya, yuvish va elyusiya bosqichlaridagi yo‘ qotishlarni ham, keyingi PZR ingibitsiyasini ham bir vaqtda qamrab oladi. Olingan natijalar zamonaviy qPCR sifat tamoyillariga hamda ilgari ichki nazorat bilan ishlab chiqilgan HBV testlarining natijalariga mos keladi [4, 10, 11]. Plazma kabi hujayrasiz matritsada standartlashtirilgan ekzogen DNK nazorati endogen inson DNKsining tabiiy o‘ zgaruvchanligidan kamroq ta’sirlanadi, bu esa qabul diapazonini torroq belgilash imkonini beradi.

Optimallashtirishning maqsadi IN signalini maksimal kuchaytirish emas, balki nazoratning barqarorligi bilan asosiy nishonning sezgirligi o‘ rtasida muvozanat yaratishdir. MIQE 2.0 namuna ichidagi nazorat miqdorini uning aniqlash chegarasidan yuqorida, biroq imkon qadar past darajada saqlashni va multipleks natijalarni tegishli singleks reaksiyalar bilan taqqoslab validatsiya qilishni tavsiya etadi [4]. Shu nuqtai nazardan, 1 : 100 000 suyultirma faqat absolyut nusxa soniga keltirilgandan va HBV aniqlash chegarasiga ta’siri amalda tekshirilgandan so‘ ng ilmiy asoslangan deb hisoblanishi mumkin — aynan shu bosqich mazkur ishda bajarildi (1- va 3-jadvallar).

pPICZα dan kelib chiqqan geterologik DNK ning amaliy afzalligi — uni ko‘ p miqdorda tayyorlash, standart tarzda suyultirish va HBV dan alohida fluoressent kanal orqali farqlash mumkinligidir. Shu bilan birga, muhim uslubiy cheklovni ochiq qayd etish zarur: plazmida DNKsi kapsidlangan HBV virionining lizis xususiyatlarini to‘ liq takrorlamaydi. Demak, mazkur nazorat plazmida namunaga kiritilgan nuqtadan boshlab nuklein kislotani ajratib olish samaradorligini (recovery) va amplifikatsiya ingibitsiyasini nazorat qiladi; alohida tajriba bilan isbotlanmagan holda uni virus zarrachasining barcha biologik parchalanish bosqichlarini nazorat qiladi deb talqin qilish *to‘ g‘ ri emas*.

HBV DNK ning klinik ahamiyati yuqoriligicha qolmoqda: JSST va EASL ning amaldagi tavsiyalarida virus yuklamasi davolashga ko‘ rsatma, monitoring va transmissiya xavfini baholashda markaziy marker hisoblanadi [1, 3]. Mahalliy diagnostik to‘ plamga validatsiyalangan jarayon nazoratini kiritish invalid va yolg‘ on manfiy natijalar ulushini kamaytiradi. Biroq diagnostik mahsulotga joriy etishdan oldin to‘ liq analitik validatsiya, JSST xalqaro standartiga metrologik izchillik, lotlararo baholash, kontaminatsiya xavfi tahlili, barqarorlik tadqiqotlari va tegishli reglament talablari bo‘ yicha sinovlar o‘ tkazilishi lozim [12–14].

Xulosalar

Plazmaga ekstraksiyadan oldin kiritiladigan geterologik plazmida ichki nazorati dupleks HBV real vaqt PZR tahlilida ekstraksiya va amplifikatsiya sifatini bir vaqtda nazorat qilish uchun ilmiy jihatdan asoslangan yondashuv hisoblanadi. Nisbiy suyultirmani absolyut miqdorga keltirish natijasida ichki nazoratning ishchi darajasi taxminan 100

nusxa/reaksiyani tashkil etdi; ushbu daraja valid klinik ekstraktlarda tor Cq oralig‘ ini (29.0 ± 0.4; 28.1–29.8) ta’minladi. Tanlangan ichki nazorat HBV ning analitik sezgirligini pasaytirmadi: aniqlash chegarasi: 5,15 nusxa/reaksiya (≈ 257,5 nusxa/ml) darajasida saqlanib qoldi, past-musbat namunalardagi Cq farqi esa statistik jihatdan ahamiyatsiz bo‘ ldi (ΔCq = 0.12 ± 0.08; $p > 0.05$). Yuqori virus yuklamasida (10^8 MB/ml) ichki nazorat signalining 1.1–1.8 siklga kechikishi kuzatildi; bu multipleks raqobatning kutilgan ko‘ rinishi bo‘ lib, HBV natijasining ishonchliligiga ta’sir qilmadi. Mahalliy diagnostik to‘ plamga joriy etish uchun quyidagilar tavsiya etiladi: (i) ishchi suyultirmani raqamli PZR yoki kalibrlash egri chizig‘ i bilan tasdiqlash; (ii) ichki nazorat Cq ning qabul diapazonini oldindan belgilash; (iii) JSST xalqaro standartiga izchil material yordamida ichki nazorat bilan va usiz HBV aniqlash chegarasi hamda aniqligini validatsiya qilish; (iv) yuqori virus yuklamasida ichki nazorat signalini talqin qilish qoidasini rasmiylashtirish; (v) klinik ahamiyatli interferentlar va preanalitik sharoitlarni tekshirish; (vi) barcha reaksiya komponentlari va talqin qoidalarini MIQE 2.0 talablariga muvofiq hujjatlashtirish.

Mualliflar hissasi, manfaatlar to‘ qnashuvi va moliyalashtirish

Mualliflarning hissasi: O.B.Alimuhamedova — tadqiqot konsepsiyasi, ichki nazorat konstruksiyasini tayyorlash, qPCR tajribalari, qo‘ lyozmani yozish; J.M.Abduraxmonov — tadqiqot dizayni va natijalarni talqin qilish; A.B.Baymirzayev — namunalar bilan ishlash va DNK ajratib olish; S.A.Ikramov — statistik tahlil; E.G.Yusupova — qo‘ lyozmani tahrirlash; Sh.S.Azimova — umumiy ilmiy rahbarlik.

Manfaatlar to‘ qnashuvi: mualliflar manfaatlar to‘ qnashuvi yo‘ qligini bildiradi.

Moliyalashtirish: O‘ zbekiston Respublikasi Fanlar akademiyasi O‘ MKIning A-FA-2021-418-raqamli amaliy granti doirasida amalga oshirildi.

Foydalanilgan adabiyotlar

1. World Health Organization. Guidelines for the prevention, diagnosis, care and treatment for people with chronic hepatitis B infection. Geneva: WHO; 2024. ISBN 978-92-4-009090-3. URL: https://www.who.int/publications/i/item/9789240090903

2. World Health Organization. Global hepatitis report 2024: action for access in low- and middle-income countries. Geneva: WHO; 2024. URL: https://www.who.int/publications/i/item/9789240091672

3. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection // Journal of Hepatology. 2025. Vol. 83, № 2. P. 502–583. DOI: 10.1016/j.jhep.2025.03.018 (PMID: 40348683)

4. Bustin S.A., Ruijter J.M., van den Hoff M.J.B., Kubista M., Pfaffl M.W., Shipley G.L., et al. MIQE 2.0: revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines // Clinical Chemistry. 2025. Vol. 71, № 6. P. 634–651. DOI: 10.1093/clinchem/hvaf043

5. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // Clinical Chemistry. 2009. Vol. 55, № 4. P. 611–622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797 (PMID: 19246619)

6. Hoorfar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M., Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays // Journal of Clinical Microbiology. 2004. Vol. 42, № 5. P. 1863–1868. DOI: 10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004 (PMID: 15131141)

7. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors — occurrence, properties and removal // Journal of Applied Microbiology. 2012. Vol. 113, № 5. P. 1014–1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x (PMID: 22747964)

8. Abu Al-Soud W., Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells // Journal of Clinical Microbiology. 2001. Vol. 39, № 2. P. 485–493. DOI: 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001 (PMID: 11158094)

9. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing // Clinical Microbiology Reviews. 2006. Vol. 19, № 1. P. 165–256. DOI: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006 (PMID: 16418529)

10. Leb V., Stöcher M., Valentine-Thon E., Hölzl G., Kessler H., Stekel H., Berg J. Fully automated, internally controlled quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR by use of the MagNA Pure LC and LightCycler instruments // Journal of Clinical Microbiology. 2004. Vol. 42, № 2. P. 585–590. DOI: 10.1128/JCM.42.2.585-590.2004 (PMID: 14766820)

11. Garson J.A., Grant P.R., Ayliffe U., Ferns R.B., Tedder R.S. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control // Journal of Virological Methods. 2005. Vol. 126, № 1–2. P. 207–213. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.03.001 (PMID: 15847939)

12. Caliendo A.M., Valsamakis A., Bremer J.W., Ferreira-Gonzalez A., Granger S., Sabatini L., et al. Multilaboratory evaluation of real-time PCR tests for hepatitis B virus DNA quantification // Journal of Clinical Microbiology. 2011. Vol. 49, № 8. P. 2854–2858. DOI: 10.1128/JCM.00471-11 (PMID: 21697326)

13. Ismail A.M., Sivakumar J., Anantharam R., Dayalan S., Samuel P., Fletcher G.J., et al. Performance characteristics and comparison of Abbott and artus real-time systems for hepatitis B virus DNA quantification // Journal of Clinical Microbiology. 2011. Vol. 49, № 9. P. 3215–3221. DOI: 10.1128/JCM.00915-11 (PMID: 21795507)

14. World Health Organization. Collaborative study to evaluate the proposed WHO 4th International Standard for hepatitis B virus (HBV) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. WHO/BS/2016.2291. Geneva: WHO; 2016.

15. Musabaev E., Estes C., Sadirova S., Bakieva S., Brigida K., Dunn R., et al. Viral hepatitis elimination challenges in low- and middle-income countries — Uzbekistan Hepatitis Elimination Program (UHEP) // Liver International. 2023. Vol. 43, № 4. P. 773–784. DOI: 10.1111/liv.15514 (PMID: 36606729)

16. Ismoilov U.Y., et al. Hepatitis B and C landscape in Uzbekistan: epidemiological patterns revealed in a study of 1 040 000 people // European Journal of Public Health. 2025. Vol. 35, № 5. P. 1014–1019. DOI: 10.1093/eurpub/ckaf136 (PMID: 40843480)

References

1. World Health Organization. Guidelines for the prevention, diagnosis, care and treatment for people with chronic hepatitis B infection. Geneva, WHO, 2024. ISBN 978-92-4-009090-3. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240090903 (in English).

2. World Health Organization. Global hepatitis report 2024: action for access in low- and middle-income countries. Geneva, WHO, 2024. Available at: https://www.who.int/publications/i/item/9789240091672 (in English).

3. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology, 2025, vol. 83, no. 2, pp. 502–583. DOI: 10.1016/j.jhep.2025.03.018 (in English).

4. Bustin S.A., Ruijter J.M., van den Hoff M.J.B., Kubista M., Pfaffl M.W., Shipley G.L., et al. MIQE 2.0: revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments guidelines. Clinical Chemistry, 2025, vol. 71, no. 6, pp. 634–651. DOI: 10.1093/clinchem/hvaf043 (in English).

5. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 2009, vol. 55, no. 4, pp. 611–622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797 (in English).

6. Hoorfar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M., Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. Journal of Clinical Microbiology, 2004, vol. 42, no. 5, pp. 1863–1868. DOI: 10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004 (in English).

7. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. PCR inhibitors — occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology, 2012, vol. 113, no. 5, pp. 1014–1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x (in English).

8. Abu Al-Soud W., Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. Journal of Clinical Microbiology, 2001, vol. 39, no. 2, pp. 485–493. DOI: 10.1128/JCM.39.2.485-493.2001 (in English).

9. Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clinical Microbiology Reviews, 2006, vol. 19, no. 1, pp. 165–256. DOI: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006 (in English).

10. Leb V., Stöcher M., Valentine-Thon E., Hölzl G., Kessler H., Stekel H., Berg J. Fully automated, internally controlled quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR by use of the MagNA Pure LC and LightCycler instruments. Journal of Clinical Microbiology, 2004, vol. 42, no. 2, pp. 585–590. DOI: 10.1128/JCM.42.2.585-590.2004 (in English).

11. Garson J.A., Grant P.R., Ayliffe U., Ferns R.B., Tedder R.S. Real-time PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. Journal of Virological Methods, 2005, vol. 126, no. 1–2, pp. 207–213. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.03.001 (in English).

12. Caliendo A.M., Valsamakis A., Bremer J.W., Ferreira-Gonzalez A., Granger S., Sabatini L., et al. Multilaboratory evaluation of real-time PCR tests for hepatitis B virus DNA quantification. Journal of Clinical Microbiology, 2011, vol. 49, no. 8, pp. 2854–2858. DOI: 10.1128/JCM.00471-11 (in English).

13. Ismail A.M., Sivakumar J., Anantharam R., Dayalan S., Samuel P., Fletcher G.J., et al. Performance characteristics and comparison of Abbott and artus real-time systems for hepatitis B virus DNA quantification. Journal of Clinical Microbiology, 2011, vol. 49, no. 9, pp. 3215–3221. DOI: 10.1128/JCM.00915-11 (in English).

14. World Health Organization. Collaborative study to evaluate the proposed WHO 4th International Standard for hepatitis B virus (HBV) DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. WHO/BS/2016.2291. Geneva, WHO, 2016 (in English).

15. Musabaev E., Estes C., Sadirova S., Bakieva S., Brigida K., Dunn R., et al. Viral hepatitis elimination challenges in low- and middle-income countries — Uzbekistan Hepatitis Elimination Program (UHEP). Liver International, 2023, vol. 43, no. 4, pp. 773–784. DOI: 10.1111/liv.15514 (in English).

16. Ismoilov U.Y., et al. Hepatitis B and C landscape in Uzbekistan: epidemiological patterns revealed in a study of 1 040 000 people. European Journal of Public Health, 2025, vol. 35, no. 5, pp. 1014–1019. DOI: 10.1093/eurpub/ckaf136 (in English).