



81

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор отделения Диагностики

ЗАО «Рос-Москва»

О.В. Нестеров

«31» августа 2009г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Наборы реагентов для ПЦР-анализа в режиме реального времени к анализаторам Cobas TaqMan, Cobas TaqMan 48, Cobas AmpliPrep



Тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 version 2.0

Для диагностики *IN VITRO*.

Тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 version 2.0

48 тестов P/N: 05212294 190

Промывочный реагент для COBAS® AmpliPrep/
COBAS® TaqMan®

5.1 литров P/N: 03587797 190

Назначение теста

Тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 является *in vitro* тестом, основанным на амплификации нуклеиновых кислот, и предназначен для количественного определения РНК вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) в человеческой плазме путем автоматической подготовки образцов в приборе COBAS AmpliPrep и автоматической амплификации и детекции в анализаторе COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48. Тест позволяет количественно определять РНК ВИЧ-1 в диапазоне 20 - 10,000,000 копий/мл. Одна копия РНК ВИЧ-1 соответствует 1.7 ± 0.1 Международных единиц (МЕ) в соответствии с первым международным стандартным ВОЗ для РНК ВИЧ-1 в тестах по выявлению нуклеиновых кислот (NIBSC 97/656)³⁶.

Тест предназначен для использования совместно с клиническими данными и другими лабораторными маркерами прогрессирования заболевания при ведении пациентов, инфицированных ВИЧ-1 групп М и О. Тест может применяться для определения прогноза у пациента на основании исходных уровней РНК ВИЧ-1, или для мониторинга эффективности антиретровирусной терапии на основании определения изменений уровней РНК ВИЧ-1 в плазме с ЭДТА на протяжении курса антиретровирусной терапии.

Тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 не предназначен для скрининга на ВИЧ-1 крови и ее продуктов или для подтверждающей диагностики ВИЧ-1-инфекции.

Введение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является этиологическим агентом синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД)¹⁻³. ВИЧ-инфекция может передаваться половым путем, через контаминированную кровь и ее продукты, или от инфицированной матери плоду⁴. В течение 3 – 6 недель после инфицирования обычно развивается недлительный острый синдром, для которого характерны гриппозные симптомы и высокие уровни вирусии в периферической крови⁴⁻⁸. В большинстве случаев после этого развивается ВИЧ-специфичный иммунный ответ и снижение вирусии в плазме, обычно в течение 4 – 6 недель после появления симптомов^{9,10}.

После сероконверсии наступает клинически стабильная бессимптомная фаза, способная длиться годами¹¹⁻¹³. Для бессимптомного периода характерен невысокий уровень персистирующей вирусии в плазме¹⁴ и постепенное снижение уровней CD4+ Т-лимфоцитов, приводящее к тяжелому иммунодефициту, множественным оппортунистическим инфекциям, онкогенезу и гибели¹⁵. Несмотря на то, что уровни вирусии на протяжении бессимптомной фазы инфекции относительно низкие, репликация и разрушение вирусных частиц является динамическим процессом, при котором высокая скорость продуцирования вирионов и инфицирования CD4+ клеток уравнивается высокой скоростью разрушения вирионов, гибели инфицированных клеток и появлением новых CD4+ клеток, что обеспечивает относительно стабильные уровни вирусии в плазме и CD4+ клеток¹⁶⁻¹⁸.

Количественное определение вирусии ВИЧ в периферической крови показало, что более высокая концентрация вируса может коррелировать с повышенным риском клинического прогрессирования заболевания, а снижение вирусной нагрузки в плазме может приводить к снижению риска клинического прогрессирования^{19,21}. Уровни вирусной нагрузки в периферической крови могут быть определены по содержанию р24-антигена ВИЧ в сыворотке крови, количественным культивированием ВИЧ, выделенного из плазмы, или прямым измерением концентрации вирусной РНК в плазме методом амплификации нуклеиновых кислот или методом амплификации люминесцентного сигнала²²⁻²⁶.

Антиген р24 является основным капсидным белком ВИЧ и находится в сыворотке крови как в свободном виде, так и связанный с анти-р24 антителами. Свободный антиген р24 может быть определен количественно в коммерческих ИФА-диагностикумах, однако значение антигена р24 как маркера вирусной нагрузки ограничено, поскольку антиген выявляется только у 20% бессимптомных носителей и 40-50% пациентов с симптомами заболевания. Методы разрушения комплексов антиген-антитело повышают чувствительность тестов для выявления антигена р24, однако он по-прежнему не выявляется у большинства бессимптомных носителей²².

Инфекционный ВИЧ, выделенный из плазмы, можно культивировать в активированных моноцитах периферической крови (РВМС), выделенных от здоровых доноров. Количественное определение достигается за счет заражения РВМС сериями разведений образца плазмы. Количественное культивирование имеет

ограниченное значение для мониторинга уровней вирусной нагрузки у пациентов, поскольку только небольшая доля вирусных частиц обладает инфекционными свойствами *in vitro*. Инфекционные вирионы зачастую не выявляют у бессимптомных носителей²².

РНК ВИЧ в плазме можно определять количественно методом амплификации нуклеиновых кислот, например, в полимеразной цепной реакции (ПЦР)²⁷⁻²⁹. В тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 метод ПЦР используется для достижения максимальных чувствительности и динамического диапазона количественного определения РНК ВИЧ-1 в плазме с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Принцип теста

Тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 является тестом на основе амплификации нуклеиновых кислот, предназначенным для количественного определения РНК ВИЧ-1 групп М и О в человеческой плазме с ЭДТА в качестве антикоагулянта. В основе теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 лежат три основных процесса: (1) выделение РНК ВИЧ-1 из образца; (2) обратная транскрипция РНК-мишени, при которой образуется комплементарная цепь ДНК (кДНК), и (3) одновременная амплификация в ПЦР кДНК-мишени и детекция расщепляемого олигонуклеотидного зонда, меченного двумя красителями, специфичного для выявляемой мишени.

Тест с COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 v2.0 позволяет проводить автоматическую подготовку образцов с последующей автоматизированной обратной транскрипцией, ПЦР-амплификацией и детекцией мишени – РНК ВИЧ-1 и защищенной РНК количественного стандарта (КС) ВИЧ-1. Реагент Мастермикс содержит праймеры, специфичные и для РНК ВИЧ-1, и для РНК КС ВИЧ-1. Мастермикс был разработан для одинаково эффективного количественного определения всех субтипов группы М ВИЧ-1 и группы О ВИЧ-1. Выявление амплифицированной ДНК производится с помощью мишень-специфичного и КС-специфичного олигонуклеотидных зондов, меченных каждый двумя красителями, что позволяет проводить независимое выявление ампликона ВИЧ-1 и ампликона КС ВИЧ-1.

Количественное определение РНК ВИЧ-1 проводится с помощью КС ВИЧ-1, применение которого позволяет компенсировать ингибирование и контролировать процессы пробоподготовки и амплификации, что обеспечивает более точное определение РНК ВИЧ-1 в каждом образце. КС ВИЧ-1 является неинфекционной защищенной РНК, содержащей последовательность ВИЧ-1 с сайтами посадки праймеров, идентичными РНК-мишени ВИЧ-1, и уникальным сайтом для зонда, благодаря которому ампликоны КС ВИЧ-1 различаются от ампликонов мишени ВИЧ-1.

КС ВИЧ-1 добавляют в каждый образец в известном количестве копий, и он проходит все этапы пробоподготовки, обратной транскрипции, ПЦР-амплификации и детекции. Анализатор COBAS TaqMan или анализатор COBAS TaqMan 48 рассчитывает концентрацию РНК ВИЧ-1 в тестируемых образцах на основании сопоставления сигнала ВИЧ-1 с сигналом КС ВИЧ-1 в каждом образце и контроле.

Выбор мишени

Выбор последовательности-мишени РНК ВИЧ-1 определяется наиболее консервативным участком генома среди разных субтипов группы М ВИЧ-1 и группы О ВИЧ-1. Учитывая высокую степень генетической изменчивости вируса, в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 в качестве мишени используются для одновременной амплификации и детекции два участка генома ВИЧ. Применение двух мишень-специфичных и одного КС-специфичного олигонуклеотидных зондов обеспечивает независимую идентификацию ампликонов ВИЧ-1 и КС ВИЧ-1. Соответственно, правильный выбор праймеров и зондов определяет способность теста амплифицировать и выявлять все субтипы группы М ВИЧ-1 и группы О ВИЧ-1. В тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 для обратной транскрипции и амплификации в ПЦР применяются праймеры к консервативным участкам генома ВИЧ-1 - последовательностям гена *gag* *gene32* и участка LTR.

Подготовка образцов

В тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 подготовка образцов проводится автоматизировано в приборе COBAS AmpliPrep методом тотального выделения на кремниевых носителях. Выделение проводится из 850 мкл плазмы. Вирусные частицы ВИЧ-1 лизируются при нагревании во время инкубации с протеазой и хаотропным лизирующим/связывающим буфером, высвобождающим нуклеиновые кислоты и защищая РНК ВИЧ-1 от действия РНКаз, содержащихся в плазме. Протеаза и известное количество молекул защищенной РНК КС ВИЧ-1 вносятся в каждый образец вместе с лизирующим буфером и магнитными стеклянными частицами. Затем смесь инкубируется и РНК ВИЧ-1 и РНК КС ВИЧ-1 связываются с поверхностью магнитных стеклянных частиц. Несвязавшийся материал – соли, белки, прочие клеточные компоненты, удаляются при отмывке магнитных стеклянных частиц. После отделения магнитных стеклянных частиц и завершения этапа отмывки, сорбированные нуклеиновые кислоты элюируются при нагревании в водном растворе. Подготовленные образцы, содержащий магнитные стеклянные частицы и свободную РНК ВИЧ-1 и РНК КС ВИЧ-1, вносятся в амплификационную смесь и переносятся в анализатор COBAS TaqMan или анализатор COBAS TaqMan 48. Затем происходит обратная транскрипция РНК-мишени и РНК КС ВИЧ-1, их

амплификация и одновременная детекция расщепляемых меченных олигонуклеотидных зондов, специфичных для мишени и КС.

Обратная транскрипция и амплификация в ПЦР

Реакция обратной транскрипции и ПЦР-амплификации проводится с помощью термостабильного рекомбинантного фермента *Thermus specie* ДНК-полимеразы (Z05). В присутствии ионов марганца (Mn^{2+}) и определенном составе буфера, Z05 обладает как активностью обратной транскриптазы, так и ДНК-полимеразы^{30,31}. Это позволяет проводить обратную транскрипцию и ПЦР-амплификацию одновременно с детекцией ампликонов в реальном времени.

Обработанные образцы вносятся в амплификационную смесь в амплификационные пробирки (К-пробирки), в которых проводится обратная транскрипция и ПЦР-амплификация. Реакционная смесь нагревается, при этом обратный праймер специфично садится на РНК-мишень ВИЧ-1 и РНК КС ВИЧ-1. В присутствии ионов Mn^{2+} и избытке трифосфатов дезоксирибонуклеотидов (dNTPs) – трифосфатов дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезоксицитидина, дезоксиуридина и дезокситимидина, полимеразы Z05 удлиняет севший на матрицу праймер, образуя ДНК-цепь, комплементарную РНК-мишени.

Амплификация мишени

После обратной транскрипции РНК-мишени ВИЧ-1 и РНК КС ВИЧ-1, термоциклер анализатора COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 нагревает реакционную смесь для того, чтобы денатурировать гибрид РНК:кДНК и открыть сайты посадки праймеров. При охлаждении смеси праймеры гибридизуются с ДНК-мишенью. Термостабильная ДНК-полимераза *Thermus specie* Z05 (Z05) в присутствии ионов Mn^{2+} и избытке трифосфатов дезоксирибонуклеотидов (dNTPs) – трифосфатов дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезоксицитидина, дезоксиуридина и дезокситимидина, удлиняет присоединившиеся праймеры комплементарно матрице, в результате чего образуется молекула двуцепочечной ДНК, называемая ампликон. Анализатор COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 автоматически повторяет эти этапы заданное количество циклов, в результате каждого цикла происходит удвоение числа ампликонов. Число циклов запрограммировано в анализаторе COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48. Амплифицируются только два участка генома ВИЧ-1, ограниченных праймерами; полный геном ВИЧ-1 не амплифицируется.

Избирательная амплификация

Избирательность амплификации нуклеиновой кислоты – мишени достигается в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 за счет применения фермента AmpErase (урацил-N-гликозилазы) и трифосфата дезоксиуридина (dUTP). Фермент AmpErase распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин³³, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси dNTPs в реагенте Мастермикс; поэтому дезоксиуридин содержится только в ампликонах.

Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом AmpErase до начала амплификации ДНК-мишени. Кроме того, фермент AmpErase разрушает любой неспецифический продукт, образовавшийся в результате первичной активации Мастермикса ионами марганца. Фермент AmpErase, входящий в состав реагента Мастермикс, катализирует расщепление содержащей дезоксиуридин ДНК по дезоксиуридиновому основанию, открывая дезоксирибозную цепь в позиции C1. При нагревании на первом этапе цикла, цепь ДНК ампликона разрывается в позиции дезоксиуридина и, следовательно, она не может в дальнейшем быть амплифицированной.

Фермент AmpErase инактивируется при нагревании выше 55°C, т.е. на протяжении температурных циклов, и поэтому не разрушает ампликоны мишени, образующиеся в процессе ПЦР.

Детекция продуктов ПЦР в тесте COBAS TaqMan

В тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 используется метод ПЦР в реальном времени^{34,35}. Применение зондов, меченных двумя флуоресцентными красителями, позволяет осуществлять в реальном времени детекцию накапливаемых продуктов ПЦР за счет мониторинга интенсивности эмиссии флуоресцентного красителя, высвобождающегося в процессе амплификации. Специфичные для ВИЧ-1 и для КС ВИЧ-1 олигонуклеотидные зонды мечены репортерным красителем и гасящим красителем. В тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, для мечения зондов ВИЧ-1 и КС ВИЧ-1 использованы разные флуоресцентные репортерные красители. В интактных зондах репортерный краситель подавляется расположенным рядом гасящим красителем за счет эффекта переноса энергии Форстера. Во время ПЦР зонд гибридизуется с последовательностью-мишенью и разрушается из-за 5' → 3' нуклеазной активности ДНК-полимеразы Z05.

В результате репортерный и гасящий красители освобождаются и разделяются, гашение больше не происходит, и флуоресцентная активность репортерного красителя возрастает. Амплификация РНК ВИЧ-1 и РНК КС ВИЧ-1 измеряется независимо, на разных длинах волн. Этот процесс повторяется заданное число циклов, в каждом цикле происходит возрастание активности отдельных репортерных красителей, и происходит независимое определение РНК ВИЧ и РНК КС ВИЧ-1. Цикл ПЦР, при котором рост кривой накопления флуоресцентного

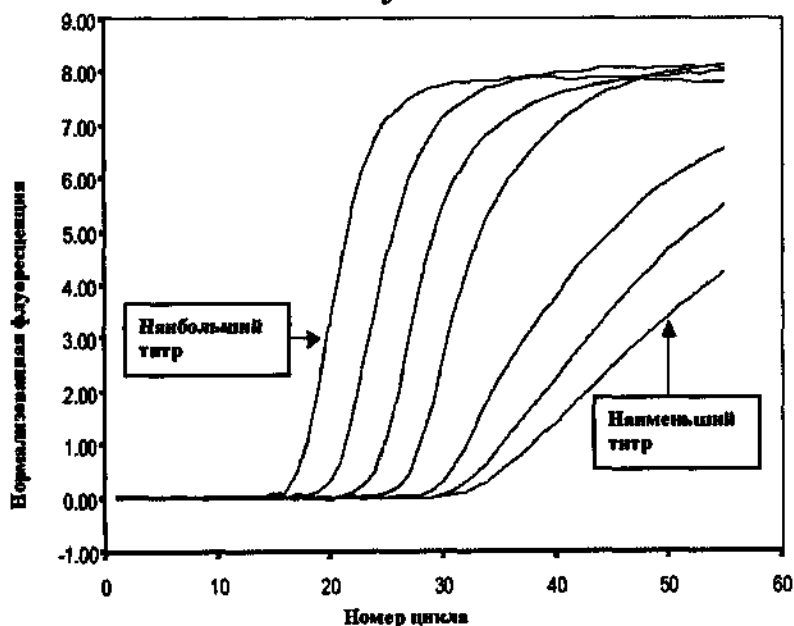
сигнала становится экспоненциальным, определяется количеством исходного материала, внесенного в начале ПЦР.

Основы количественного определения в тесте COBAS TaqMan

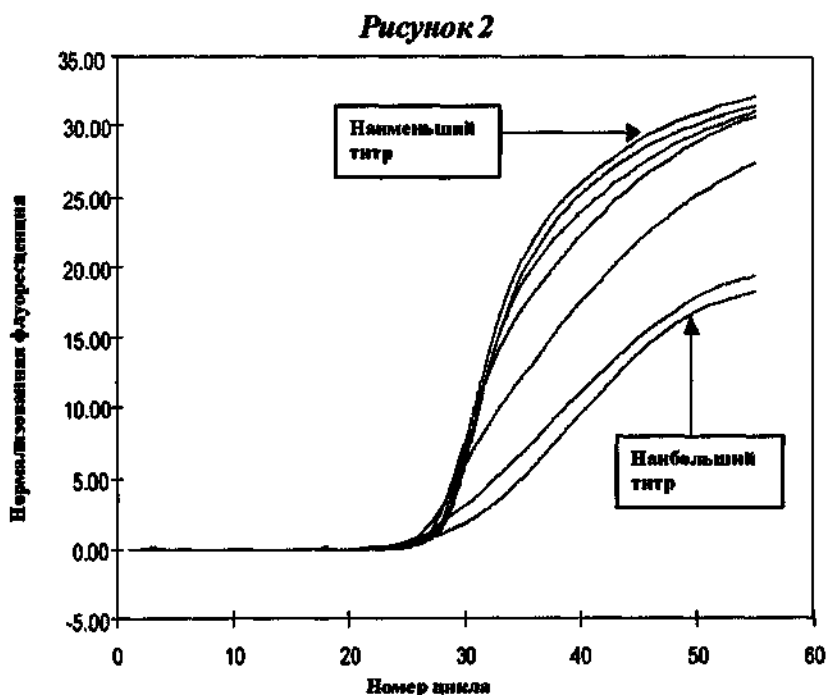
Тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 является количественным в широком динамическом диапазоне, поскольку мониторинг ампликонов производится в экспоненциальной фазе амплификации. Чем выше титр ВИЧ-1, тем раньше флуоресцентный сигнал репортерного красителя зонда ВИЧ-1 превысит пороговый уровень флуоресценции (Рисунок 1). Поскольку количество РНК КС ВИЧ-1 одинаково во всех образцах, флуоресцентный сигнал репортерного красителя зонда КС ВИЧ-1 должен появиться в одном и том же цикле для всех образцов (Рисунок 2). Для образцов, в которых значение флуоресценции КС не соответствует ожидаемому, концентрация рассчитывается с соответствующей поправкой. Появление специфичного флуоресцентного сигнала выражается как критическое пороговое значение (Ct). Ct определяется как дробный номер цикла, в котором флуоресцентный сигнал репортерного красителя превысил заданный порог (заданный уровень флуоресценции), и началась экспоненциальная фаза роста сигнала (Рисунок 3). Большее значение Ct указывает на меньший титр мишени ВИЧ-1 в образце. Двукратное увеличение титра соответствует уменьшению на 1 Ct для РНК-мишени ВИЧ-1, а 10-кратное увеличение титра соответствует уменьшению на 3.3 Ct.

На рисунке 1 показаны кривые накопления для серии разведений в диапазоне 5- $\log_{10}$. Чем выше концентрация вируса, тем на более ранний цикл смещается кривая накопления. Поэтому крайняя левая кривая соответствует максимальному титру вируса, а крайняя правая кривая – наименьшему титру.

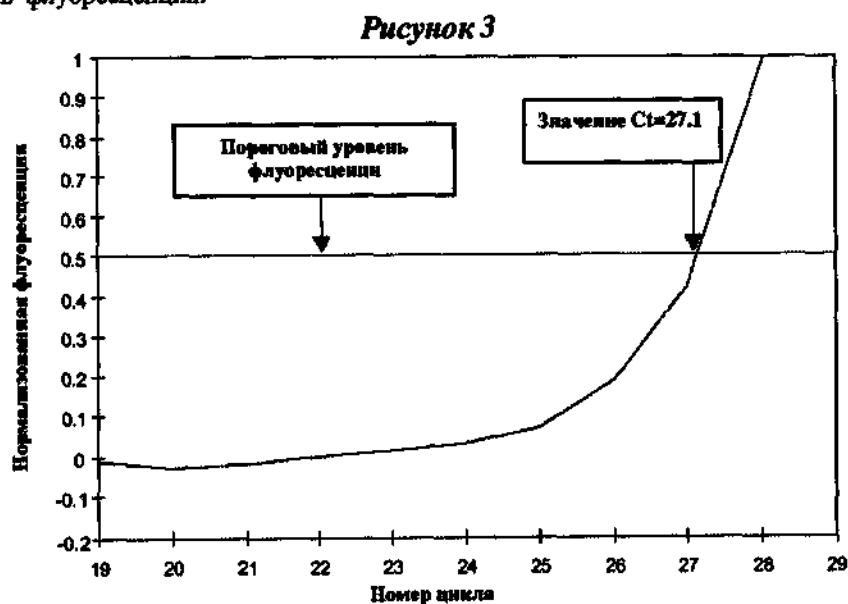
Рисунок 1



На рисунке 2 показаны кривые накопления флуоресцентного сигнала количественного стандарта для образцов серии разведений вируса в интервале 5-log_{10} . КС добавлен в каждый образец в одинаковом количестве. Величина C_t для КС одинакова независимо от титра вируса-мишени.



На рисунке 3 приведен пример подцикловой нормализации значений флуоресценции для каждой кривой. Дробное значение номера цикла (C_t) рассчитывается как точка, в которой флуоресцентный сигнал превышает пороговый уровень флуоресценции.



Количественное определение РНК ВИЧ-1

Количественное определение РНК ВИЧ-1 в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 проводится за счет использования второй последовательности-мишени (количественный стандарт ВИЧ-1), вносимой в каждый тестируемый образец в известной концентрации. КС ВИЧ-1 представляет собой защищенную неинфекционную РНК, несущую фрагменты последовательности ВИЧ-1, соответствующие сайтам посадки праймеров, идентичные последовательностям ВИЧ-1. КС ВИЧ-1 содержит участки посадки праймеров для ВИЧ-1 и в результате его амплификации образуется продукт такой же длины и нуклеотидного состава, что и фрагмент амплификации РНК-мишени ВИЧ-1. Участок посадки зонда детекции КС ВИЧ-1 изменен, чтобы можно было различать ампликоны КС ВИЧ-1 и мишени – гена *gag* ВИЧ-1.

В ПЦР на этапе посадки праймеров в анализаторе COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48, образцы освещаются светом определенной длины волны, и прошедший через фильтр флуоресцентный сигнал фиксируется для каждого образца. Данные от каждого образца затем корректируются с учетом флуктуаций прибора.

Полученные значения флуоресцентного сигнала отправляются прибором в программу AMPLILINK и хранятся в базе данных. Проводится предварительная проверка достоверности значений для РНК КС ВИЧ-1 и РНК ВИЧ-1, и если данные не укладываются в заданные границы, система генерирует предупреждающие значки. После завершения предварительной проверки, значения флуоресценции обрабатываются и рассчитываются значения *Ct* для РНК ВИЧ-1 и РНК КС ВИЧ-1. Прилагаемые к набору теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 лот-специфичные калибровочные константы используются для расчета значений титра для образцов и контролей на основании значений *Ct* для РНК ВИЧ-1 и РНК КС ВИЧ-1. Тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 стандартизован относительно Первого международного стандарта ВОЗ для РНК ВИЧ-1 в тестах для выявления нуклеиновых кислот (NIBSC 97/656)³⁶. Результаты титров представляются в копиях/мл (ср/мл). Фактор пересчета значений копий РНК ВИЧ-1/мл и Международных единиц ВИЧ-1/мл составляет, по расчетам Roche Molecular Systems, Inc., 0.6 копий/МЕ (1.7 МЕ/копий).

Реагенты

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

(P/N: 05212294 190)

HIV-1 v2.0 CS1

(Кассета реагента с магнитными стеклянными частицами ВИЧ-1)

Магнитные стеклянные частицы

93% изопропанол

Xi



93% (o/o) изопропанол

Раздражающее

F



93% (o/o) изопропанол

Огнеопасно

HIV-1 v2.0 CS2

(Кассета лизирующего реагента ВИЧ-1)

Дигидрат цитрата натрия

42.5% гуанидин тиоцианат

< 14% полидоканол

0.9% дитийтреитол

Xi



42.5% (o/o) гуанидин тиоцианат

Вредно



< 14% полидоканол

Опасно для окружающей среды

H12CAP

48 тестов

1 x 48 тестов

1 x 48 тестов

HIV-1 v2.0 CS3	1 x 48 тестов
Мульти-реагентная касета ВИЧ-1, содержит:	
Rase	1 x 3.8 мл
(Раствор протеиназы)	
Трис буфер	
< 0.05% ЭДТА	
Хлорид кальция	
Ацетат кальция	
≤ 7.8% протеиназа	
Глицерин	
Xi  ≤ 7.8% (o/o) протеиназа	
средно	
ЕВ	1 x 7.0 мл
(Элюционный буфер)	
Трис буфер	
0.2% метишарабен	
HIV-1 v2.0 CS4	1 x 48 тестов
Кассета тест-специфичного реагента ВИЧ-1, содержит:	
HIV-1 QS	1 x 3.6 мл
(Количественный стандарт ВИЧ-1)	
Трис-HCl буфер	
ЭДТА	
< 0.005% поли гА РНК (синтетическая)	
< 0.001% защищенная конструкция РНК ВИЧ-1, содержащая последовательности посадки праймеров ВИЧ-1 и уникальный сайт посадки зонда (неинфекционная РНК в бактериофаге MS2)	
0.05% азид натрия	
HIV-1 MMX	1 x 2.5 мл
(Мастермикс ВИЧ-1)	
Трициновый буфер	
Ацетат калия	
Гидроксид калия	
20% диметилсульфоксид	
Глицерин	
< 0.04% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP	
< 0.003% прямой и обратный праймеры к участкам gag и RTL ВИЧ-1	
< 0.003% олигонуклеотидный аптамер	
< 0.003% меченые олигонуклеотидные зонды, специфичные для ВИЧ-1 и КС ВИЧ-1	
< 0.05% Z05 ДНК-полимераза (бактериальная)	
< 0.1% фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальная)	
0.09% азид натрия	
CAR/CTM Mn2+	1 x 19.8 мл
(раствор марганца CAR/CTM)	
< 0.5% ацетат марганца	
Ледяная уксусная кислота	
0.09% азид натрия	
HIV-1 H(+)/C, v2.0	4 x 1.0 мл
(Высокотитражный позитивный контроль ВИЧ-1)	
< 0.001% Защищенная конструкция РНК ВИЧ-1, содержащая последовательности ВИЧ-1 (неинфекционная РНК в бактериофаге MS2)	
Негативная человеческая плазма, нереактивная по антителам к ВГС, антителам к ВИЧ-1/2, Антигену ВИЧ p24 и HBsAg; негативная по РНК ВИЧ-1, РНК ВГС и ДНК ВГВ в ПЦР	
0.1% консервант ProClin 300	

HIV-1 L(+)/C, v2.0

4 x 1.0 мл

(Низкокотитражный позитивный контроль ВИЧ-1)

< 0.001% Защищенная конструкция РНК ВИЧ-1, содержащая последовательности ВИЧ-1 (неинфекционная РНК в бактериофаге MS2)

Негативная человеческая плазма, нереактивная по антителам к ВГС, антителам к ВИЧ-1/2, Антигену ВИЧ p24 и HBsAg; негативная по РНК ВИЧ-1, РНК ВГС и ДНК ВГВ в ПЦР

0.1% консервант ProClin 300

CTM (-) C

4 x 1.0 мл

[Негативный контроль COBAS TaqMan (человеческая плазма)]

Защищенная конструкция РНК ВИЧ-1, содержащая последовательности ВИЧ-1 (неинфекционная РНК в бактериофаге MS2)

Негативная человеческая плазма, нереактивная по антителам к ВГС, антителам к ВИЧ-1/2, Антигену ВИЧ p24 и HBsAg; негативная по РНК ВИЧ-1, РНК ВГС и ДНК ВГВ в ПЦР

0.1% консервант ProClin 300

HIV-1 H(+)/C, v2.0 CIP

1 x 4 клипсы

(Штрих-кодовые клипсы для высококотитражного позитивного контроля ВИЧ-1)

HIV-1 L(+)/C, v2.0 CIP

1 x 4 клипсы

(Штрих-кодовые клипсы для низкокотитражного позитивного контроля ВИЧ-1)

HIV-1 (-) C CIP

1 x 4 клипсы

(Штрих-кодовые клипсы для негативного контроля ВИЧ-1)

Промывочный реагент COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®
(P/N: 03587797 190)**PG WR****PG WR**

1 x 5.1 л

(Промывочный реагент COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan)

Дигидрат цитрата натрия

< 0.1% N-метилизотиазолон-HCl

Требования предосторожности**A. Для диагностики *IN VITRO*.**

B. Данный тест предназначен для работы с образцами человеческой плазмы, собранной с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

B. Не пипетировать ртом.

Г. Не есть, не пить и не курить в рабочих лабораторных зонах. При работе с образцами и реагентами набора работать в одноразовых перчатках, лабораторных халатах и защите для глаз. После работы с образцами и реагентами набора тщательно вымыть руки.

Д. Избегать бактериальных и рибонуклеазных контаминаций реагентов при отборе аликвот из контрольных пробирок.

E. Рекомендуется использовать стерильные одноразовые пипетки и свободные от РНКаз наконечники для дозаторов.

Ж. Не пудрить контроли из наборов разных лотов или разных пробирок одного лота.

З. Не объединять кассеты реагентов или контроли из разных наборов.

И. Не открывать кассеты COBAS AmpliPrep, не заменять, объединять, удалять или добавлять в них флаконы.

K. Утилизировать неиспользованные реагенты, отходы и образцы в соответствии с государственными, федеральными и местными требованиями.

Л. Не использовать набор по истечении срока годности.

M. Данные по безопасности материалов (MSDS) могут быть получены в вашем местном представительстве Roche.

H. Образцы и контроли необходимо рассматривать как инфекционные и при работе с ними выполнять требования лабораторной безопасности, например, приведенные в *Правилах биологической безопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях*³⁷ и в документе NCCLS M29-A³⁸. Тщательно мойте и дезинфицируйте рабочие поверхности свежим раствором 0.5% гипохлорита натрия в деионизированной или дистиллированной воде.

Примечание: Коммерческий жидкий бытовой отбеливатель обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5.25%. Разведение 1:10 бытового отбеливателя дает 0.5% раствор гипохлорита натрия.

О. Осторожно: СТМ (-) С, HIV-1 L(+)С v2.0 и HIV-1 H(+)С v2.0 содержат человеческую плазму, полученную из человеческой крови. Исходный материал тестировался и оказался негативным по HBsAg, антителам к ВИЧ-1/2 и ВГС, и антигену р24 ВИЧ. Тестирование в ПЦР показало отсутствие в негативной человеческой плазме РНК ВИЧ-1, РНК ВГС и ДНК ВГВ. Ни один известный метод не дает полной гарантии отсутствия инфекционных агентов в продуктах человеческой крови. Поэтому все материалы человеческого происхождения должны рассматриваться как потенциально инфекционные. СТМ (-) С, HIV-1 L(+)С v2.0 и HIV-1 H(+)С v2.0 необходимо рассматривать как инфекционные и при работе с ними выполнять требования лабораторной безопасности, например, приведенные в *Правилах биологической безопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях*³⁷ и в документе NCCLS M29-A³⁸. Тщательно мойте и дезинфицируйте все рабочие поверхности (сведения об обработке рабочих поверхностей приборов можно найти в Руководстве пользователя COBAS AmpliPrep, используемого с анализатором COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 и AMPLI LINK Software, Version 3.1.0 Series) свежим раствором 0.5% гипохлорита натрия в деионизованной или дистиллированной воде.

П. HIV-1 QS, CAP/СТМ Мп2+ и HIV-1 MMX содержат азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью канализационных труб, образуя взрывоопасные азиды металлов. Выливая содержащие азид натрия растворы в лабораторную раковину, смывайте большим объемом воды для предотвращения образования азидов.

Р. При работе с любыми реагентами пользуйтесь одноразовыми перчатками, лабораторными халатами и защитой для глаз. Избегайте контакта этих материалов с кожей, глазами и слизистой. В случае такого контакта немедленно смойте большим количеством воды, в противном случае могут возникнуть ожоги. Разлитые реагенты смойте водой и вытрите насухо.

С. Не допускайте контакта с гипохлоритом натрия HIV-1 v2.0 CS2 и жидких отходов прибора COBAS AmpliPrep, содержащих гуанидин тиоцианат. Такая смесь приведет к выделению очень токсичного газа.

Т. При утилизации элементов обработки образцов (SPUs) прибора COBAS AmpliPrep, содержащих гуанидин тиоцианат, избегайте их контакта с раствором гипохлорита натрия. Такая смесь приведет к выделению очень токсичного газа.

Хранение и работа с набором

А. Не замораживайте реагенты и контроли.

Б. Храните HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 и HIV-1 v2.0 CS4 при 2-8°C. Будучи неоткрытыми, эти реагенты стабильны до конца срока годности. После того как были открыты, эти реагенты стабильны в течение 28 дней при 2-8°C или до истечения срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше. HIV-1 v2.0 CS1, HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 и HIV-1 v2.0 CS4 можно использовать не более чем в 4 циклах прибора, всего не более 64 часов в загруженном в прибор COBAS AmpliPrep состоянии. В перерывах между циклами прибора реагенты должны храниться при 2-8°C.

В. Храните HIV-1 H(+)С v2.0, HIV-1 L(+)С v2.0 и СТМ (-) С при 2-8°C. Контроли стабильны до конца срока годности. После открытия неиспользованные остатки выбрасывают.

Г. Штрих-кодовые клипсы [HIV-1 H(+)С v2.0 Clip, HIV-1 L(+)С v2.0 Clip and HIV-1 (-) С Clip] должны храниться при 2-30°C.

Д. Храните PG WR при 2-30°C. PG WR стабилен до конца срока годности. После того как реагент был открыт, он стабилен в течение 28 дней при 2-8°C или до истечения срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше.

Предоставляемые материалы

А. COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0
(P/N: 05212294 190)

H12CAP

HIV-1 v2.0 CS1

(Кассета реагента с магнитными стеклянными частицами ВИЧ-1)

HIV-1 v2.0 CS2

(Кассета с лизирующим реагентом ВИЧ-1)

HIV-1 v2.0 CS3

(Мультиреагентная кассета ВИЧ-1)

HIV-1 v2.0 CS4

(Кассета с тест-специфичным реагентом ВИЧ-1)

HIV-1 H(+)/C v2.0

(Высокотитражный позитивный контроль ВИЧ-1)

HIV-1 L(+)/C v2.0

(Низкотитражный позитивный контроль ВИЧ-1)

CTM (-) C

{Негативный контроль COBAS TaqMan (человеческая плазма)}

HIV-1 H(+)/C v2.0 Ctip

(Штрих-кодовые клипсы для высокотитражного позитивного контроля ВИЧ-1)

HIV-1 L(+)/C v2.0 Ctip

(Штрих-кодовые клипсы для низкотитражного позитивного контроля ВИЧ-1)

HIV-1 (-) C Ctip

(Штрих-кодовые клипсы для негативного контроля ВИЧ-1)

PG WR

В. Промывочный реагент COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan
(P/N: 03587797 190)

PG WR

(Промывочный реагент COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan)

Необходимые непредоставляемые материалы**Приборы и программное обеспечение**

- Прибор COBAS AmpliPrep
- Анализатор COBAS TaqMan или анализатор COBAS TaqMan 48
- Не обязательно: Соединяющая станция
- Программа AMPLILINK, v3.2
- Станция программы AMPLILINK, с принтером
- Руководство пользователя прибора COBAS AmpliPrep для работы с анализатором COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 и программой AMPLILINK, Version 3.1.0 Series
- Руководство пользователя анализатора COBAS TaqMan (или не обязательная станция переноса) для работы с программой AMPLILINK, Version 3.2 Series
- Руководство пользователя анализатора COBAS TaqMan 48 для работы с программой AMPLILINK, Version 3.2 Series
- Руководство по работе с программой AMPLILINK Version 3.2 Series для работы с прибором COBAS AmpliPrep, анализатором COBAS TaqMan и анализатором COBAS TaqMan 48

Расходные материалы

- Элементы обработки образцов (SPUs)
- Входящие пробирки для образцов (S-пробирки) с штрих-кодовыми клипсами
- Штативы К-наконечников
- Коробка К-пробирок, 12 x 96

Прочие необходимые непредоставляемые материалы

- Штатив для образцов (штатив SK 24)
- Штатив для реагентов
- Штатив SPU
- Ключ для К-пробирок, моторизованный
- Ключ для К-пробирок
- К-платформа
- Переносчик для К-платформы
- Подставка для К-платформы
- Дозаторы с аэрозольным барьером или одноразовые свободные от РНКаз наконечники (объемом до 1000 мкл)*
- Одноразовые перчатки, без талька
- Вихревой встряхиватель

*Точность пипеток должна находиться в пределах 3% от их объема. Свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером должны применяться в случаях, когда это рекомендовано для предотвращения контаминаций.

Сбор, транспортировка и хранение образцов

Примечание: Необходимо рассматривать все образцы и контроли как потенциально инфекционные.

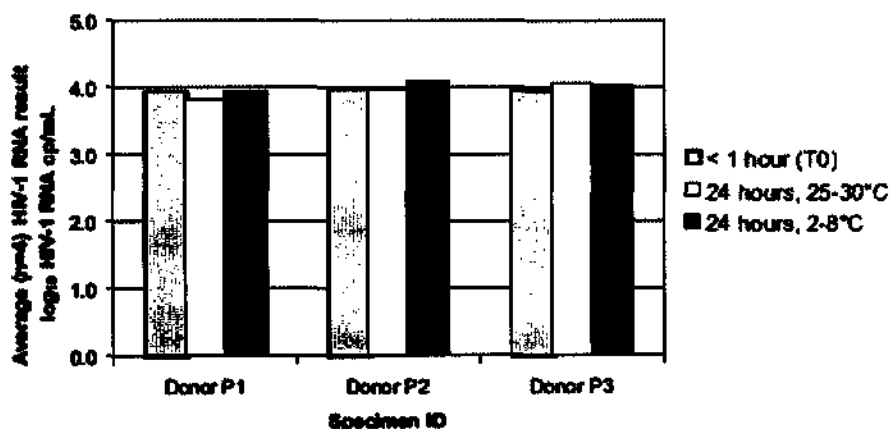
Примечание: Данный тест был валидирован только для образцов плазмы крови человека с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Тестирование образцов другого типа может привести к получению некорректных результатов.

А. Сбор образцов

Тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 предназначен только для тестирования образцов плазмы. Кровь необходимо отбирать в стерильные пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Цельная кровь может храниться при 2-25°C не более 24 часов. Отделение плазмы от крови необходимо проводить не позднее чем через 24 часов после отбора крови, центрифугируя кровь при 800-1600g в течение 20 минут при комнатной температуре. Перенесите плазму в стерильные полипропиленовые пробирки. На рисунке 4 показаны результаты исследований стабильности вируса в цельной крови. Исследования проводились с помощью теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test (P/N: 03543005 190).

Рисунок 4
Стабильность ВИЧ-1 в цельной крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта



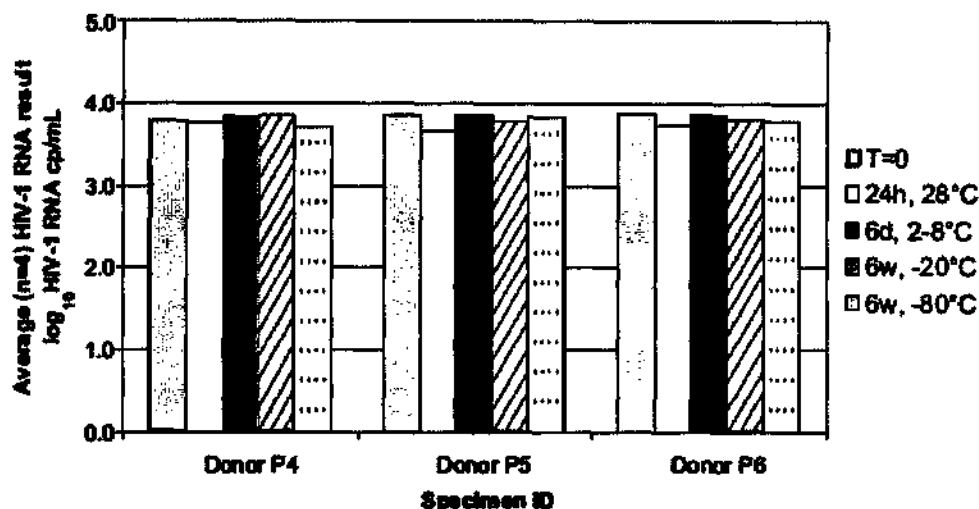
Б. Транспортировка образцов

Транспортировка цельной крови или плазмы должна происходить в соответствии с федеральными, государственными и прочими правилами транспортировки этиологических агентов³⁹. Цельную кровь необходимо транспортировать при 2-25°C и обработать в течение 24 часов после отбора крови. Плазма может транспортироваться при 2-8°C или замороженной при -20°C - -80°C.

В. Хранение образцов.

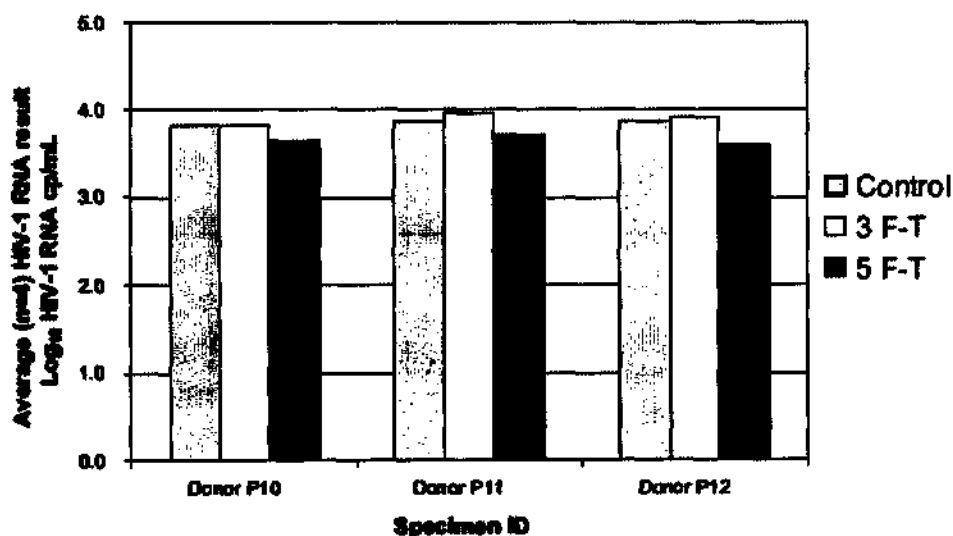
Образцы плазмы могут храниться при комнатной температуре (25 - 30°C) в течение 1 дня, при 2-8°C в течение 6 дней. Показано, что образцы плазмы стабильны в течение 6 месяцев при хранении замороженными при -20°C - -80°C. Рекомендуется хранить образцы в аликвотах по 1100-1200 мкл в стерильных полипропиленовых пробирках с завинчивающимися крышками объемом 2 мл (например, Sarstedt P/N: 72.694.006). На рисунке 5 показаны результаты исследований стабильности вируса РНК HIV-1 при разных режимах хранения образцов. Исследования проводились с помощью теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test (P/N: 03543005 190).

Рисунок 5
Стабильность ВИЧ-1 в плазме с ЭДТА



Образцы плазмы можно замораживать и оттаивать до 5 раз без значительного снижения титра РНК ВИЧ-1. на Рисунок 6 приведены результаты исследований влияния циклов замораживания/оттаивания на стабильность ВИЧ-1, проводившихся с набором COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test (P/N: 03543005 190).

Рисунок 6
Результаты выявления ВИЧ-1 после замораживания/оттаивания (F-T, до 5 циклов) образцов плазмы с ЭДТА



Инструкции по применению

Примечание: Следуйте следующим рабочим инструкциям: (а) *Руководство по работе с прибором COBAS AmpliPrep используемом с анализатором COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 и программой AMPLILINK Software, Version 3.2 Series*; (б) *Руководство по работе с анализатором COBAS TaqMan (и соединяющей станцией) с программой AMPLILINK Software, Version 3.2 Series* или (в) *Руководство по работе с анализатором COBAS TaqMan 48 с программой AMPLILINK Software, Version 3.2 Series*.

Объем постановки:

Каждый набор содержит реагенты, рассчитанные на 48 тестов, которые могут проводиться в сериях по 12 - 24 теста. Как минимум по одному контролю СТМ (-) С, HIV-1 L(+)С v2.0 и HIV-1 H(+)С v2.0 необходимо включать в каждую серию постановок (см. раздел "Контроль качества").

Порядок работы:

Постановку в анализаторе COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 необходимо начать в течение 120 минут после завершения выделения образцов и контролей.

Примечание: Не замораживайте и не храните выделенные образцы при 2-8°C.

Подготовка образцов и контролей

Примечание: При использовании замороженных образцов плазмы поместите их при комнатной температуре до полного оттаивания и перемешайте на вортексе 3-5 секунд. Выньте контроли из холодильника и доведите перед началом работы до комнатной температуры.

Настройка прибора COBAS AmpliPrep

Раздел А. Сервисное обслуживание и запуск

A1. Прибор COBAS AmpliPrep в режиме ожидания готов к работе.

A2. Включите станцию программы AMPLILINK. Подготовьте к работе станцию:

а. Войдите в Windows® XP.

б. Дважды кликните по значку программы AMPLILINK.

в. Войдите в программу AMPLILINK, введя имя пользователя и пароль.

A3. Проверьте состояние PG WR в окне Status и при необходимости замените.

A4. Выполните все сервисные действия, перечисленные во вкладке Due Tab, в соответствии с Руководством пользователя прибора COBAS AmpliPrep используемого с анализатором COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 и программой AMPLILINK Software, Version 3.1.0 Series. Прибор COBAS AmpliPrep автоматически проведет запуск системы.

Раздел Б. Загрузка кассет с реагентами

Примечание: Выньте все кассеты с реагентами из холодильника, немедленно загрузите их в прибор COBAS AmpliPrep и дайте им дойти в приборе до комнатной температуры в течение 30 минут до начала обработки первого образца. Не доводите кассеты с реагентами до комнатной температуры вне прибора, поскольку на штрих-кодах маркировки может образоваться конденсат. Не вытирайте конденсат, если он образовался на штрих-кодах маркировки.

B1. Поместите HIV-1 v2.0 CS1 в штатив для реагентов. Поместите HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 и HIV-1 v2.0 CS4 в отдельный штатив для реагентов.

B2. Загрузите штатив с HIV-1 v2.0 CS1 в позицию А прибора COBAS AmpliPrep как описано в Руководстве пользователя прибора COBAS AmpliPrep используемого с анализатором COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 и программой AMPLILINK Software, Version 3.2 Series (также см. Таблицу 1).

B3. Загрузите штатив с HIV-1 v2.0 CS2, HIV-1 v2.0 CS3 и HIV-1 v2.0 CS4 в позицию В, С, D или Е прибора COBAS AmpliPrep (также см. Таблицу 1).

Раздел В. Загрузка расходных материалов

Примечание: Определите необходимое количество кассет для реагентов COBAS AmpliPrep, элементов обработки образцов (SPU), входящих пробирок для образцов (S-пробирок), К-наконечников и К-пробирок. Для каждого образца или контроля необходимы: один SPU, одна входящая S-пробирка, один К-наконечник и одна К-пробирка.

Возможны разные конфигурации работы прибора COBAS AmpliPrep с анализатором COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 (см. Таблицу 1). В зависимости от конфигурации, загрузите необходимое количество штативов с кассетами реагентов, штативов образцов с входящими S-пробирками, штативов SPU, штативов К-наконечников, штативов К-пробирок и К-платформ в соответствующие позиции в приборе COBAS AmpliPrep (см. Таблицу 1).

B1. Поместите SPU в штатив для SPU и загрузите штатив(-ы) в позицию J, K или L в приборе COBAS AmpliPrep.

B2. В зависимости от применяемой конфигурации, загрузите полный штатив(-ы) К-пробирок в позицию M, N, O или P в приборе COBAS AmpliPrep.

B3. Загрузите полный штатив (-ы) К-наконечников в позицию M, N, O или P в приборе COBAS AmpliPrep.

B4. Для конфигурации 3, в которой применяется анализатор COBAS TaqMan 48, загрузите К-платформы, находящиеся в штативах для К-платформ, в позиции M, N, O или P прибора COBAS AmpliPrep.

Таблица 1
Возможные конфигурации работы прибора COBAS AmpliPrep с анализатором COBAS TaqMan или анализатором COBAS TaqMan 48

Конфигурация	Вид переноса в анализатор COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48	Штативы, платформы и расходные материалы	Позиция в приборе COBAS AmpliPrep
1. Прибор COBAS AmpliPrep плюс соединяющая станция плюс анализатор COBAS TaqMan	Автоматический перенос К-платформы	К-пробирки в полном штативе К-пробирок К-наконечники в полном штативе К-наконечников Входящие S-пробирки с образцами и контролями в штативе образцов SPU в штативе для SPU CS1 в штативе для кассет CS2, CS3, CS4 в штативе для кассет	M-P M-P F-H J-L A B-E
2. Прибор COBAS AmpliPrep плюс анализатор COBAS TaqMan	Перенос К-пробирок вручную в штативе(-ах) для образцов в анализатор COBAS TaqMan	К-пробирки в полном штативе К-пробирок К-наконечники в полном штативе К-наконечников Входящие S-пробирки в штативе образцов SPU в штативе для SPU CS1 в штативе для кассет CS2, CS3, CS4 в штативе для кассет <u>После окончания обработки образцов:</u> К-пробирки в штативе для образцов (готовы к переносу вручную)	M-P M-P F-H J-L A B-E См. выше (F-H)
3.. Прибор COBAS AmpliPrep плюс анализатор(-ы) COBAS TaqMan 48	Перенос К-платформы вручную в штативе для К-платформы в анализатор COBAS TaqMan 48	К-пробирки в полном штативе К-пробирок К-наконечники в полном штативе К-наконечников Входящие S-пробирки в штативе образцов SPU в штативе для SPU CS1 в штативе для кассет CS2, CS3, CS4 в штативе для кассет Пустая К-платформа в своем штативе <u>После окончания обработки образцов:</u> К-пробирки в К-платформе, а она – в своем штативе	F-H M-P F-H J-L A B-E M-P См. выше (M-P)

Раздел Г. Создание задания и загрузка образцов

Г1. Подготовьте штативы для образцов следующим образом: Присоедините клипсу со штрих-кодом к каждой позиции в штативе для образцов, в которой будет находиться образец (S-пробирка). Присоедините по одной из специальных клипс со штрих-кодом для контролей [CTM (-) C, HIV-1 L(+)C v2.0 и HIV-1 H(+)C v2.0] к каждой позиции в штативе для образцов, в которой будет находиться контроль (S-пробирка). Клипсы со штрих-кодом, предназначенные для контролей, должны иметь тот же номер лота, что и пробирки с контролем из набора. Будьте внимательны, чтобы каждый контроль соответствовал своей клипсе. Поместите по одной входящей S-пробирке в каждую позицию, отмеченную клипсой.

Г2. В программе AMPLILINK создайте назначения для каждого образца и контроля в папке **Sample** окна **Orders**. Выберите нужный файл теста и сохраните его.

Г3. Задайте назначения для образцов и контролей позициям штатива образцов в папке **Sample Rack** окна **Orders**. Введите номер штатива образцов, соответствующий номеру штатива, подготовленного в этапе Г1.

Г4. Распечатайте отчет о назначении для штатива образцов (**Sample Rack Order**).

Г5. Подготовьте штативы образцов и контролей в предназначенной для этого зоне: Перемешайте на вортексе каждый образец и контроль [CTM (-) C, HIV-1 L(+)C v2.0 и HIV-1 H(+)C v2.0] в течение 3 – 5 секунд. Избегайте контаминации перчаток при работе с образцами и контролями.

Г6. Перенесите 1000 - 1050 мкл каждого образца и контроля [CTM (-) C, HIV-1 L(+)C v2.0 и HIV-1 H(+)C v2.0] в соответствующие входящие S-пробирки, используя наконечники с аэрозольным барьером, свободные от РНКаз. **Избегайте попадания сгустков во входящие S-пробирки.** Образцы и контроли необходимо переносить в пробирки в соответствии с записями в рабочем листе, созданном на этапе Г4. Клипсы со штрих-кодом, предназначенные для контролей, должны иметь тот же номер лота, что и пробирки с контролем из набора. Контроли должны быть помещены в правильные позиции, соответствующие клипсам со штрих-кодом. **Избегайте контаминации верхних частей S-пробирок образцами или контролями.**

Г7. При конфигурациях 1 и 2 с использованием анализатора COBAS TaqMan, загрузите штатив(-ы) для образцов(с) с входящими S-пробирками в позиции F, G или H прибора COBAS AmpliPrep.

Г8. При конфигурации 3 с использованием анализатора COBAS TaqMan 48, загрузите штатив(-ы) для образцов(с) с входящими S-пробирками и К-пробирками (по одной для каждой входящей S-пробирке, расставлены в позициях, соответствующих S-пробиркам) в позиции F, G или H прибора COBAS AmpliPrep.

Раздел Д. Запуск постановки в приборе COBAS AmpliPrep

Д1. запустите прибор COBAS AmpliPrep с помощью программы AMPLILINK, как описано в Руководстве пользователя программы AMPLILINK Software Version 3.1 Series, используемой с прибором COBAS AmpliPrep, анализатором COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48.

Раздел Е. Окончание постановки в приборе COBAS AmpliPrep и перенос в анализатор COBAS TaqMan (только для конфигураций 2 и 3)

Е1. Проверьте наличие значков и сообщений об ошибках на экране системы.

Е2. Выньте обработанные образцы и контроли из прибора COBAS AmpliPrep в штативах для образцов (в случае анализатора COBAS TaqMan без соединяющей станции) или штативах для К-платформ (в случае анализатора COBAS TaqMan 48), в зависимости от конфигурации системы (подробнее см. в разделе Ж).

Е3. Удалите сброс из прибора COBAS AmpliPrep.

Примечание: Все обработанные образцы и контроли по окончании выделения необходимо защищать от света.

Амплификация и детекция

Настройка анализатора COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48

Постановку в анализаторе COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 необходимо начать в течение 120 минут после завершения выделения образцов и контролей.

Примечание: Не замораживайте и не храните выделенные образцы при 2-8°C.

Раздел Ж. Загрузка обработанных образцов

Ж1. В зависимости конфигурации системы, перенесите К-пробирки в анализатор COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48:

Конфигурация 1: Автоматический перенос К-платформы через соединяющую станцию в анализатор COBAS TaqMan. Действия оператора не требуются.

Конфигурация 2: Перенос вручную К-пробирок в штатив(-ах) для образцов в анализатор COBAS TaqMan.

Конфигурация 3: Перенос вручную К-платформы, находящейся в штативе К-платформы, в анализатор COBAS TaqMan 48. Перенос вручную К-платформы в анализатор COBAS TaqMan 48 с помощью переносчика для К-платформы.

Раздел З. Запуск постановки в анализаторе COBAS TaqMan

З1. Запустите анализатор COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 с помощью одной из опций, описанных ниже, в зависимости от используемой конфигурации системы:

Конфигурация 1: Действия оператора не требуются.

Конфигурация 2: Автоматический запуск анализатора COBAS TaqMan после загрузки штатива(-ов) образцов.

Конфигурация 3: Заполните К-платформу пустыми К-пробирками, если в К-платформе находятся менее 6 К-пробирок. Откройте крышку термоциклера, загрузите К-платформу в термоциклер, и закройте крышку. Запустите постановку в анализаторе COBAS TaqMan 48.

Раздел И. Завершение постановки в анализаторе COBAS TaqMan

И1. После окончания постановки в анализаторе COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48, распечатайте отчет с результатами. Проверьте наличие значков и сообщений об ошибках в отчете с результатами. Интерпретация образцов, отмеченных значками и комментариями, описана в разделе *Результаты*. После принятия результатов, сохраните данные в архиве.

И2. Выньте использованные К-пробирки из анализатора COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48.

Результаты

Анализатор COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 автоматически определяет концентрацию РНК ВИЧ-1 в образцах и контролях. Концентрация РНК ВИЧ-1 выражается в копиях (ср)/мл. Фактор пересчета между копиями РНК ВИЧ-1 /мл и Международными единицами ВИЧ-1 (IU)/мл составляет 0.6 ср/IU, в соответствии с первым Международным стандартом ВОЗ для РНК ВИЧ-1 RNA для тестов, основанных на определении нуклеиновых кислот (NIBSC 97/656)³⁸. Данный фактор пересчета определен на основании тестирования с наборами COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5, COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5 и COBAS® TaqMan® HIV-1 Test для работы системой High Pure.

Программа AMPLILINK:

- Определяет пороговое значение (Ct) для РНК ВИЧ-1 и РНК КС ВИЧ-1.
- Определяет концентрацию РНК ВИЧ-1 исходя из значений Ct для РНК ВИЧ-1 и РНК КС ВИЧ-1 и лот-специфичных коэффициентов калибровки, указанных в штрих-кодах кассет.

- Определяет, укладываются ли рассчитанные значения копий/мл для HIV-1 L(+)C v2.0 и HIV-1 H(+)C v2.0 в заданные пределы.

Интерпретация результатов

Проверьте в окне результатов программы AMPLILINK или в распечатке результатов отсутствие значков и комментариев, указывающих на то, что постановка не может быть признана прошедшей. Для контролей необходимо проверить, укладываются ли полученные для них значения копий/мл в заданный диапазон. Если значение копий/мл для контроля не укладывается в заданный диапазон, система генерирует сигнальный значок, указывающий на то, что контроль не сработал.

Постановка считается прошедшей, если ни для одного из контролей [HIV-1 H(+)C v2.0, HIV-1 L(+)C v2.0 and CTM (-) C] не получены сигнальные значки.

Постановка не прошла, если для контролей HIV-1 получен какой-либо из следующих сигналов ошибки:

Для негативного контроля:

Сигнал ошибки	Результат	Интерпретация
_N_C_INVALID	Не действителен	Не достоверный результат или «достоверный» результат, не оказавшийся негативным по HIV-1

Для низкотитражного позитивного контроля HIV-1:

Сигнал ошибки	Результат	Интерпретация
_L_LPCINVALID	<2.00E+01 cp/ml	Контроль ниже диапазона определения
_L_LPCINVALID	Target Not Detected	Контроль ниже диапазона определения
_L_LPCINVALID	A numeric titer X.XXE+XX cp/ml	Контроль за пределами диапазона определения
_L_LPCINVALID	>1.00E+07 cp/ml	Контроль выше диапазона определения
_L_LPCINVALID	Invalid	Результат не достоверен

Для высокотитражного позитивного контроля HIV-1:

Сигнал ошибки	Результат	Интерпретация
_H_HPCINVALID	<2.00E+01 cp/ml	Контроль ниже диапазона определения
_H_HPCINVALID	Target Not Detected	Контроль ниже диапазона определения
_H_HPCINVALID	A numeric titer X.XXE+XX cp/ml	Контроль за пределами диапазона определения
_H_HPCINVALID	>1.00E+07 cp/ml	Контроль выше диапазона определения
_H_HPCINVALID	Invalid	Результат не достоверен

Если постановка не прошла успешно, необходимо целиком повторить все этапы постановки – обработку образцов и контролей, амплификацию и детекцию.

Интерпретация результатов:

Если постановка прошла успешно, проверьте в распечатке результатов наличие сигналов ошибки и комментариев для каждого образца. Результаты интерпретируются следующим образом:

- ⇒ В результатах прошедшей успешно постановки для отдельных образцов могут находиться как достоверные, так и недостоверные результаты, в зависимости от выданных программой сигналов ошибки и/или комментариев.

Результаты для образцов интерпретируются следующим образом:

Комментарий	Интерпретация
Target Not Detected	Значение Ct для HIV-1 выше предела, установленного для теста, или значение Ct для HIV-1 не получено. Результат регистрируется как «РНК HIV-1 не выявлена»
<2.00E+01 cp/ml	Рассчитанное значение копий/мл ниже диапазона определения теста. Результат регистрируется как «РНК HIV-1 выявлена в концентрации ниже 20 копий РНК HIV-1/мл»
≥ 2.00E+01 cp/mL and ≤ 1.00E+07 cp/mL	Рассчитанное значение копий/мл находится в пределах диапазона определения теста, и составляет не менее 20 копий/мл и не более 1.00E+07 копий/мл.
>1.00E+07 cp/ml	Рассчитанное значение копий/мл выше диапазона определения теста. Результат регистрируется как «более 1.00E+07 копий РНК HIV-1/мл». Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец 1:100 HIV-1-негативной человеческой плазмой и повторить тест. Умножьте полученный при повторном тестировании результат на коэффициент разведения образца.

Примечание: Образцы с концентрацией выше диапазона определения теста могут также давать недействительный результат («Invalid») с сигналом ошибки «QS_INVALID». Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец 1:100 HIV-1-негативной человеческой плазмой и повторить тест. Умножьте полученный при повторном тестировании результат на коэффициент разведения образца.

Контроль качества

В каждую постановку должны быть включены негативный контроль COBAS TaqMan, низкотитражный позитивный контроль COBAS TaqMan HIV-1 v2.0 и высокотитражный позитивный контроль COBAS TaqMan HIV-1 v2.0. Постановка считается прошедшей, если ни для одного из контролей [HIV-1 H(+)/C v2.0, HIV-1 L(+)/C v2.0 and CTM (-) C] не получены сигнальные значки.

Негативный контроль

Для CTM(-) C должен быть получен результат «Target Not Detected» (РНК-мишень не выявлена). Если CTM (-) C не соответствует этому критерию, не действительной признается вся постановка. Необходимо повторить всю процедуру (обработка образцов и контролей, амплификация и детекция). Если результат для CTM(-)C постоянно не достоверен, обратитесь за технической помощью в ваше местное представительство Roche.

Позитивные контроли

Заданный диапазон значений для HIV-1 L(+)/C v2.0 и HIV-1 H(+)/C v2.0 специфичен для каждого лота и указывается в штрих-кодах кассет реагентов теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

Значения РНК HIV-1 в копиях/мл для HIV-1 L(+)/C v2.0 и HIV-1 H(+)/C v2.0 должны укладываться в заданный диапазон значений. Если один или оба позитивных контроля не соответствуют этому критерию, не действительной признается вся постановка. Необходимо повторить всю процедуру (обработка образцов и контролей, амплификация и детекция). Если рассчитанные титры РНК HIV-1 для одного или обоих позитивных контролей постоянно не укладываются в заданный диапазон, обратитесь за технической помощью в ваше местное представительство Roche.

Требования к постановке

Как и при любых постановках, для качественного прохождения теста важно качество лабораторной работы.

Ограничения теста

1. Данный тест предназначен для работы только с образцами человеческой плазмы, собранной с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Тестирование прочих образцов может привести к получению неверных результатов.
2. Тест COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. не испытывали на образцах, содержащих ВИЧ-1 группы N, и на образцах, содержащих ВИЧ-2.
3. Надежность результатов зависит от аккуратности при сборе, транспортировке, хранении и обработке образцов.
4. Присутствие в мастермиксе COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. фермента AmpErase снижает риск контаминации ампликонами. Однако контаминации позитивными контролями HIV-1 или клиническими образцами можно избежать только при аккуратной работе в лаборатории и четком следовании инструкциям, приведенным в данном Приложении.
5. С данным набором может работать только персонал, имеющий опыт постановок в ПЦР.
6. Данный набор предназначен только для работы с прибором COBAS AmpliPrep и анализаторами COBAS Taqman или COBAS Taqman 48.
7. Мутации в консервативных участках генома ВИЧ-1, являющихся мишенью для праймеров и/или зондов теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, встречаются редко, однако они могут приводить к неточному количественному определению или неудаче при детекции вируса.
8. Выявление РНУК ВИЧ-1 зависит от количества вирусных частиц в образце, на которое влияют методы сбора образцов и ряд факторов организма (например, возраст, наличие симптомов и/или стадия инфекции).
9. Вследствие объективных различий между методами, рекомендуется до перехода с одного метода на другой провести внутрилабораторные испытания для сравнения полученных при параллельном тестировании результатов.

Ингибирующие вещества

Было показано, что повышенные уровни триглицеридов (до 3500 мг/дл), билирубина (до 28 мг/дл), альбумина (до 8900 мг/дл), гемоглобина (до 900 мг/дл) и человеческой геномной ДНК (до 0.4 мг/дл) в образце, а также такие аутоиммунные заболевания и их маркеры, как анти-ядерные антитела, ревматоидный артрит, системный эритематоз, не влияют на количественное определение РНК HIV-1 в данном тесте и не влияют на специфичность теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями CLSI Guideline EP7-A2 с использованием одной серии набора реагентов COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0.

Следующие лекарственные препараты тестировались трехкратно в пиковых концентрациях в плазме (Стах), и было показано отсутствие их влияния на количественное определение РНК ВИЧ-1 и специфичность теста AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0:

Нуклеотидные ингибиторы ДНК-полимеразы Тенофовир DF Адефовир дипивоксил Телбивудин	Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы Ламивудин Ставудин Зидовудин Абакавир Диданозин
Ингибиторы протеазы ВИЧ Индинавир Ритонавир Саквинавир Нелфинавир Ампренавир Лопинавир/Ритонавир	Не-нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ Невирапин Эфавиренз Эмтрицитабин
	Ингибиторы интегразы ВИЧ Ралтегравир
	Смешанные ингибиторы ВИЧ Энфувиртид
Иммуномодуляторы Рибавирин Пегинтерферон альфа-2а Пегинтерферон альфа-2b	Антидепрессанты Пароксетин HCl Флуоксетин Сертралин
	Препараты для терапии вируса герпеса Ганцикловир Валганцикловир Ацикловир

Лабораторные испытания теста

А. Предел чувствительности

Предел чувствительности теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 определяли в постановке разведений второго стандарта ВИЧ-1 (NIBSC Code 97/650⁴¹, ВИЧ-1 субтип В) в ВИЧ-1-негативной человеческой плазме с ЭДТА. Предел чувствительности определяли с использованием трех разных серий набора, с каждой серией набора тестировали три независимых серии разведения. Всего каждую концентрацию тестировали в 126 повторах. Исследования проводили в соответствии с рекомендациями CLSI Guideline EP17-A. Концентрация РНК ВИЧ-1 в плазме с ЭДТА, выявляемая с частотой более 95%, по данным Пробит-анализа, составляет 20 копий/мл, или 33 МЕ/мл. Результаты для отдельных серий составили 17.7 копий/мл (95% доверительный интервал: 13.7 – 26.9 копий/мл) для серии 1; 17.0 копий/мл (95% доверительный интервал: 14.0 – 22.6 копий/мл) для серии 2 и 14.2 копий/мл (95% доверительный интервал: 11.2 – 22.1 копий/мл) для серии 3. Обобщенные результаты для трех серий теста приведены в Таблице 2.

Таблица 2

Предел чувствительности теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, определенный с использованием второго стандарта ВИЧ-1В в плазме с ЭДТА

Исходная концентрация ВИЧ-1 (МЕ/мл)	Исходная концентрация ВИЧ-1 (копии/мл)	Общее число тестов	Число позитивных тестов	Частота попадания
100	60	126	126	100%
67	40	186	185	99%
50	30	126	125	99%
33	20	126	124	98%
25	15	59	53	90%
17	10	126	108	86%
8	5	125	66	53%
0	0	126	0	0%
Частота попадания по PROBIT 95%		27.5 МЕ/мл [95% доверительный интервал: 23.8 - 33.0 копий/мл] 16.5 копий/мл [95% доверительный интервал: 14.3 - 19.8 копий/мл]		

Дополнительно с двумя сериями набора тестировали серии разведений супернатанта клеточной культуры ВИЧ-1 группы М субтипов А-Н в негативной по ВИЧ-1 плазме с ЭДТА. Для каждого субтипа ВИЧ-1 тестировали в 24 повторах для каждой серии набора 4 концентрации, соответствующие примерно 10, 30, 50 и 75 копий/мл. Определение номинальной концентрации в образцах клеточных культур проводили по среднему титру в тестах COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5, VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) и Abbott RealTime HIV-1. Было показано, что для всех субтипов вируса с частотой выявления более 95% определяется концентрация 32 копии/мл. Обобщенные результаты для трех серий теста приведены в Таблице 3.

Таблица 3
Определение предела чувствительности теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0
для субтипов A-H ВИЧ-1 group M методом определения частоты выявления $\geq 95\%$

Субтип	Обозначение изолята	Наименьшая концентрация (копии/мл), выявляемая с частотой $\geq 95\%$
A	92UG029	10
A	4237A/98	29
B	92TH026	32
B	8E5/LAV	30
C	92BR025	30
C	3777A/97	11
D	92UG021	30
D	92UG035	11
E	92TH022	12
E	92TH009	14
F	93BR020	32
G	ARP173/RUS70	13
H	HIV V1557	16

Б. Воспроизводимость

Воспроизводимость и линейность теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 определяли при тестировании серии разведений высококонцентрированного стока клеточной культуры ВИЧ-1В в ВИЧ-1-негативной человеческой плазме с ЭДТА. Определение концентраций в панели ВИЧ-1В проводили методом, стандартизованным относительно первого международного стандарта ВОЗ для РНК ВИЧ-1 для тестов на основе выявления нуклеиновых кислот (NIBSC 97/656)³⁶.

Всего анализировали три серии наборов реагентов в 15 постановках на каждую серию, используя для каждой постановки 6 разведений в трех повторах каждое. Каждый образец проходил полную постановку теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, включая пробоподготовку, амплификацию и детекцию.

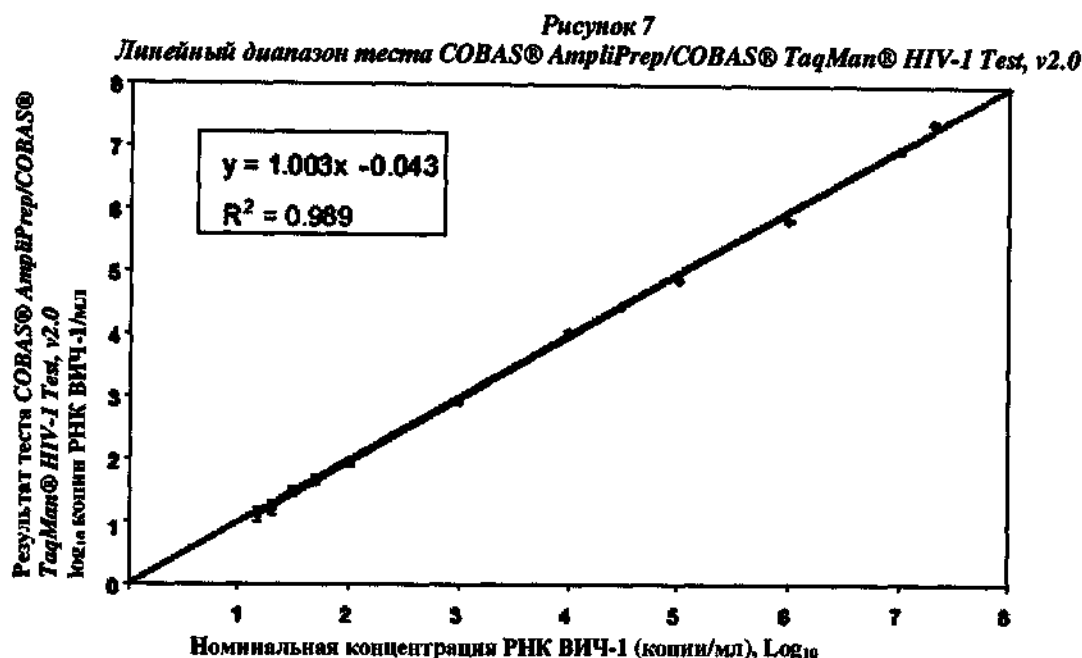
Таким образом, представленные данные о воспроизводимости теста охватывают все аспекты постановки теста. Результаты для каждой серии, а также обобщенные результаты для трех серий теста приведены в Таблице 4.

Таблица 4
Воспроизводимость теста AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

Исходная концентрация ВИЧ-1 [копии/мл]	Серия 1	Лот 2	Лот 3	Обобщенные данные для трех серий	
	Общая SD [log10]	Общая SD [log10]	Общая SD [log10]	Общая SD [log10]	Общий Log-нормальный CV (%)
1.0E+02	0.19	0.16	0.17	0.17	41
1.0E+03	0.07	0.09	0.07	0.08	20
1.0E+04	0.07	0.07	0.06	0.07	16
1.0E+05	0.04	0.05	0.07	0.06	15
1.0E+06	0.10	0.09	0.10	0.10	25
1.0E+07	0.11	0.12	0.14	0.13	33

В. Линейный диапазон

Линейные результаты теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 были получены в диапазоне концентраций от 20 (Log10 = 1.30) копий РНК ВИЧ-1/мл до 1.0E+07 (Log10 = 7.00) копий РНК ВИЧ-1/мл. определение линейного диапазона проводили в соответствии с рекомендациями CLSI Guideline EP6-A с двумя сериями набора COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 для серии разведений высококонцентрированного стока клеточной культуры ВИЧ-1. Анализировали 2 серии набора в 15 постановках на каждую серию, в каждой постановке тестировали 12 разведений в трех повторах каждое. На Рисунке 7 показаны результаты для одной серии набора 7.



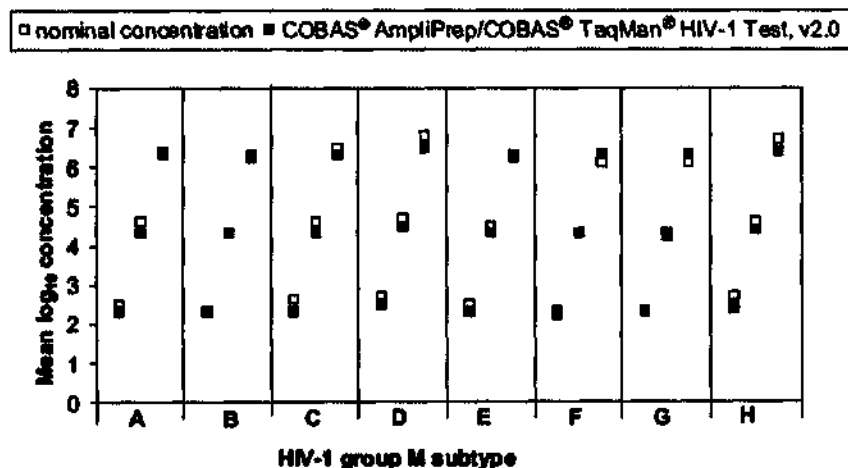
Г. Определение разных генотипов

Исходя из различий нуклеотидных последовательностей различают восемь субтипов в группе М ВИЧ-1. Субтипы обозначаются заглавными буквами латинского алфавита, от А до Н¹⁰.

Рабочие характеристики теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 для разных субтипов ВИЧ-1 определяли при тестировании культуральных стоков, представляющих каждый субтип от А до Н группы М ВИЧ-1. Номинальные концентрации в стоках клеточной культуры определяли в тестах COBAS AmpliPrep/COBAS AMPLICOR HIV-1 MONITOR Test, v1.5, VERSANT® HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) и Abbott RealTime HIV-1. Исходя из определенных концентраций стоков, для каждого субтипа готовили концентрации ВИЧ-1, равные 2.0E+02, 2.0E+04 и 2.0E+06 копий/мл методом разведения культуральных стоков плазмой с ЭДТА. После этого концентрации определяли в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 в 10 повторах для каждой концентрации каждого субтипа с использованием одного лота теста. Полученные результаты сравнивали с номинальными концентрациями.

Анализ 8 субтипов ВИЧ-1 в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 дал сходные результаты для всех образцов тестируемых субтипов группы М ВИЧ-1 (Рисунок 8). Полученные средние значения log₁₀ концентраций находились в пределах ± 0.3 log₁₀ от соответствующих значений номинальных концентраций.

Рисунок 8
Точность теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 при тестировании супернатантов клеточных культур

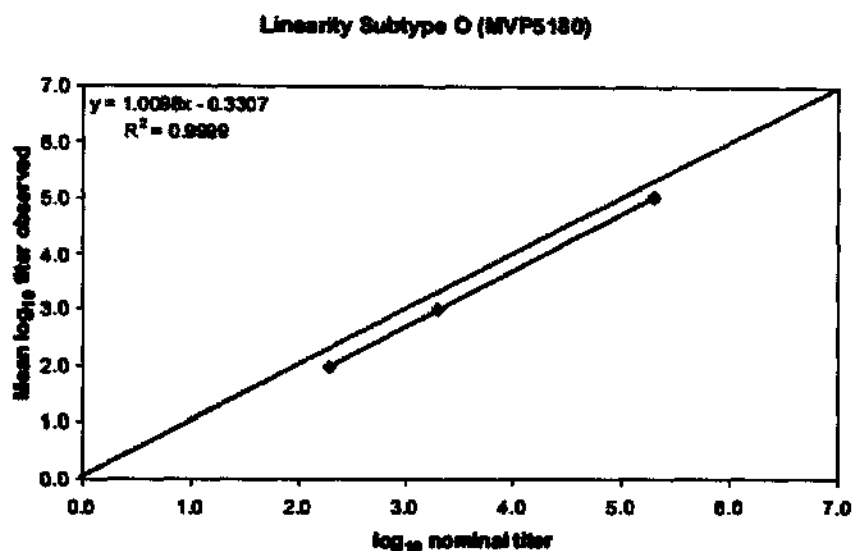


Д. Выявление ВИЧ-1 группы О

Разведения супернатанта клеточной культуры ВИЧ-1 группы О (изолят MVP5180) в плазме человека с ЭДТА анализировали с двумя сериями набора. Тестировали 4 разведения с концентрациями примерно 10, 30, 50 и 75 копий/мл в 24 повторах для каждой серии набора. Определение номинальной концентрации стока клеточной культуры проводили с помощью теста Abbott RealTime HIV-1. Исследования показали, что концентрация 30 копий/мл выявляется с частотой более 95%.

Сток клеточной культуры ВИЧ-1 группы О развели до номинальной концентрации примерно $2.00E+02$, $2.00E+03$ и $2.00E+05$ копий/мл в плазме с ЭДТА. Затем полученные разведения тестировали в 10 повторах в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 с одной серией набора. Полученные средние $\log_{10}$ титры всех концентраций продемонстрировали линейность и находились в пределах $\pm 0.3 \log_{10}$ соответствующих номинальных $\log_{10}$ концентраций (см. Рисунок 9).

Рисунок 9
Определение чувствительности выявления ВИЧ-1 группы О
в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0



Дополнительно, 10 образцов клеточных культур и один разведенный клинический образец (11613), содержащие ВИЧ-1 группы О тестировали параллельно с наборами COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 и Abbott RealTime HIV-1. Все 11 образцов были положительными в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 (см. Таблицу 5). Полученные в обоих тестах значения $\log_{10}$ титров для всех 11 образцов отличались от средних значений не более чем на $0.1 \log_{10}$.

Таблица 5
Выявление изолятов ВИЧ-1 группы О в тесте
COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0

Обозначение изолята	Log10 титра в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0	Log10 титра в тесте Abbott RealTime HIV-1
BBI PRD 301, BV-5050	3.09	2.42
BBI PRD 301, BV-5051	2.86	3.35
BBI PRD 301, BV-5003	3.00	2.71
BBI PRD 301, BV-5024	2.87	2.69
MVP5180	2.78	3.25
HIV-1 CA-9	3.31	3.08
BCF01	5.71	5.61
BCF02	5.16	5.39
BCF07	4.27	4.81
BCF011	5.57	5.26
11613	2.97	2.05
Средний титр $\log_{10}$	3.78	3.69

Е. Специфичность

Специфичность теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 определяли с двумя сериями набора при анализе отрицательных по ВИЧ-1 образцов плазмы донорской крови с ЭДТА. Всего 660 индивидуальных образцов плазмы с ЭДТА дали валидные результаты, все они были отрицательны по РНК ВИЧ-1 в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. На основании полученных результатов специфичность теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 составила 100% (односторонний нижний доверительный предел 95%: $\geq 99.6\%$).

Ж. Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0 оценивали методом внесения культивируемых организмов (вирусов, бактерий, дрожжей) или ДНК (HTLV-2) в концентрации $5E+04$ частиц/мл в негативную по ВИЧ-1 человеческую плазму с ЭДТА и в позитивную по ВИЧ-1 человеческую плазму с ЭДТА с концентрацией ВИЧ-1 $1.5E+02$ копий/мл (см. Таблицу 6). Ни один из тестируемых микроорганизмов не давал перекрестной реактивности в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Титры ВИЧ-1-положительных образцов не отличались более чем на $\pm 0.5 \log_{10}$ от исходных значений.

Таблица 6

Организмы, тестируемые при изучении аналитической специфичности

Вирусы	Бактерии
Аденовирус тип 2	<i>Staphylococcus aureus</i>
Цитомегаловирус	<i>Propionibacterium acnes</i>
Вирус Эпштейн-Барр	Дрожжи
Вирус герпеса человека тип 6	<i>Candida albicans</i>
Вирус простого герпеса тип 1	
Вирус простого герпеса тип 2	
T-клеточный лимфотропный вирус человека тип 1	
T-клеточный лимфотропный вирус человека тип 2	
Вирус гриппа А	
Вирус гепатита А	
Вирус гепатита В	
Вирус гепатита С	

З. Корреляция с другими методами

Результаты тестирования 92 неразведенных клинических образцов, положительных по ВИЧ-1, а также 34 разведенных супернатантов клеточных культур, полученные в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, сравнивали с результатами, полученными в тестах COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5, COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test и Abbott RealTime HIV-1. Образцы, представляющие субтипы А - Н ВИЧ-1 группы М, а также циркулирующие рекомбинантные формы, анализировали в двух независимых лабораториях. Всего в 4 тестах анализировали 126 образцов, перекрывающих динамический диапазон теста COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0. Для сравнения результатов методом регрессионного анализа использовали только пары валидных титров, укладывавшихся в динамические диапазоны обоих тестов (см. Рисунки 10 - 12).

Рисунок 10
Корреляция результатов, полученных в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0
и тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® AMPLICOR® HIV-1 MONITOR Test, v1.5

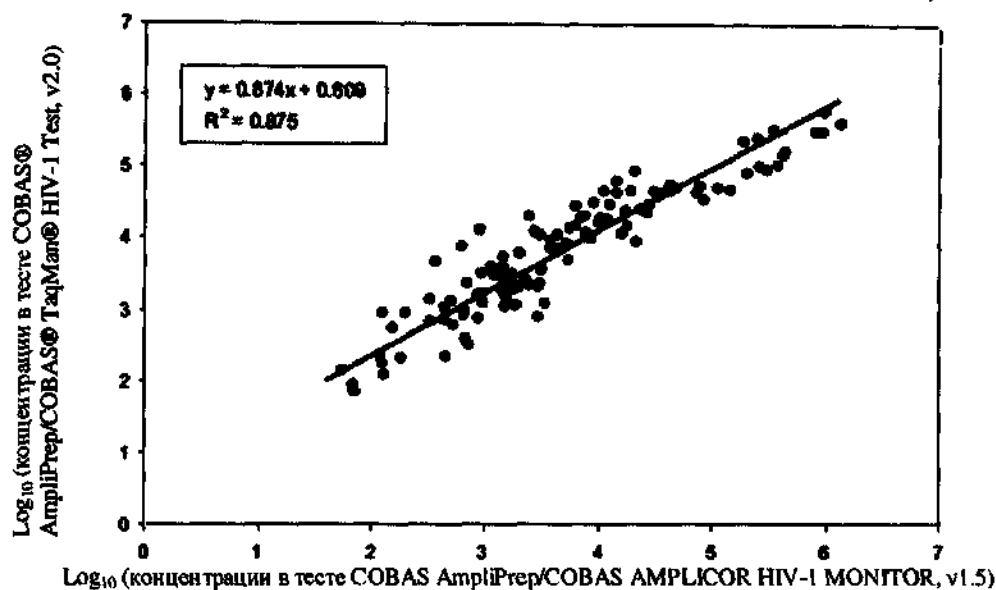


Рисунок 11
Корреляция результатов, полученных в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0
и в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test

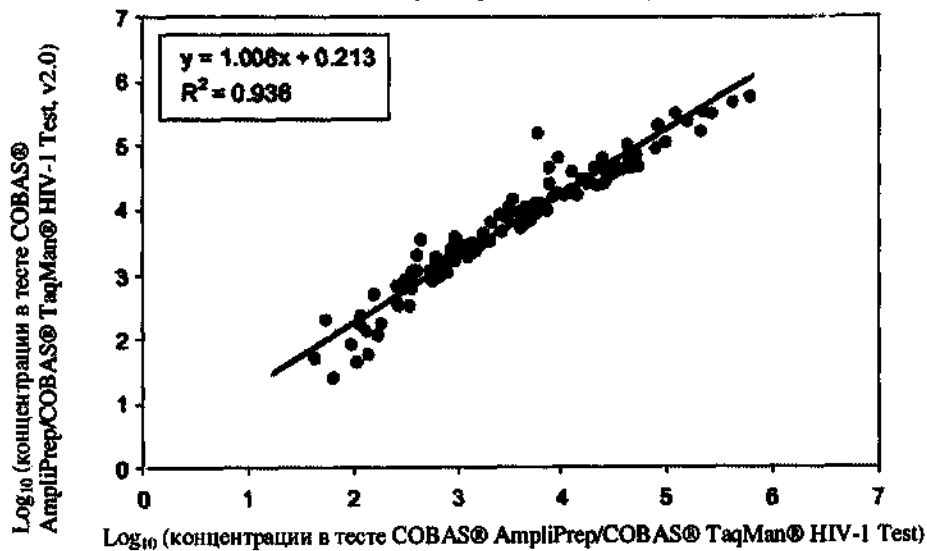
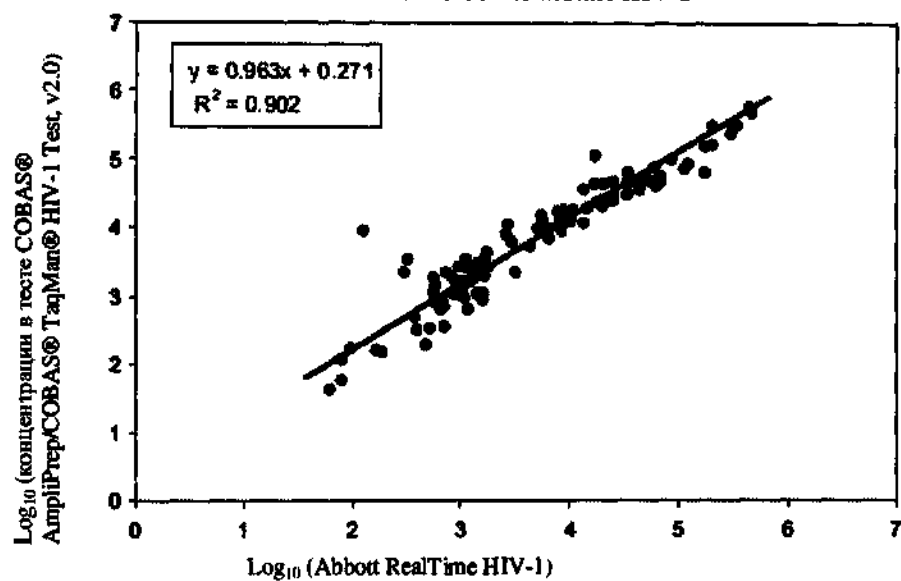


Рисунок 12
Корреляция результатов, полученных в тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0
и в тесте Abbott RealTime HIV-1



Литература

1. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. 1983. Isolation of a Tlymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
2. Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500.
3. Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., White, G., Foster, P., Markham, P.D. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
4. Curran, J.W., Jaffe, H.W., Hardy, A.M., Morgan, W.M., Selik, R.M., Dondero, T.J. 1988. Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. *Science* 239:610-616.
5. Gaines, H., von Sydow, M.A., von Stedingk, L.V. 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* 4:995-999.
6. Tindall, B., and Cooper, D.A. 1991. Primary HIV-1 infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 5:1-14.
7. Daar, E.S., Moudgil, T., Meyer, R.D., Ho, D.D. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine* 324:961-964.
8. Clark, S.J., Saag, M.S., Decker, W.D. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *New England Journal of Medicine* 324:954-960.
9. Albert J., Abrahamsson B., Nagy K., Aurelius E., Gaines H., Nystrom G., Fenyo E.M. 1990. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* 4:107-112.
10. Horsburgh, C.R. Jr., Ou, C.Y., Jason, J., Holmberg, S.D., Longini, I.M. Jr., Schable, C., Mayer, K.H., Lifson, A.R., Schochetman, G., Ward, J.W., et al. 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* 16:637-640.
11. Schnittman, S.M., Psallidopoulos, M.C., Lane, H.C., Thompson, L., Baseler, M., Massari, F., Fox, C.H., Salzman, N.P., Fauci, A.S. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* 245:305-308. Erratum in: *Science* 1989 245, preceding 694.
12. Schnittman, S.M., Greenhouse, J.J., Psallidopoulos, M.C., Baseler, M., Salzman, N.P., Fauci, A.S., Lane, H.C. 1990. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Annals of Internal Medicine* 113:438-443.
13. Pantaleo, G., Graziosi, C., Fauci, A.S. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *New England Journal of Medicine* 328:327-335.
14. Piatak, M. Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., Hahn, B.H., Shaw, G.M., Lifson, J.D. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259:1749-1754.
15. Fauci, A.S., Schnittman, S.M., Poli, G., Koenig, S., Pantaleo, G. 1991. NIH conference: immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Annals of Internal Medicine* 114:678-693.
16. Coffin, J.M. 1995. HIV-1 population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267:483-489.
17. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-126.
18. Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emami, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H., et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117-122.
19. O'Brien, W.A., Hartigan, P.M., Martin, D., Esinhart, J., Hill, A., Benoit, S., Rubin, M., Simberkoff, M.S., Hamilton, J.D. 1996. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4 lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *New England Journal of Medicine* 334:426-431.
20. Welles, S.L., Jackson, J.B., Yen-Lieberman, B., Demeter, L., Japour, A.J., Smeaton, L.M., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., D'Aquila, R.T., Reichelderfer, P.A., Richman, D.D., Reichman, R., Fischl, M., Dolin, R., Coombs, R.W., Kahn, J.O., McLaren, C., Todd, J., Kwok, S., Crumpacker, C.S. 1996. Prognostic value of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no zidovudine therapy. AIDS Clinical Trials Group Protocol 116A/116B/117 Team. *Journal of Infectious Diseases* 174:696-703.
21. Coombs, R.W., Welles, S.L., Hooper, C., Reichelderfer, P.S., D'Aquila, R.T., Japour, A.J., Johnson, V.A., Kuritzkes, D.R., Richman, D.D., Kwok, S., Todd, J., Jackson, J.B., DeGruttola, V., Crumpacker, C.S., Kahn, J. 1996. Association of plasma Human Immunodeficiency Virus Type I RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups. *Journal of Infectious Diseases* 174:704-712.

22. Hammer, S., Crumpacker, C., D'Aquila, R., Jackson, B., Lathey, J., Livnat, D., Reichelderfer, P. 1993. Use of virologic assays for detection of human immunodeficiency virus in clinical trials: Recommendations of the AIDS Clinical Trials Group Virology Committee. *Journal of Clinical Microbiology* 31:2557-2564.
23. Schochetman, G., George, J.R., ed. AIDS testing: a comprehensive guide to technical, medical, social, legal and management issues. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1994.
24. Mulder, J., McKinney, N., Christopherson, C., Sninsky, J., Greenfield, L., Kwok, S. 1994. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: Application to acute retroviral infection. *Journal of Clinical Microbiology* 32:292-300.
25. Dewar, R.L., Highbarger, H.C., Sarmiento, M.D., Todd, J.A., Vasudevachari, M.B., Davey, R.T. Jr., Kovacs, J.A., Salzman, N.P., Lane, H.C., Urdea, M.S. 1994. Application of branched DNA signal amplification to monitor human immunodeficiency virus type 1 burden in human plasma. *Journal of Infectious Diseases* 170:1172-1179.
26. van Gemen, B., Kievits, T., Schukink, R., van Strijp, D., Malek, L.T., Sooknanan, R., Huisman, H.G., Lens, P. 1993. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA during HIV-1 primary infection. *Journal of Virological Methods* 43:177-187.
27. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230:1350-1354.
28. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
29. Mullis, K.B., Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350.
30. Q. Meng, C. Wong, A. Rangachari, S. Tamatsukuri, M. Sasaki, E. Fiss, L. Cheng, T. Ramankutty, D. Clarke, H. Yawata, Y. Sakakura, T. Hirose, and C. Impraim. 2001. Automated Multiplex Assay System for Simultaneous Detection of Hepatitis B Virus DNA, Hepatitis C Virus RNA, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (8):2937-2945.
31. Smith, E.S., Li, A.K., Wang, A.M., Gelfand, D.H., Myers, T.M. 2003. Amplification of RNA: High-Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-Activated Thermostable DNA Polymerase. In *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Dieffenbach C.W. and Dveksler G.S., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp.211-219.
32. Kwok, S., Sninsky, J.J. 1993. PCR detection of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA sequences. In: *Diagnostic Molecular Biology: Principles and Applications*. eds. Persing, D.H., Smith, T.F., Smith, F.C., et al. ASM, Washington, D.C.
33. Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125-128.
34. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 10:413-417.
35. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
36. Holmes, H., Davis, C., Heath, A., Hewlett, I. and Lelie, N. 2001. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *Journal of Virological Methods* 92:141-150.
37. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Third Edition. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.
39. International Air Transport Association. Dangerous Goods Regulations, 41st Edition, 2000. 704 pp.
40. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, and Korber B: HIV-1 Nomenclature proposal: A reference guide to HIV-1 classification. In: *Human Retroviruses and AIDS 1999: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences* (Kuiken C, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins JL, Sodroski J, and Wolinsky S, eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1999, pp. 492-505.
41. Davis, C., Berry, N., Heath, A. and Holmes, H. 2008. An international collaborative study to establish a replacement World Health Organization International Standard for human immunodeficiency virus 1 RNA nucleic acid assays. *Vox Sanguinis* 95: 218-225.



Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA
A Member of the Roche Group



Distributed by

Roche Diagnostics
Indianapolis, IN 46256 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800 526 1247)

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics S.L.
E-08006 Barcelona

Roche Diagnostics
H7V 4A2 Laval, Quebec
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics
F-38240 Meylan

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics SpA
Piazza Durante 11
I-20131 Milano

Distribuidor em Portugal:
Roche Farmacêutica Química, Lda
P-2700 Amadora

ROCHE, AMPERASE, AMPLICOR, AMPLILINK, COBAS, AMPLIPREP, HIGH PURE и TAQMAN являются торговыми марками Roche.

ROCHE RESPONSE CENTER является сервисным знаком Roche.

Защищенная РНК является патентованной технологией, разработанной совместно Ambion, Inc. и Cenetron Diagnostics, LLC.

Патенты США #5,677,124, #5,919,625, и #5,939,262. Защищенная РНК (Armored RNA®) является торговой маркой Ambion и Cenetron.

Microsoft и Windows XP являются зарегистрированными марками или торговыми марками Microsoft Corporation в США и/или других странах.

ProClim являются торговой маркой Rohm and Haas Company.

VERSANT® является зарегистрированной торговой маркой Bayer Corporation.

Цианиновые красители, используемые в данном продукте защищены патентом GE Healthcare Bio-Sciences Corp. и Carnegie Mellon University и используются Roche по лицензии исключительно в компонентах наборов для научных исследований и диагностики *in-vitro*. Любое использование данных наборов для других целей, помимо научных исследований и диагностики *in-vitro* требует получения лицензии от GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, U.S.A. и Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A.

Некоторые компоненты данного продукта защищены одним или более патентами США и их зарубежными эквивалентами, принадлежащими Chiron Corporation и используемыми по лицензии Roche Molecular Systems, Inc. и F. Hoffman-La Roche Ltd.

Некоторые компоненты данного продукта защищены одним или более патентами США и их зарубежными эквивалентами, принадлежащими Isis Pharmaceuticals и используемыми по лицензии Roche Molecular Systems, Inc. Licensed under US Patent

No. 5,407,796 other patents pending.

Copyright 2008, Roche Molecular Systems, Inc. All rights reserved.
11/2008

05328268001-01

Doc Rev. 1.0



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim





Тест COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 Для работы с системой High Pure

Для диагностики *IN VITRO*.

Тест COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0	HCV/HPS V2	48 тестов	P/N: 04861817 190
Набор High Pure System Viral Nucleic Acid Kit		48 тестов	P/N: 03502295 001

Назначение теста

Тест COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 для работы с системой High Pure System (HPS) является *in vitro* тестом, основанным на амплификации нуклеиновых кислот, и предназначен для количественного определения РНК вируса гепатита С (ВГС) генотипов с 1 по 6 в человеческой плазме или сыворотке крови путем ручной подготовки образцов с набором High Pure System Viral Nucleic Acid Kit и автоматической амплификации и детекции в анализаторе COBAS TaqMan 48. Тест предназначен для использования совместно с клиническими данными и другими лабораторными маркерами ВГС-инфекции. Тест может применяться для определения оценки вирусного ответа на противовирусную терапию на основании определения изменений уровней РНК ВГС в плазме или сыворотке крови. Последние исследования показали, что изменения уровней РНК ВГС в сыворотке/плазме крови на начальных этапах терапии позволяют прогнозировать длительный ответ на терапию интерфероном¹.

Тест COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 не предназначен для скрининга на ВГС крови и ее продуктов или для подтверждающей диагностики ВГС-инфекции.

Введение

Вирус гепатита С является самостоятельным этиологическим агентом, с которым связано 90-95% случаев посттрансфузионного гепатита не-А не-В^{2,4}. Геном ВГС представлен одноцепочечной РНК позитивной полярности длиной примерно 10,000 нуклеотидов, кодирующей 3,000 аминокислот. Являясь парентеральным вирусом, ВГС передается с кровью и ее продуктами. Широкое внедрение скрининга крови на ВГС привело к значительному снижению риска посттрансфузионного гепатита. Заболеваемость ВГС-инфекцией наиболее высока среди внутривенных наркоманов и, в меньшей степени, среди лиц, подвергшихся другим подкожным манипуляциям⁴. Распространенность ВГС-инфекции, по данным иммунологических серологических исследований, составляет от 1,0% в Европе до 5,3% в Африке⁵.

Наличие у инфицированных ВГС пациентов антител анти-ВГС привело к созданию иммунологических тестов для специфичного выявления этих антител. Выявление анти-ВГС, однако, указывает на имевший место контакт с ВГС, но не может рассматриваться как маркер текущей инфекции. Кроме того, прямое выявление вируса методом культивирования невозможно.

Определение уровней аланин аминотрансферазы (АЛТ) является суррогатным маркером ВГС-инфекции, однако этот метод не является прямым определением вирусии ВГС. Уровень подъема АЛТ не коррелирует напрямую с уровнем вирусии ВГС. В действительности, уровни АЛТ могут быть повышены по ряду причин, в результате воспаления в печени, не обязательно связанного с вирусным гепатитом. И только выявление и количественная оценка РНК ВГС методом амплификации нуклеиновых кислот в полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет адекватно оценивать активность вирусии^{6,8}. С помощью ПЦР выявление вирусии ВГС возможно до иммунологической сероконверсии^{9,10}, также данный метод позволяет определять изменения вирусной нагрузки у позитивных по антителам пациентов с хронической ВГС-инфекцией, получающих лечение интерфероном¹.

Принцип теста

В основе теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 лежат три основных процесса: (1) выделение вручную РНК ВГС из образца; (2) автоматизированная обратная транскрипция РНК-мишени, при которой образуется комплементарная цепь ДНК (кДНК), и (3) автоматизированная одновременная амплификация в ПЦР кДНК-мишени со специфичными ВГС праймерами, и детекция расщепляемого олигонуклеотидного зонда, меченного двумя красителями, специфичного для выявляемой мишени ВГС (ампликона).

Реагент Мастермикс содержит праймеры, специфичные для РНК ВГС, и для РНК количественного стандарта (КС) ВГС. Мастермикс разработан для одинаково эффективного количественного определения всех генотипов

ВГС с 1 по 6. Выявление амплифицированной ДНК производится с помощью мишень-специфичного и КС-специфичного олигонуклеотидных зондов, меченных каждый двумя красителями, что позволяет проводить независимое выявление ампликона ВГС и ампликона КС ВГС.

Количественное определение РНК ВГС проводится с помощью КС ВГС. КС ВГС является неинфекционной защищенной РНК, содержащей последовательность ВГС с сайтами посадки праймеров, идентичными РНК-мишени ВГС, и уникальным сайтом для зонда, благодаря которому ампликоны КС ВГС различаются от ампликонов мишени ВГС.

КС ВГС добавляют в каждый образец в известном количестве копий, и он проходит все этапы пробоподготовки, обратной транскрипции, ПЦР-амплификации и детекции. Анализатор COBAS TaqMan 48 рассчитывает концентрацию РНК ВГС в тестируемых образцах на основании сопоставления сигнала ВГС с сигналом КС ВГС в каждом образце и контроле. Применение КС ВГС позволяет компенсировать ингибирование и контролировать процессы пробоподготовки и амплификации, что обеспечивает более точное определение РНК ВГС в каждом образце.

Выбор мишени

Выбор последовательности-мишени РНК ВГС определяется наиболее консервативным участком генома среди разных генотипов ВГС^{11,12}. Показано, что 5'-нетранслируемая область генома ВГС является наиболее консервативным участком среди всех известных генотипов ВГС¹³. В тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 для обратной транскрипции и амплификации используются праймеры к последовательности консервативной 5'-нетранслируемой области генома ВГС.

Подготовка образцов

В тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 подготовка образцов плазмы с ЭДТА или сыворотки крови проводится вручную методом связывания нуклеиновых кислот на стекловолочке. Вирусные частицы ВГС лизируются при нагревании во время инкубации с протеазой и хаотропным лизирующим/связывающим буфером, высвобождающим нуклеиновые кислоты и защищающим РНК ВГС от действия РНКаз, содержащихся в плазме. Протеаза и известное количество молекул защищенной РНК КС ВГС вносятся в каждый образец вместе с лизирующим буфером. Затем в лизирующую смесь добавляется изопропанол, и смесь проходит при центрифугировании через колонку с картриджем из стекловолочка. Во время центрифугирования РНК ВГС и РНК КС ВГС связываются с поверхностью стекловолочка картриджа. Несвязавшийся материал – соли, белки, прочие клеточные компоненты, удаляются при центрифугировании. Связавшиеся нуклеиновые кислоты промываются и элюируются в водный раствор. Расходные материалы рассчитаны на одновременную обработку 12 или кратного этому числу образцов. Подготовленные образцы, содержащий свободную РНК ВГС и РНК КС ВГС, вносятся в реакционную смесь для амплификации и детекции. Затем с помощью реагентов, входящих в состав набора, происходит амплификация и детекция РНК ВГС и РНК КС ВГС в анализаторе COBAS TaqMan 48. Затем происходит обратная транскрипция РНК-мишени и РНК КС ВГС, их амплификация и одновременная детекция расщепляемых меченных олигонуклеотидных зондов, специфичных для мишени и КС.

Обратная транскрипция и ПЦР-амплификация

Обратная транскрипция

Реакция обратной транскрипции и ПЦР-амплификации проводится с помощью термостабильного рекомбинантного фермента *Thermus specie* ДНК-полимеразы (Z05). В присутствии ионов марганца (Mn²⁺) и определенном составе буфера, Z05 обладает как активностью обратной транскриптазы, так и ДНК-полимеразы^{14,15}. Это позволяет проводить обратную транскрипцию и ПЦР-амплификацию одновременно с детекцией ампликонов в реальном времени.

Обработанные образцы вносятся в амплификационную смесь в амплификационные пробирки (К-пробирки), в которых проводится обратная транскрипция и ПЦР-амплификация. Реакционная смесь нагревается, при этом обратный праймер специфично садится на РНК-мишень ВГС и РНК КС ВГС. В присутствии ионов Mn²⁺ и избытке трифосфатов дезоксинуклеотидов (dNTPs) – трифосфатов дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезоксцитидина, дезоксиуридина и дезокситимидина, полимеразы Z05 удлиняет севший на матрицу праймер, образуя ДНК-цепь, комплементарную РНК-мишени.

Амплификация мишени

После обратной транскрипции РНК-мишени ВГС и РНК КС ВГС, термоциклер анализатора COBAS TaqMan 48 нагревает реакционную смесь для того, чтобы денатурировать гибрид РНК:кДНК и открыть сайты посадки праймеров. При охлаждении смеси праймеры гибридизуются с ДНК-мишенью. Термостабильная ДНК-полимераза *Thermus specie* Z05 (Z05) в присутствии ионов Mn²⁺ и избытке dNTPs удлиняет присоединившиеся праймеры комплементарно матрице, в результате чего образуется молекула двуцепочечной ДНК, называемая ампликон. Анализатор COBAS TaqMan 48 автоматически повторяет эти этапы заданное количество циклов, в результате каждого цикла происходит удвоение числа ампликонов. Число циклов запрограммировано в

анализаторе COBAS TaqMan 48. Амплифицируется только участок генома ВГС, ограниченный праймерами; полный геном ВГС не амплифицируется.

Избирательная амплификация

Избирательность амплификации нуклеиновой кислоты – мишени достигается в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 за счет применения фермента AmpErase (урацил-N-гликозилазы) и трифосфата дезоксиуридина (dUTP). Фермент AmpErase распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин³³, но не ДНК, содержащей дезокситимидин. Дезоксиуридин отсутствует в природной ДНК, но всегда присутствует в ампликонах, поскольку трифосфат дезоксиуридина входит в состав смеси dNTPs в реагенте Мастермикс; поэтому дезоксиуридин содержится только в ампликонах. Дезоксиуридин делает контаминирующие ампликоны восприимчивыми к разрушению ферментом AmpErase до начала амплификации ДНК-мишени. Кроме того, фермент AmpErase разрушает любой неспецифический продукт, образовавшийся в результате первичной активации Мастермикса ионами марганца. Фермент AmpErase, входящий в состав реагента Мастермикс, катализирует расщепление содержащей дезоксиуридин ДНК по дезоксиуридиновому основанию, открывая дезоксирибозную цепь в позиции C1. При нагревании на первом этапе цикла, цепь ДНК ампликона разрывается в позиции дезоксиуридина и, следовательно, она не может в дальнейшем быть амплифицированной. Фермент AmpErase инактивируется при нагревании выше 55°C, т.е. на протяжении температурных циклов, и поэтому не разрушает ампликоны мишени, образующиеся в процессе ПЦР.

Детекция продуктов ПЦР в тесте COBAS® TaqMan®

В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV используется метод ПЦР в реальном времени^{17,18}. Применение зондов, меченных двумя флуоресцентными красителями, позволяет осуществлять в реальном времени детекцию накапливаемых продуктов ПЦР за счет мониторинга интенсивности эмиссии флуоресцентного красителя, высвобождающегося в процессе амплификации. Специфичные для ВГС и для КС ВГС олигонуклеотидные зонды мечены репортерным красителем и гасящим красителем. В тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0, для мечения зондов ВГС и КС ВГС использованы разные флуоресцентные репортерные красители. В интактных зондах репортерный краситель подавляется расположенным рядом гасящим красителем за счет эффекта переноса энергии Форстера. Во время ПЦР зонд гибридизуется с последовательностью-мишенью и разрушается из-за 5' → 3' нуклеазной активности ДНК-полимеразы Z05.

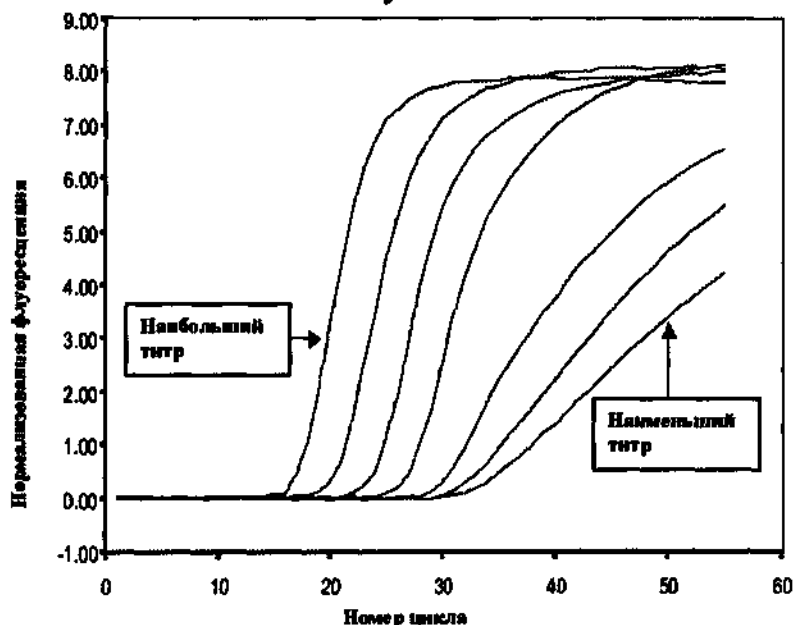
В результате репортерный и гасящий красители освобождаются и разделяются, гашение больше не происходит, и флуоресцентная активность репортерного красителя возрастает. Амплификация РНК ВГС и РНК КС ВГС измеряется независимо, на разных длинах волн. Этот процесс повторяется заданное число циклов, в каждом цикле происходит возрастание активности отдельных репортерных красителей, и происходит независимое определение РНК ВГС и РНК КС ВГС. Цикл ПЦР, при котором рост кривой накопления флуоресцентного сигнала становится экспоненциальным, определяется количеством исходного материала, внесенного в начале ПЦР.

Основы количественного определения в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0

Тест COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 является количественным в широком динамическом диапазоне, поскольку мониторинг ампликонов производится в экспоненциальной фазе амплификации. Чем выше титр ВГС, тем раньше флуоресцентный сигнал репортерного красителя зонда ВГС превысит пороговый уровень флуоресценции (Рисунок 1). Поскольку количество РНК КС ВГС одинаково во всех образцах, флуоресцентный сигнал репортерного красителя зонда КС ВГС должен появиться в одном и том же цикле для всех образцов (Рисунок 2). Для образцов, в которых значение флуоресценции КС не соответствует ожидаемому, концентрация рассчитывается с соответствующей поправкой. Появление специфического флуоресцентного сигнала выражается как критическое пороговое значение (Ct). Ct определяется как дробный номер цикла, в котором флуоресцентный сигнал репортерного красителя превысил заданный порог (заданный уровень флуоресценции), и началась экспоненциальная фаза роста сигнала (Рисунок 3). Большее значение Ct указывает на меньший титр мишени ВГС в образце. Двукратное увеличение титра соответствует с уменьшением на 1 Ct для РНК-мишени ВГС, а 10-кратное увеличение титра соответствует уменьшению на 3.3 Ct.

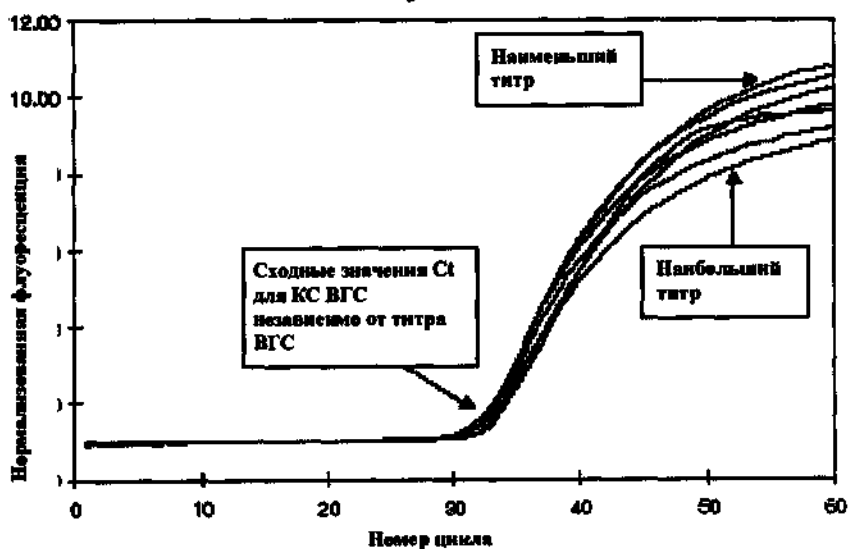
На рисунке 1 показаны кривые накопления для серии разведений в диапазоне 5-log_{10} . Чем выше концентрация вируса, тем на более ранний цикл смещается кривая накопления. Поэтому крайняя левая кривая соответствует максимальному титру вируса, а крайняя правая кривая – наименьшему титру.

Рисунок 1



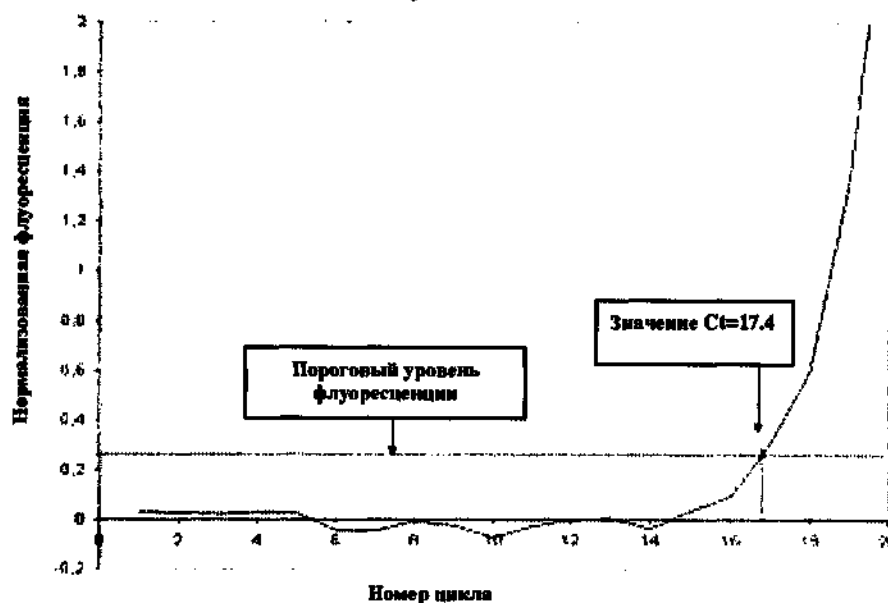
На рисунке 2 показаны кривые накопления флуоресцентного сигнала количественного стандарта для образцов серии разведений вируса в интервале 5-log_{10} . КС добавлен в каждый образец в одинаковом количестве. Величина S_t для КС одинакова независимо от титра вируса-мишени.

Рисунок 2



На рисунке 3 приведен пример поцикловой нормализации значений флуоресценции для каждой кривой. Дробное значение номера цикла (Ct) рассчитывается как точка, в которой флуоресцентный сигнал превышает пороговый уровень флуоресценции.

Рисунок 3



Количественное определение РНК ВГС

Количественное определение РНК ВГС в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 проводится за счет использования второй последовательности-мишени (количественный стандарт ВГС), вносимой в каждый тестируемый образец в известной концентрации. КС ВГС представляет собой защищенную неинфекционную РНК, несущую фрагменты последовательности ВГС, соответствующие сайтам посадки праймеров, идентичные последовательностям ВГС. КС ВГС содержит участки посадки праймеров для ВГС и в результате его амплификации образуется продукт такой же длины и нуклеотидного состава, что и фрагмент амплификации РНК-мишени ВГС. Участок посадки зонда детекции КС ВГС изменен, чтобы можно было различать ампликоны КС ВГС и ВГС.

В ПЦР на этапе посадки праймеров в анализаторе COBAS TaqMan 48, образцы освещаются светом определенной длины волны, и прошедший через фильтр флуоресцентный сигнал фиксируется для каждого образца. Данные от каждого образца затем корректируются с учетом флуктуаций прибора.

Полученные значения флуоресцентного сигнала отправляются прибором в программу AMPLILINK и хранятся в базе данных. Проводится предварительная проверка достоверности значений для РНК КС ВГС и РНК ВГС, и если данные не укладываются в заданные границы, система генерирует предупреждающие значки. После завершения предварительной проверки, значения флуоресценции обрабатываются и рассчитываются значения Ct для РНК ВГС и РНК КС ВГС. Прилагаемые к набору теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 лот-специфичные калибровочные константы используются для расчета значений титра для образцов и контролей на основании значений Ct для РНК ВГС и РНК КС ВГС. Тест COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 стандартизован относительно второго международного стандарта ВОЗ для РНК ВГС в тестах для выявления нуклеиновых кислот (NIBSC 96/798)¹⁹. Результаты титров представляются в Международных единицах (МЕ/мл или IU/mL).

Реагенты

Набор High Pure System Viral Nucleic Acid Kit
(P/N: 03502295 001)

48 тестов

LYS

2 x 25 мл

(Лизирующий/связывающий буфер)

Трис

52% Гуанидин-HCl

< 1% мочевины

20% Тритон X-100

52% Гуанидин-HCl



52% (в/в) Гуанидин-HCl

опасно

CAR

(РНК, лиофилизованная)

2 x 2 мг

PK

(Протеиназа К, лиофилизованная)

2 x 100 мг



99% Протеиназа К, лиофилизованная

опасно

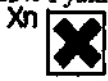
IRB

(буфер для удаления ингибиторов)

1 x 33 мл

Трис

65% Гуанидин-HCl



65% (в/в) Гуанидин-HCl

опасно

WASH

(промывочный буфер)

1 x 20 мл

Трис

NaCl

(добавить 50 мл этанола и 30 мл деионизованной воды)

ELB

(буфер для элюции)

1 x 30 мл

RS

(Набор штативов High Pure System Viral Nucleic Acid)

4 каждого

Штатив для лизиса

Штатив пробирок с фильтром с прилагаемым штативом для сброса

Штатив для элюции

Крышка

Зажимы

WR

(Штативы для сброса High Pure System Viral Nucleic Acid)

8 каждого

Набор COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0

HCV HPS V2

48 тестов

(P/N: 04861817 190)

Реагенты для пробоподготовки и контроля

HCV QS

2 x 1.0 мл

(Количественный стандарт ВГС COBAS® TaqMan®)

Фосфат натрия буфер

ЭДТА

< 0.005% поли rA РНК (синтетическая)

< 0.001% защищенная конструкция РНК ВГС, содержащая последовательности посадки праймеров ВГС и уникальный сайт посадки зонда (неинфекционная РНК в бактериофаге MS2)

Амарантовый краситель

Консервант Proclin® 300

и Проклин содержит смесь (3:1) 5-хлоро-2-метил-2-гисотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один



Раздражающее

R43: Может вызывать сенсibilизацию кожи.

HCV H(+)/C, v2.0

2 x 1.0 мл

(Высокотитражный позитивный контроль ВГС, v2.0)

< 0.001% Защищенная конструкция РНК ВГС, содержащая последовательности ВГС (неинфекционная РНК в бактериофаге MS2)

Негативная человеческая плазма, нереактивная по антителам к ВГС, антителам к ВИЧ-1/2, антигену ВИЧ p24 и HBsAg; негативная по РНК ВИЧ-1, РНК ВГС и ДНК ВГВ в ПЦР

0.1% ProClin 300

X Проклин содержит смесь (3:1) 5-хлоро-2-метил-2-тизотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

**Раздражающее**

R43: Может вызывать сенсibilизацию кожи.

HCV L(+)/C, v2.0

2 x 1.0 мл

(Низкотитражный позитивный контроль ВГС, v2.0)

< 0.001% Защищенная конструкция РНК ВГС, содержащая последовательности ВГС (неинфекционная РНК в бактериофаге MS2)

Негативная человеческая плазма, нереактивная по антителам к ВГС, антителам к ВИЧ-1/2, антигену ВИЧ p24 и HBsAg; негативная по РНК ВИЧ-1, РНК ВГС и ДНК ВГВ в ПЦР

0.1% ProClin 300

X Проклин содержит смесь (3:1) 5-хлоро-2-метил-2-тизотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

**Раздражающее**

R43: Может вызывать сенсibilизацию кожи.

CTM (-) C

4 x 1.0 мл

[Негативный контроль COBAS TaqMan (человеческая плазма)]

Негативная человеческая плазма, нереактивная по антителам к ВГС, антителам к ВИЧ-1/2, антигену ВИЧ p24 и HBsAg; негативная по РНК ВИЧ-1, РНК ВГС и ДНК ВГВ в ПЦР

0.1% ProClin 300

X Проклин содержит смесь (3:1) 5-хлоро-2-метил-2-тизотиазол-3-один и 2-метил-2Н-изотиазол-3-один

**Раздражающее**

R43: Может вызывать сенсibilизацию кожи.

Реагенты для амплификации и детекции**HCV MMX**

2 x 24 теста

(Мастермикс ВГС COBAS TaqMan)

2 x 1.4 мл

Трициновый буфер

Ацетат калия

Гидроксид калия

< 20% диметилсульфоксид

Глицерин

< 0.001% dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dTTP

< 0.001% прямой и обратный праймеры к 5'-нетранслируемой области ВГС

< 0.001% олигонуклеотидный аптамер

< 0.003% меченые олигонуклеотидные зонды, специфичные для ВГС и КС ВГС

< 0.05% Z05 ДНК-полимераза (бактериальная)

< 0.1% фермент AmpErase (урацил-N-гликозилаза) (бактериальная)

0.09% азид натрия

CAR/CTM Mn2+

2 x 24 теста

(раствор марганца COBAS TaqMan)

2 x 1.0 мл

< 1.2% ацетат марганца

Ледяная уксусная кислота

0.09% азид натрия

Требования предосторожности**А. Для диагностики IN VITRO.****Б.** данный тест не предназначен для скрининга крови и ее продуктов на наличие ВГС или для диагностики ВГС-инфекции.

В. Величины коэффициентов калибровки специфичны для каждой серии набора, а также специфичны для теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 для работы с системой High Pure. Данные значения могут не быть валидными при применении других методов пробоподготовки.

Г. Данный тест предназначен для работы с образцами человеческой сыворотки крови или плазмы, собранной с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Д. Не пипетировать ртом.

Е. Не есть, не пить и не курить в рабочих лабораторных зонах. При работе с образцами и реагентами набора работать в одноразовых перчатках, лабораторных халатах и защите для глаз. После работы с образцами и реагентами набора тщательно вымыть руки.

Ж. Избегать бактериальных и рибонуклеазных контаминаций реагентов при отборе аликвот из контрольных пробирок.

3. Рекомендуется использовать стерильные одноразовые пипетки и свободные от РНКаз наконечники для дозаторов.

И. Не пулизовать контроли из наборов разных лотов или разных пробирок одного лота.

К. Утилизировать неиспользованные реагенты, отходы и образцы в соответствии с государственными, федеральными и местными требованиями.

Л. Не использовать набор по истечении срока годности.

М. Данные по безопасности материалов (MSDS) могут быть получены в вашем местном представительстве Roche.

Н. Образцы и контроли необходимо рассматривать как инфекционные и при работе с ними выполнять требования лабораторной безопасности, например, приведенные в *Правилах биологической безопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях*¹⁹ и в документе NCCLS M29-A²¹. Тщательно мойте и дезинфицируйте рабочие поверхности свежим раствором 0.5% гипохлорита натрия в деионизированной или дистиллированной воде.

Примечание: Коммерческий жидкий бытовой отбеливатель обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5.25%. Разведение 1:10 бытового отбеливателя дает 0.5% раствор гипохлорита натрия.

О. Осторожно: СТМ (-) С, HCV L(+)С, v2.0 и HCV Н(+)С, v2.0 содержат человеческую плазму, полученную из человеческой крови. Исходный материал тестировался и оказался негативным по HBsAg, антителам к ВИЧ-1/2 и ВГС, и антигену р24 ВИЧ. Тестирование в ПЦР показало отсутствие в негативной человеческой плазме РНК ВГС, РНК ВГС и ДНК ВГВ. Ни один известный метод не дает полной гарантии отсутствия инфекционных агентов в продуктах человеческой крови. Поэтому все материалы человеческого происхождения должны рассматриваться как потенциально инфекционные. СТМ (-) С, HCV L(+)С, v2.0 и HCV Н(+)С, v2.0 необходимо рассматривать как инфекционные и при работе с ними выполнять требования лабораторной безопасности, например, приведенные в *Правилах биологической безопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях*¹⁹ и в документе NCCLS M29-A²¹. Тщательно мойте и дезинфицируйте все рабочие поверхности свежим раствором 0.5% гипохлорита натрия в деионизированной или дистиллированной воде.

П. HCV MMX и СТМ Мп2+ содержат азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцом и медью канализационных труб, образуя взрывоопасные азиды металлов. Выливая содержащие азид натрия растворы в лабораторную раковину, смывайте большим объемом воды для предотвращения образования азидов.

Р. При работе с любыми реагентами пользуйтесь одноразовыми перчатками, лабораторными халатами и защитой для глаз. Избегайте контакта этих материалов с кожей, глазами и слизистыми. В случае такого контакта немедленно смойте большим количеством воды, в противном случае могут возникнуть ожоги. Разлитые реагенты смойте водой и вытрите насухо.

Хранение и работа с набором

Реагенты для пробоподготовки

А. Храните после получения набора реагенты High Pure System Viral Nucleic Acid при 15 - 25°C.

Б. Храните буфер для элюции (ELB) и лизирующий/связывающий буфер (LYS) при 15 - 25°C. После открытия флаконов, храните ELB и LYS при 15 - 25°C. Открытые флаконы ELB и LYS должны быть использованы в течение 28 дней или до истечения срока годности, что наступит раньше.

В. После внесения буфера для элюции (ELB) для восстановления лиофилизированных РНК-носителя и протеиназы К, храните неиспользованные восстановленные растворы РНК-носителя (CAR) и протеиназы К (PK) при -15 - -25°C. Восстановленные растворы РНК-носителя и протеиназы К должны быть использованы в течение 28 дней или до истечения срока годности, что наступит раньше.

Г. После внесения этанола в буфер для удаления ингибиторов и внесения этанола и воды в промывочный буфер, храните буфер для удаления ингибиторов (IRB) и промывочный буфер (WASH) при 15 - 25°C. Данные рабочие растворы стабильны в течение 28 дней или до истечения срока годности, что наступит раньше.

Д. Лизирующий/связывающий рабочий раствор [Лизирующий/связывающий буфер с РНК-носителем, протеиназой К и HCV QS] должен быть использован немедленно после приготовления. Неиспользованный объем должен быть утилизирован.

Реагенты для амплификации и детекции

А. Не замораживайте реагенты и контроли.

Б. Храните HCV H(+)/C, v2.0, HCV L(+)/C, v2.0, СТМ (-) С, HCV QS, HCV MMX и СТМ Mn2+ при 2-8°C. Неоткрытые контроли и реагенты стабильны до конца срока годности. После открытия и отбора аликвоты на 12 образцов, оставшиеся объемы HCV MMX; HCV L(+)/C, v2.0; HCV H(+)/C, v2.0; HCV QS и СТМ Mn2+ хранят при 2 - 8°C. После открытия, HCV MMX; HCV L(+)/C, v2.0; HCV H(+)/C, v2.0; HCV QS и СТМ Mn2+ стабильны при 2 - 8°C в течение 28 дней или до истечения срока годности, что наступит раньше. После открытия неиспользованный остаток СТМ (-) С необходимо выбросить.

В. Рабочий мастермикс (полученный в результате добавления СТМ Mn2+ в HCV MMX) должен храниться при 2- 8°C в темноте. Выделенные образцы и контроли необходимо внести в рабочий мастермикс не позднее чем через 1 час после его приготовления.

Г. Выделенные образцы и контроли стабильны до 3 часов при 20 - 30°C, до 24 часов при 2-8°C или замороженными при -20°C до 1 недели.

Д. Амплификацию необходимо начать не позднее 2 часов после внесения выделенных образцов и контролей в рабочий мастермикс.

Предоставляемые материалы

Реагенты для пробоподготовки

А. Набор High Pure System Viral Nucleic Acid Kit

(P/N: 03502295 001)

LYS

(Лизирующий/связывающий буфер)

CAR

(РНК-носитель)

PK

(Протеиназа К)

IRB

(Буфер для удаления ингибиторов)

WASH

(Промывочный буфер)

ELB

(Буфер для элюции)

RS

(Набор штативов High Pure System Viral Nucleic Acid)

WR

(Штатив для сброса High Pure System Viral Nucleic Acid)

Реагенты для амплификации и детекции

В. Набор COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0

(P/N: 04861817 190)

HCV HPS V2

HCV QS

(Количественный стандарт COBAS® TaqMan® HCV)

HCV H(+)/C, v2.0

[высокотитражный (+) контроль ВГС, v2.0]

HCV L(+)/C, v2.0

[низкотитражный (+) контроль ВГС, v2.0]

СТМ (-) С

[отрицательный контроль COBAS® TaqMan® (человеческая плазма)]

HCV MMX

(мастермикс COBAS® TaqMan® HCV)

СТМ Mn2+

(раствор марганца COBAS® TaqMan®)

Необходимые непредоставляемые материалы

Приборы и программное обеспечение

• Анализатор COBAS TaqMan 48

- Программа AMPLILINK, v3.1 или выше
- Станция программы AMPLILINK
- Руководство пользователя анализатора COBAS TaqMan 48 для работы с программой AMPLILINK, Version 3.1.0 Series или Руководство пользователя анализатора COBAS TaqMan 48 для работы с программой AMPLILINK, Version 3.2 Series
- Руководство по работе с программой AMPLILINK Version 3.1 Series для работы анализатором COBAS TaqMan 48 или Руководство по работе с программой AMPLILINK Version 3.2 Series для работы анализатором COBAS TaqMan 48
- Ключ для К-пробирок

Расходные материалы

- Коробка К-пробирок, 12 x 96 (P/N: 03137082001)

Прочие необходимые непредоставляемые материалы

- Изоноранол (> 99%) – соответствующий спецификации ACS или выше
- Этанол (96 - 100%) - соответствующий спецификации ACS или выше
- Деионизованная вода
- Дозаторы переменного объема*: (объемом на 250 мкл и 1000 мкл) со свободными от РНКаз сменными наконечниками с аэрозольным барьером
- Водяная баня, установленная на 50°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)
- Сухой термоблок, установленный на 70°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)
- Стерильные одноразовые серологические пипетки объемом: 5, 10 и 25 мл
- Стерильные полипропиленовые конические пробирки; 15 мл и 50 мл: Corning (P/N: 430052 and P/N: 430290) или эквивалент
- Стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 2.0 мл: Sarstedt (P/N: 72.693.005) или эквивалент
- Вортекс
- штативы для пробирок
- Сменные перчатки, без талька
- Откалиброванные термометры для водяной бани и сухого термоблока

*Точность пипеток должна находиться в пределах 3% от их объема. Свободные от нуклеаз наконечники с аэрозольным барьером должны применяться в случаях, когда это рекомендовано для предотвращения контаминаций.

Сбор, транспортировка и хранение образцов

Примечание: Необходимо рассматривать все образцы и контроли как потенциально инфекционные.

А. Сбор образцов

Набор Набор COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 предназначен только для тестирования образцов сыворотки крови или плазмы. Кровь необходимо отбирать в стерильные пробирки SST® для отделения сыворотки или в стерильные пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Цельная кровь может храниться при 2-28°C не более 6 часов. Отделение сыворотки или плазмы от крови необходимо проводить не позднее чем через 6 часов после отбора крови, центрифугируя кровь при 800-1600g в течение 20 минут при комнатной температуре. Перенесите сыворотку крови или плазму в стерильные полипропиленовые пробирки. На рисунках 4 и 5 показаны результаты исследований стабильности вируса в цельной крови. Исследования проводились с помощью теста COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, version 2.0 (v2.0).

Рисунок 4
Стабильность HCV в цельной крови (сыворотке)

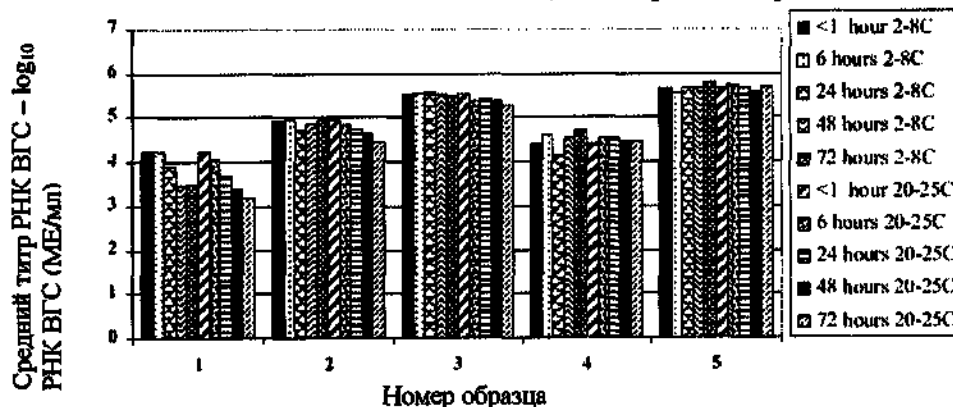
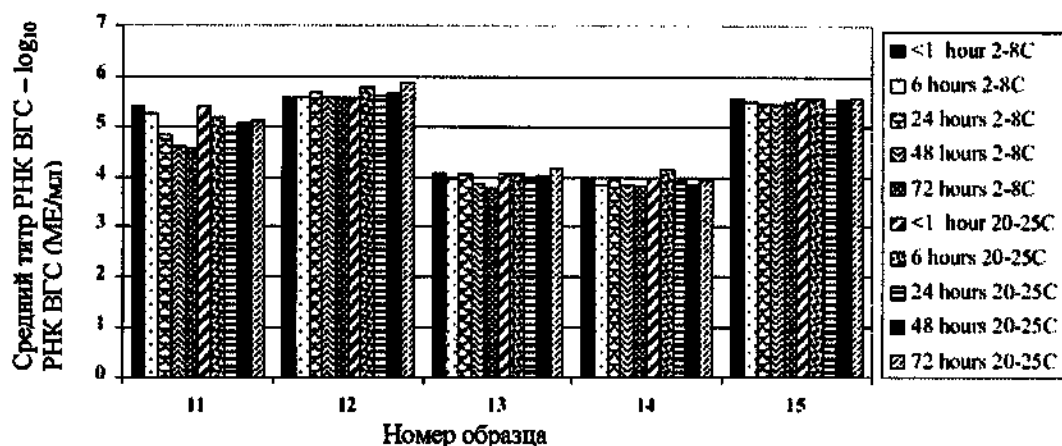


Рисунок 5
Стабильность HCV в цельной крови (плазме с ЭДТА)



Б. Транспортировка образцов

Транспортировка цельной крови или плазмы должна происходить в соответствии с федеральными, государственными и прочими правилами транспортировки этиологических агентов²². Цельную кровь необходимо транспортировать при 2-25°C и обработать в течение 6 часов после отбора крови. Плазма и сыворотка крови может транспортироваться при 2-8°C или замороженной при -20°C - -80°C.

В. Хранение образцов.

Образцы плазмы могут храниться при 2-8°C в течение 3 дней, или замороженными при -70°C. Рекомендуется хранить образцы в аликвотах по 800-900 мкл в стерильных полипропиленовых пробирках с закручивающимися крышками объемом 2 мл (например, Sarstedt P/N: 72.694.006). На рисунках 6 и 7 показано данные по стабильности образцов в зависимости от условий хранения. Исследования проводились с помощью теста COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0.

Рисунок 6
Стабильность HCV в сыворотке крови

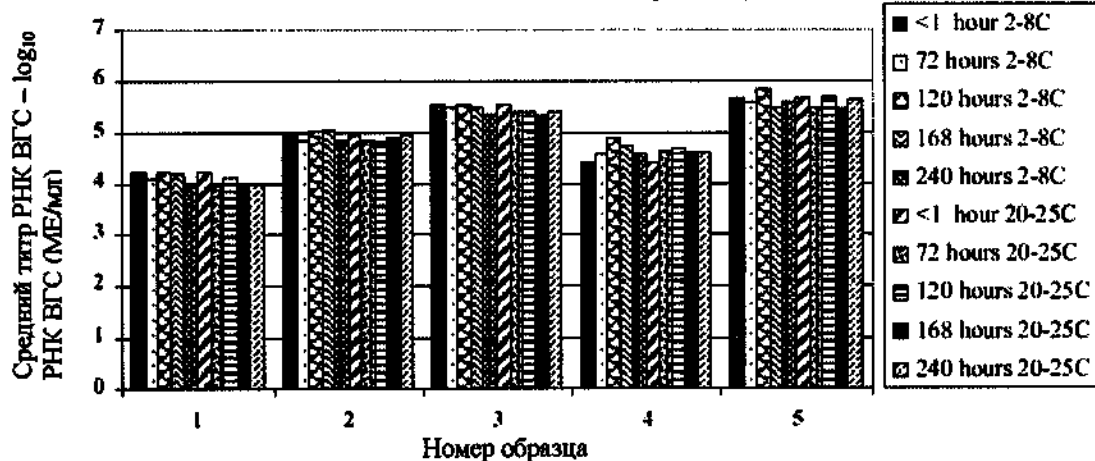
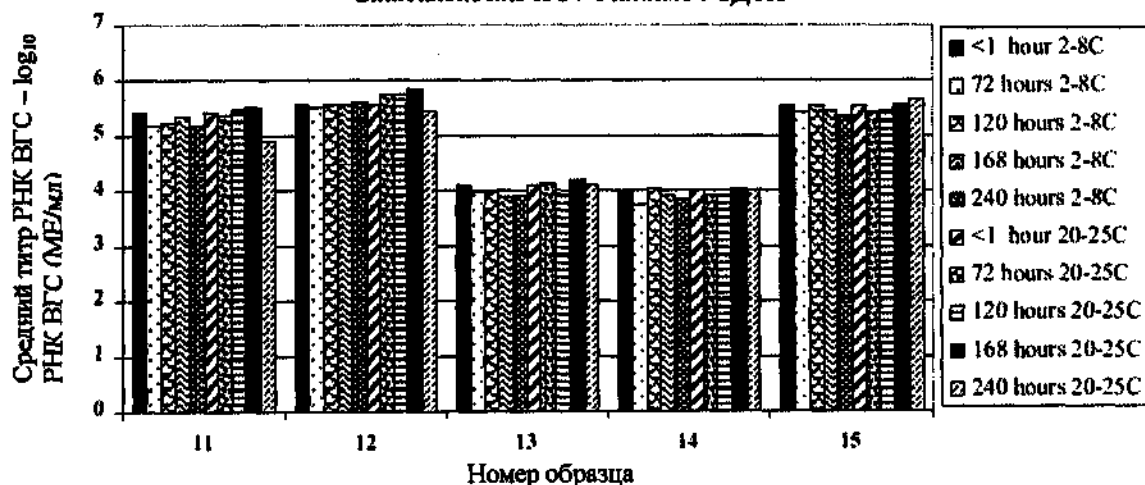


Рисунок 7
Стабильность HCV в плазме с ЭДТА



Образцы сыворотки крови и плазмы можно оттаивать и замораживать до трех раз без потери РНК ВГС. В Таблице 1 приведены результаты изучения влияния оттаивания/замораживания, проводившиеся с помощью теста COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0.

Таблица 1
Различия в концентрациях Log10 ВГС по сравнению с циклом 0
для сыворотки крови и плазмы с ЭДТА в 5 циклах замораживания/оттаивания

Тип образца	Стабильность образца N	Цикл замораживания/оттаивания					
		Цикл 0	Цикл 1	Цикл 2	Цикл 3	Цикл 4	Цикл 5
Сыворотка крови	1	0.000	-0.052	0.238	0.179	-0.670	-0.277
	2	0.000	0.293	0.228	-0.206	-0.338	0.175
	3	0.000	-0.270	-0.023	-0.430	0.008	-0.229
	4	0.000	0.071	-0.516	-0.295	-0.564	-0.670
	5	0.000	0.342	-0.031	-0.344	-0.436	-0.277
Среднее для сыворотки крови		0.000	0.077	-0.021	-0.239	-0.400	-0.246
Плазма с ЭДТА	1	0.000	-0.006	0.043	-0.143	-0.159	-0.140
	2	0.000	-0.329	-0.375	-0.234	-0.642	-0.265
	3	0.000	-0.056	-0.248	-0.371	-0.395	-0.142
	4	0.000	0.186	-0.066	-0.034	-0.241	-0.084
	5	0.000	-0.120	-0.111	-0.055	0.250	-0.217
Среднее для плазмы с ЭДТА		0.000	-0.065	-0.151	-0.167	-0.237	-0.170

Инструкция по применению

Примечание: Подробные инструкции по работе с набором, распечатывании результатов и интерпретации сигнальных сообщений системы приведены в (1) Руководстве пользователя анализатора COBAS® TaqMan® 48 для работы с программой AMPLILINK Software, Version 3.1.0 Series и Руководстве пользователя программы AMPLILINK Software, Version 3.1 Series для работы с прибором COBAS® AmpliPrep, анализатором COBAS® TaqMan® и анализатором COBAS® TaqMan® 48 или (2) Руководстве пользователя анализатора COBAS® TaqMan® 48 для работы с программой AMPLILINK Software, Version 3.2 Series Application Manual и Руководстве пользователя программы AMPLILINK Software Version 3.2 Series для работы с прибором COBAS® AmpliPrep, анализатором COBAS® TaqMan®, анализатором COBAS® TaqMan® и анализатором COBAS® AMPLICOR®.

Примечание: Все реагенты для амплификации и детекции должны быть доведены перед началом работы до комнатной температуры; выньте их из хранения при 2 - 8°C как минимум за 30 минут до начала работы.

Примечание: Образцы плазмы или сыворотки кров перед началом работы должны быть доведены до комнатной температуры в течение 15 – 30 минут.

Примечание: Наконечники с аэрозольным барьером должны применяться в случаях, когда это рекомендовано для предотвращения контаминаций.

Объем постановки:

Каждый набор содержит реагенты, рассчитанные на постановки по 12 тестов каждая, которые могут проводиться одновременно или поочередно. Как минимум по одному контролю СТМ (–) С, HCV L(+)С, v2.0 и HCV H(+)С, v2.0 необходимо включать в каждую серию постановок объемом до 24 тестов (см. раздел "Контроль качества"). Реагенты для амплификации и детекции упакованы в пробирки на 24 теста, рассчитанные на двукратное использование. Для оптимального расхода реагентов, тестирование образцов и контролей следует проводить в постановках с числом тестов, кратным 12.

Подготовка образцов и контролей

Примечание: При использовании замороженных образцов плазмы поместите их при комнатной температуре до полного оттаивания и перемешайте на вортексе 3-5 секунд.

Примечание: перед началом работы доведите реагенты до комнатной температуры. Предварительно нагрейте термоблок до 70°C (± 2°C), а водяную баню - до 50°C (± 2°C) перед началом пробоподготовки.

А. Подготовка реагентов

Примечание: Приготовьте рабочий лизирующий/связывающий раствор только после того, как все образцы и контроли доведены до комнатной температуры в течение 15 - 30 минут.

1. Приготовьте рабочий буфер для удаления ингибиторов, добавив 20 мл 96 - 100% этанола к буферу для удаления ингибиторов (IRB). Перемешайте переворачиванием 5 - 10 раз. Полученного буфера для удаления ингибиторов достаточно на 48 тестов.

2. Приготовьте рабочий промывочный буфер, добавив 50 мл 96 - 100% этанола и 30 мл деионизованной воды в промывочный буфер (WASH). Полученного промывочного буфера достаточно на 48 тестов.

3. Нагрейте буфер для элюции (ELB) при 70°C (± 2°C) в микроцентрифужной пробирке объемом 2.0 мл с закручивающейся крышкой.

Можно использовать несколько пробирок. Объем элюции на один образец составляет 75 мкл. Используйте для нагревания объем буфера в соответствии со значениями, приведенными в таблице ниже, в соответствии с количеством обрабатываемых образцов и контролей.

	Число повторов	
Реагент	12	24
Буфер для элюции (мл)	2.0	4.0

4. Внесите в чистую стерильную пробирку изопропанол в объеме, указанном в таблице ниже, в соответствии с количеством обрабатываемых образцов и контролей.

	Число повторов	
Реагент	12	24
Изопропанол (мл)	5.0	10.0

- Внесите 0.5 мл буфера для элюции (ELB) в пробирку с РНК-носителем (CAR). Закройте крышку; переверните пробирку, и перемешайте на вортексе до полного растворения РНК-носителя. Объем восстановленного РНК-носителя рассчитан на 24 теста. Неиспользованный объем восстановленного РНК-носителя может храниться при -15 - -25°C до 28 дней или истечения срока годности, что наступит раньше.
- Внесите 5.0 мл буфера для элюции (ELB) во флакон с протеиназой К (PK). Закройте крышку; переверните пробирку, и перемешайте на вортексе до полного растворения протеиназы К. Объем восстановленной протеиназы К рассчитан на 24 теста. Неиспользованный объем восстановленного РНК-носителя может храниться при -15 - -25°C до 28 дней или истечения срока годности, что наступит раньше.
- Приготовьте рабочий лизирующий/связывающий раствор, смешав реагенты в объемах, приведенных в таблице ниже в соответствии с количеством обрабатываемых образцов и контролей:

Реагент	Число повторов	
	12	24
Лизирующий/связывающий буфер (мл)	7.0	14.0
РНК-носитель (мкл)	140	280
HCV QS (μL)	56	112
Протеиназа К (мл)	1.4	2.8

Примечание: Объем HCV QS специфичен для теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0.

Примечание: Если используются замороженные РНК-носитель или протеиназа К, оттайте их при комнатной температуре и перемешайте перед работой переворачиванием несколько раз.

- Внесите указанный объем лизирующего/связывающего буфера в стерильную пробирку объемом 50 мл.
- Внесите указанный объем восстановленного РНК-носителя в пробирку с лизирующим/связывающим буфером.
- Перемешайте 3-5 секунд на вортексе HCV QS и внесите указанный объем HCV QS в пробирку с лизирующим/связывающим буфером и восстановленным РНК-носителем.
- Закройте крышку и перемешайте переворачиванием 10 - 15 раз. Не перемешивайте на вортексе – это может привести к образованию пены.
- Внесите указанный объем восстановленной протеиназы К в пробирку с лизирующим/связывающим буфером.
- Закройте крышку и перемешайте переворачиванием 10 - 15 раз. Не перемешивайте на вортексе – это может привести к образованию пены. Используйте полученный рабочий лизирующий/связывающий раствор сразу после внесения протеиназы К в лизирующий/связывающий буфер.

Неиспользованный лизирующий/связывающий буфер (LYS) может храниться при 15-25°C до 28 дней или истечения срока годности, что наступит раньше. Неиспользованный рабочий лизирующий/связывающий раствор необходимо утилизировать.

В. Обработка образцов и контролей

Примечание: Для данной процедуры рекомендуется использовать дозаторы переменного объема с одноразовыми наконечниками с аэрозольным барьером.

Примечание: Дозатор-диспенсер со стерильным комби-наконечником соответствующего объема может использоваться на этапах 19 и 22. Однако необходимо избегать разбрызгивания реагентов и перекрестной контаминации.

- Внесите по 625 мкл рабочего лизирующего/связывающего раствора в каждую лунку штатива для лизиса (штатив I, прозрачный). Закройте крышки надавливанием.
- Открывая по одной лунке, внесите по 500 мкл образца или контроля в соответствующие лунки. После внесения каждого образца и контроля, закройте крышки надавливанием, пока защелка крышки не закроет лунку плотно.
- После внесения всех образцов и контролей перемешайте на вортексе заполненный штатив в течение 10 секунд. Убедитесь, что все лунки перемешаны.
- Инкубируйте штатив при 50°C (± 2°C) на водяной бане 10 минут. Опустите штатив в водяную баню, заполненную водой примерно на 5 - 7 см. Обсушите штатив после инкубации в водяной бане.
- Центрифугируйте штатив 10 - 20 секунд при 4600 x g в центрифуге для планшет. Не обязательно, чтобы центрифуга набрала заданную скорость.
- Открывая по одной лунке, внесите по 250 мкл изопропанола в каждую лунку. После внесения в каждую лунку закройте крышки надавливанием, пока защелка крышки не закроет лунку плотно.

Примечание: Объем изопропанола специфичен для теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0.

- Перемешайте образцы переворачиванием 3 раза, затем перемешайте на вортексе примерно 10 секунд. Убедитесь, что все лунки перемешаны.

8. Центрифугируйте штатив 10 - 20 секунд при 4600 x g в центрифуге для плашек. Не обязательно, чтобы центрифуга набрала заданную скорость.
 9. Открывая по одной лунке, перенесите по 750 мкл содержимого лунок в соответствующие лунки штатива пробирок с фильтром (штатив II, желтый) со съемным штативом для сброса (белый). После внесения каждого образца или контроля закройте крышки плотно.
 10. После внесения всех образцов и контролей центрифугируйте штатив в течение 2 минут при 4600 x g в центрифуге для плашек.
 11. Открывая по одной лунке, перенесите оставшийся объем образцов и контролей в лунки штатива пробирок с фильтром. После внесения каждого образца или контроля закройте крышки плотно. Выбросьте штатив для лизиса.
 12. Центрифугируйте штатив пробирок с фильтром 2 минуты при 4600 x g в центрифуге для плашек.
 13. Отделите штатив пробирок с фильтром от штатива для сброса, надавив на оба зажима на верхней части штатива пробирок с фильтром. Выбросьте штатив для сброса. Возьмите новый штатив для сброса и вставьте в него штатив для пробирок с фильтром.
 14. Откройте все лунки штатива пробирок с фильтром и внесите по 400 мкл буфера для удаления ингибиторов (IRB) в каждую лунку. **Не касайтесь стенок лунки.** После внесения буфера для удаления ингибиторов во все лунки плотно закройте крышки лунок.
 15. Центрифугируйте штатив пробирок с фильтром 2 минуты при 4600 x g в центрифуге для плашек.
 16. Откройте все лунки штатива пробирок с фильтром и внесите по 700 мкл промывочного буфера (WASH) в каждую лунку. **Не касайтесь стенок лунки.** После внесения промывочного буфера во все лунки плотно закройте крышки лунок.
 17. Центрифугируйте штатив пробирок с фильтром 2 минуты при 4600 x g в центрифуге для плашек.
 18. Отделите штатив пробирок с фильтром от штатива для сброса, надавив на оба зажима на верхней части штатива пробирок с фильтром. Выбросьте штатив для сброса. Возьмите новый штатив для сброса и вставьте в него штатив для пробирок с фильтром.
 19. Откройте все лунки штатива пробирок с фильтром и внесите по 700 мкл промывочного буфера (WASH) в каждую лунку. **Не касайтесь стенок лунки.** После внесения промывочного буфера во все лунки плотно закройте крышки лунок.
 20. Центрифугируйте штатив пробирок с фильтром 3 минуты при 4600 x g в центрифуге для плашек.
 21. Отделите штатив пробирок с фильтром от штатива для сброса, надавив на оба зажима на верхней части штатива пробирок с фильтром. Выбросьте штатив для сброса. Возьмите штатив для элюции (ША, синий) и вставьте в него штатив для пробирок с фильтром.
 22. Откройте все лунки штатива пробирок с фильтром и внесите по 75 мкл предварительно нагретого буфера для элюции (ELB) в центр каждого фильтра, не касаясь его.
- Примечание:** Не вносите буфер для элюции по стенке лунки.
- Плотно закройте лунки после внесения буфера для элюции в каждую лунку. Инкубируйте штатив для элюции при комнатной температуре не менее 3 минут после внесения буфера для элюции в последнюю лунку.
23. Центрифугируйте штатив пробирок с фильтром 3 минуты при 4600 x g в центрифуге для плашек.
 24. Отделите штатив пробирок с фильтром от штатива для элюции, надавив на оба зажима на верхней части штатива пробирок с фильтром. Выбросьте штатив пробирок с фильтром.
 25. Поместите штатив с крышками (ШВ, синий) на штатив для элюции (ША, синий). Плотно надавите, чтобы захлопнулись зажимы. Закройте все крышки.
 26. Обработанные образцы и контроли готовы к проведению ПЦР. Для амплификации используют 50 мкл выделенных образцов или контролей. Выделенные образцы и контроли необходимо внести в рабочий мастермикс не позднее 3 часов после пробоподготовки. Если выделенные образцы и контроли не получается внести в реакцию не позднее 3 часов, храните их при 2 - 8°C до 24 часов в закрытом штативе для элюции, или при -20°C до 1 недели в стерильных пробирках с завинчивающимися крышками объемом 2,0 мл (например, Sarstedt P/N: 72.694.006). Амплификацию необходимо начать не позднее 2 часов после внесения выделенных образцов и контролей в рабочий мастермикс.

Обратная транскрипция, амплификация и детекция

Примечание: К-платформы и подставки для К-платформ необходимо протирать неволокнистой салфеткой, смоченной 70% изопропанолом.

В. Подготовка реагентов

Примечание: Мастермикс COBAS® TaqMan® HCV Master Mix (HCV MMX), "рабочий мастермикс" (рабочий MMX) и рабочий MMX с внесенными образцами и контролями нестабильны на свету. Не допускайте попадания света на эти реагенты.

Примечание: Мастермикс COBAS® TaqMan® HCV Master Mix (HCV MMX) и раствор марганца COBAS® TaqMan® (CTM Mn2+) необходимо довести до комнатной температуры как минимум за 30 минут перед приготовлением рабочего мастермикса.

Примечание: Начинать готовить рабочий MMX после завершения пробоподготовки.

Примечание: Рабочий MMX необходимо использовать в течение 1 часа после приготовления.

Примечание: Амплификацию необходимо начать не позднее 2 часов после внесения выделенных образцов и контролей в рабочий MMX.

1. Доведите до комнатной температуры в течение 30 минут по одной пробирке HCV MMX и CTM Mn2+.

2. Поместите К-платформу в подставку для К-платформы.

3. Поместите К-пробирки в К-платформу, не касаясь стенок К-пробирок.

Примечание: Если в постановки используется менее 24 пробирок, позиции 1, 2, 5, 20, 23 и 24 должны быть заняты для баланса К-платформы в термоциклере.

4. Откройте К-пробирки с помощью ключа для К-пробирок. Поместите крышки К-пробирок на парковочные позиции.

5. Приготовьте рабочий MMX следующим образом:

На 24 теста, внесите 170 мкл CTM Mn2+ в одну пробирку с HCV MMX. Закройте пробирку и перемешайте переворачиванием 10 раз. Не перемешивайте рабочий MMX на вортексе. Защищайте рабочий MMX от света и используйте в течение 1 часа.

На 12 тестов, отберите 669 мкл HCV MMX в пробирку объемом 2 мл. Внесите 81 мкл CTM Mn2+ в пробирку с отобраным HCV MMX. Закройте пробирку и перемешайте переворачиванием 10 раз. Не перемешивайте рабочий MMX на вортексе. Защищайте рабочий MMX от света и используйте в течение 1 часа.

Храните оставшийся неиспользованный HCV MMX и CTM Mn2+ в оригинальных пробирках при 2-8°C. После открытия HCV MMX и CTM Mn2+ стабильны при 2 - 8°C в течение 28 дней или до истечения срока годности, что наступит раньше.

Примечание: Объем CTM Mn2+ специфичен для теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0.

6. Внесите по 50 мкл рабочего MMX в каждую К-пробирку.

Примечание: если выделенные образцы и контроли хранились замороженными до амплификации, оттайте их при комнатной температуре и перемешайте, прежде чем приступить к этапу 7.

7. Внесите по 50 мкл выделенных образцов и контролей в соответствующие К-пробирки с рабочим MMX, используя наконечники с аэрозольным барьером.

Осторожно перемешайте пипетированием три раза каждый образец и контроль, избегая образования пузырей.

8. Повторите этап 7 для каждого образца и контроля. Используйте для каждого нового образца или контроля отдельный наконечник с аэрозольным барьером. Проверьте. Чтобы в пробирках не было пузырей, удалите их при необходимости. Закройте К-пробирки с помощью ключа для К-пробирок. Убедитесь визуально, что во всех пробирках одинаковый объем содержимого.

9. Амплификацию необходимо начать не позднее 2 часов после внесения выделенных образцов и контролей в К-пробирки с рабочим MMX.

Г. Загрузка и работа анализатора COBAS® TaqMan® 48

1. Включите рабочий компьютер и запустите Windows XP, используя соответствующие имя пользователя и пароль.

2. Включите анализатор COBAS® TaqMan® 48. Убедитесь, что инициализация прибора прошла и он готов к работе. Если К-платформы после предыдущей постановки(-ок) остались в термоциклерах, выньте их с помощью переносчика К-платформ.

3. откройте программу AMPLILINK. Войдите программу, используя соответствующие имя пользователя и пароль.

4. Чтобы создать назначение для К-платформы для анализируемых образцов, кликните по значку Orders.

Выберите вкладку Sample, и затем нажмите кнопку New и введите номер назначения для каждого образца с помощью клавиатуры или сканера штрих-кода. выберите Test Definition для теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0. Повторите действия для каждого образца. Нажмите кнопку Save.

Примечание: Если в постановки используется менее 24 пробирок, позиции 1, 2, 5, 20, 23 и 24 должны быть заняты для баланса К-платформы в термоциклере.

5. введите сведения о контролях, выбрав вкладку Quality Control в окне Orders. Нажмите кнопку New и введите с помощью клавиатуры или сканера штрих-кода информацию с карты значений контролей, прилагаемой к набору COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0.

Введите в соответствующих полях номер серии набора COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0, срок годности, диапазоны для низкотитражного (Low (+)) и высокотитражного (High (+)) контролей, а также лот-специфичные коэффициенты калибровки.

Нажмите "OK."

6. Выберите номер К-платформы для постановки, выбрав вкладку **K-Carrier** в окне **Orders**. В окне **K-Carrier**, нажмите **New**. В окне справа от "**K-Carrier ID**," введите номер К-платформы с ее штрих-кода с помощью клавиатуры или сканера штрих-кода. Результаты предыдущей постановки с использованием той же К-платформы должны быть приняты. Выберите **Test Definition** для теста **COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0** в панели тестов в нижней части окна.

7. В рабочем листе **Worklist**, выберите первый ряд в колонке тип образца (Т). Выделите это поле для доступа к выпадающему меню, и выберите необходимый тип контроля. Затем дважды кликните по полю идентификатора (ID) образца в том же ряду. Появится окно **LookUp Control** со всеми возможными типами контролей. После того как контроль выбран, соответствующие значения калибровки и диапазона значений появятся в правой нижней части панели информации. Повторите эти действия для всех контролей.

8. Для ввода образцов в рабочий лист **Worklist**, дважды кликните по первой позиции (ряду) для ввода образцов. Появится окно **Lookup Sample** с созданными назначениями для образцов. С помощью клавиш **Shift + Arrow** выделите несколько номеров назначений. Убедитесь, что в окне **Test Definition** выбран тест **COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0**.

9. Нажмите **Save** чтобы сохранить назначение для К-платформы.

Д. Обратная транскрипция, амплификация и детекция

1. Кликните по значку **Systems** на вкладке **System Tab**; нажмите **Open** чтобы открыть термоциклер. После полного открытия крышки термоциклера и появления надписи "**Ready to Load**" в окне **Systems**, поднимите и удерживайте внешнюю крышку термоциклера. С помощью переносчика К-платформ перенесите загруженную К-платформу с закрытыми К-пробирками, содержащими рабочий мастермикс с образцами и контролями, в термоциклер. Закройте внешнюю крышку термоциклера.

2. Нажмите **Start** в окне **Systems** внизу значка термоциклера, чтобы закрыть крышку термоциклера и запустить постановку.

3. Обратная транскрипция, амплификация и детекция автоматически будут проведены в анализаторе **COBAS® TaqMan® 48**.

Результаты

Расчет результатов

Анализатор **COBAS TaqMan 48** автоматически определяет концентрацию РНК ВГС в образцах и контролях. Концентрация РНК ВГС выражается в Международных единицах (МЕ/мл). Титр РНК ВГС выражается в международных единицах (МЕ)/мл в соответствии с вторым международным стандартом ВОЗ для молекулярных тестов на РНК ВГС (NIBSC Code 96/798)¹⁹

Анализатор COBAS® TaqMan® 48:

- Определяет пороговое значение (Ct) для РНК ВГС и РНК КС ВГС.
- Определяет концентрацию РНК ВГС исходя из значений Ct для РНК ВГС и РНК КС ВГС и лот-специфичных коэффициентов калибровки.
- Определяет, укладываются ли рассчитанные значения копий/мл для **HCV L(+)/C, v2.0** и **HCV H(+)/C, v2.0** в заданные пределы.

Определение качества постановки

Проверьте в окне результатов программы **AMPLILINK** или в распечатке результатов отсутствие значков и комментариев, указывающих на то, что постановка не может быть признана прошедшей.

Постановка не прошла, если для контролей **HCV** получен какой-либо из следующих сигналов ошибки:

Для негативного контроля:

Сигнал ошибки	Результат	Интерпретация
_N_C_INVALID	Не действителен	Не достоверный результат или «достоверный» результат, не оказавшийся негативным по ВГС

Для низкотитражного позитивного контроля ВГС:

Сигнал ошибки	Результат	Интерпретация
_L_LPCINVALID	<2.50E+01 IU/ml	Контроль ниже диапазона определения
_L_LPCINVALID	Target Not Detected	Контроль ниже диапазона определения
_L_LPCINVALID	A numeric titer X.XXE+XX IU/ml	Контроль за пределами диапазона определения
_L_LPCINVALID	>3.91E+08 IU/ml	Контроль выше диапазона определения

L LPCINVALID	Invalid	Результат не достоверен
---------------------	----------------	--------------------------------

Для высокотитражного позитивного контроля ВГС:

Сигнал ошибки	Результат	Интерпретация
H_HPCINVALID	<2.50E+01 IU/ml	Контроль ниже диапазона определения
H_HPCINVALID	Target Not Detected	Контроль ниже диапазона определения
H_HPCINVALID	A numeric titer X.XXE+XX IU/ml	Контроль за пределами диапазона определения
H_HPCINVALID	>3.91E+08 IU/ml	Контроль выше диапазона определения
H_HPCINVALID	Invalid	Результат не достоверен

Если постановка не прошла успешно, необходимо целиком повторить все этапы постановки – обработку образцов и контролей, амплификацию и детекцию.

Интерпретация результатов:

Если постановка прошла успешно, проверьте в распечатке результатов наличие сигналов ошибки и комментариев для каждого образца. Результаты интерпретируются следующим образом:

- ⇒ В результатах прошедшей успешно постановки для отдельных образцов могут находиться как достоверные, так и недостоверные результаты, в зависимости от выданных программой сигналов ошибки и/или комментариев.

Результаты для образцов интерпретируются следующим образом:

Комментарий	Интерпретация
Target Not Detected	Значение Ct для HCV выше предела, установленного для теста, или значение Ct для HCV не получено. Результат регистрируется как «РНК HCV не выявлена»
<2.50E+01 IU/ml	Рассчитанное значение копий/мл ниже диапазона определения теста. Результат регистрируется как «РНК HCV выявлена в концентрации ниже 25 МЕ РНК ВГС/мл»
≥ 2.50E+01 IU/mL и ≤ 3.91E+08 IU/mL	Рассчитанное значение копий/мл находится в пределах диапазона определения теста.
>3.91E+07 IU/ml	Рассчитанное значение копий/мл выше диапазона определения теста. Результат регистрируется как «более 3.91E+08 МЕ РНК HCV/мл». Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец HCV-негативной человеческой плазмой и повторить тест. Умножьте полученный при повторном тестировании результат на коэффициент разведения образца.

Примечание: Образцы с концентрацией выше диапазона определения теста могут также давать недействительный результат («Invalid») с сигналом ошибки «QS_INVALID». Если требуется получение точного количественного результата, необходимо развести образец ВГС-негативной человеческой плазмой или сывороткой, в зависимости от природы исходного образца, и повторить тест. Умножьте полученный при повторном тестировании результат на коэффициент разведения образца.

Контроль качества

В каждую постановку должны быть включены негативный контроль COBAS TaqMan, низкотитражный позитивный контроль COBAS TaqMan HCV и высокотитражный позитивный контроль COBAS TaqMan HCV. Проверяйте в распечатке результатов отсутствие значков и комментариев, указывающих на то, что постановка не может быть признана прошедшей. Постановка считается прошедшей, если ни для одного из контролей [HCV H(+)/C, v2.0, HCV L(+)/C, v2.0 and CTM (-) C] не получены сигнальные значки. Каких-либо рекомендаций по размещению контролей в К-платформе для образцов нет. Как и при любом новом лабораторном методе, новые операторы должны включать в постановки дополнительные внутрилабораторные контроли, пока не будет достигнут значительный уровень опытности в проведении постановок

Негативный контроль

Для CTM(-) C должен быть получен результат «Target Not Detected» (РНК-мишень не выявлена), т.е. значение Ct для РНК ВГС находилось выше предела, установленного для теста, или для РНК ВГС не было получено значение Ct, но для РНК количественного стандарта ВГС достоверное значение Ct было получено. Если CTM (-) C не соответствует этому критерию, не действительной признается вся постановка. Необходимо повторить всю процедуру (обработка образцов и контролей, амплификация и детекция). Если результат для CTM(-)C постоянно не достоверен, обратитесь за технической помощью в ваше местное представительство Roche.

Позитивные контроли

Заданный диапазон значений для HCV L(+)/C, v2.0 и HCV H(+)/C, v2.0 специфичен для каждого лота и указывается в карте значений контролей, прилагаемой к набору COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0. Эти данные вносятся в программу AMPLILINK.

Значения РНК ВГС в МЕ/мл для HCV L(+)/C, v2.0 и HCV H(+)/C, v2.0 должны укладываться в заданный диапазон значений, указанный в карте значений контролей, прилагаемой к набору COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0. Если один или оба позитивных контроля не соответствуют этому критерию, не действительной признается вся постановка. Необходимо повторить всю процедуру (обработка образцов и контролей, амплификация и детекция). Если рассчитанные титры РНК ВГС для одного или обоих позитивных контролей постоянно не укладываются в заданный диапазон, обратитесь за технической помощью в ваше местное представительство Roche.

Требования к постановке

Как и при любых постановках, для качественного прохождения теста важно качество лабораторной работы. Вследствие высокой аналитической чувствительности данного теста, для сохранения чистоты реагентов набора и амплификационных смесей необходимо соблюдать строгие меры. Важен постоянный мониторинг чистоты реагентов. При подозрении на контаминацию любые реагенты необходимо выбрасывать.

Ограничения теста

1. значения коэффициентов калибровки специфичны для серии набора и для теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure. Данные значения могут не быть валидными при использовании других методов пробоподготовки.
2. Данный тест предназначен для работы только с образцами человеческой сыворотки крови или плазмы, собранной с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Тестирование прочих образцов может привести к получению неверных результатов.
3. Мутации в консервативном участке вирусного генома, служащего мишенью для праймеров и зонда в данном тесте, встречаются редко, однако могут быть причиной занижения значений вирусной нагрузки или отрицательного результата теста.
4. Количественное определение РНК ВГС определяется количеством вирусных частиц, присутствующих в образце, и поэтому может зависеть от метода сбора образцов, факторов организма пациента (например, возраста. Наличия симптомов) и/или стадии инфекции.
5. Надежность результатов зависит от аккуратности при сборе, транспортировке, хранении и обработке образцов.
6. Присутствие в мастермиксе COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test фермента AmpErase снижает риск контаминации ампликонами. Однако контаминации позитивными контролями HCV или клиническими образцами можно избежать только при аккуратной работе в лаборатории и четком следовании инструкциям, приведенным в данном Приложении.
7. С данным набором может работать только персонал, имеющий опыт постановок в ПЦР.
8. Данный набор предназначен только для работы COBAS Taqman 48.
9. Вследствие объективных различий между методами, рекомендуется до перехода с одного метода на другой провести внутрилабораторные испытания для сравнения полученных при параллельном тестировании результатов.

Ингибирующие вещества

Было показано, что повышенные уровни альбумина (до 7000 мг/дл), общего билирубина (до 2.41 мг/дл), гемоглобина (до 540 мг/дл), триглицеридов (1432 мг/дл) липидов, а также образцы от пациентов с системной красной волчанкой (до 780 МЕ/мл анти-дцДНК) и ревматоидным артритом (до 660 МЕ/мл РФ), не влияют на количественное определение РНК ВГС в образцах плазмы ЭДТА или сыворотки крови в данном тесте.

Следующие лекарственные препараты тестировались в пиковых концентрациях в плазме (C_{max}) и концентрациях, превышающих в 3 раза C_{max}, и было показано отсутствие их влияния на количественное определение РНК ВГС в данном тесте:

Нуклеотидные ингибиторы ДНК-полимеразы Тенофовир диниксид фумарат	Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы Ламивудин Зидовудин Ставудин Абакавир Диданозин
Ингибиторы протеазы ВИЧ Индинавир Саквинавир Ритонавир Нельфинавир Ампренавир Лопинавир/Ритонавир	Не-нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ Невирапин Эфавиренз Смешанные ингибиторы ВИЧ Энфувиртид
Иммуномодуляторы Интерферон альфа-2а Интерферон альфа-2b Пегинтерферон альфа-2а	Антидепрессанты Пароксетин HCl Флуоксетин HCl Сертралин HCl

Лабораторные испытания теста

А. Предел чувствительности

Предел чувствительности теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure определяли в серии разведений в негативной плазме с ЭДТА или сыворотке Вторичного стандарта ВГС (Lot GTR015) и клинического образца, содержащего ВГС генотипа 4. Вторичный стандарт ВГС (Lot GTR015) был получен на основании клинического образца, содержащего ВГС генотипа 1а, откалиброванного относительно Второго международного стандарта ВОЗ (код NIBSC 96/798)¹⁹ для молекулярных тестов на РНК ВГС, полученного от NIBSC. Концентрацию ВГС генотипа 4 в клиническом образце определяли в тесте COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR Test, v2.0. Для каждого из трех сочетаний серий теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 и набора High Pure System Viral Nucleic Acid Kit тестировали не менее 8 независимых серий разведения. Всего каждую концентрацию тестировали как минимум в 48 повторах с каждым сочетанием серий наборов, что давало не менее 148 повторов для каждой концентрации каждого типа образцов (плазма с ЭДТА и сыворотка крови).

Полученные результаты, приведенные в Таблицах 2 и 3, показали, что выявляемая с частотой 95% в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 концентрация ВГС генотипа 1 составляет, по данным пробит-анализа, 9.3 МЕ/мл (95% CI 6.1, 24.2) для образцов плазмы с ЭДТА и 8.8 МЕ/мл (95% CI 7.5, 11.1) для образцов сыворотки крови. Данные, полученные для каждого из трех сочетаний серий наборов, приведены в Таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Предел чувствительности выявления ВГС генотипа 1 в плазме с ЭДТА в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure

Серия набора COBAS® TaqMan®	G10020	G11233	G11225	Общее для всех серий
Серия набора High Pure	17310600	12317800	17390400	
34 МЕ/мл	100%	100%	100%	100%
23 МЕ/мл	100%	100%	100%	100%
17 МЕ/мл	100%	100%	100%	100%
11 МЕ/мл	88.2%	94.0%	94.1%	92.1%
5.6 МЕ/мл	92.2%	86.3%	88.2%	88.9%
2.8 МЕ/мл	74.0%	76.5%	71.0%	74.8%
Частота выявления по Probit 95%	10.0 МЕ/мл	9.0 МЕ/мл	8.8 МЕ/мл	9.3 МЕ/мл
95% доверительный интервал (CI)	(5.0 - 2107.0)	(6.7 - 14.6)	(6.6 - 14.0)	(6.1 - 24.2)

Таблица 3

Предел чувствительности выявления ВГС генотипа 1 в сыворотке крови в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure

Серия набора COBAS® TaqMan®	G10020	G11233	G11225	Общее для трех серий
Серия набора High Pure	17310600	12317800	17390400	
34 МЕ/мл	100%	100%	100%	100%
23 МЕ/мл	100%	100%	97.9%	99.3%
17 МЕ/мл	98.0%	100%	97.9%	98.7%
11 МЕ/мл	94.1%	100%	97.9%	97.3%
5.6 МЕ/мл	82.4%	92.2%	89.6%	88.0%
2.8 МЕ/мл	62.7%	68.6%	79.2%	70.0%
Частота выявления по Probit 95%	10.8 МЕ/мл	6.0 МЕ/мл	9.0 МЕ/мл	8.8 МЕ/мл
95% доверительный интервал (CI)	(8.3 - 16.3)	(4.8 - 9.6)	(6.3 - 16.0)	(7.5 - 11.1)

Полученные результаты, приведенные в Таблице 4, показали, что выявляемая с частотой 95% в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 концентрация ВГС генотипа 4 составляет, по данным пробит-анализа, 16.1 МЕ/мл (95% CI 12.2, 25.1) для образцов плазмы с ЭДТА и 25.4 МЕ/мл (95% CI 21.5, 31.2) для образцов сыворотки крови.

Таблица 4

Предел чувствительности выявления ВГС генотипа 4 в плазме с ЭДТА и сыворотке крови в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure

Тип образца	Плазма с ЭДТА	Сыворотка
Концентрация	Общее для трех серий	Общее для трех серий
30 МЕ/мл	100%	96.6%
20 МЕ/мл	95.3%	90.6%
15 МЕ/мл	96.7%	88.7%
10 МЕ/мл	86.2%	79.7%
5.0 МЕ/мл	60.0%	47.3%
2.5 МЕ/мл	41.2%	29.5%
Частота выявления по Probit 95%	16.1 МЕ/мл	25.4 МЕ/мл
95% доверительный интервал (CI)	(12.2 - 25.1)	(21.5 - 32.1)

Б. Воспроизводимость

Воспроизводимость между разными сериями набора, между разными приборами, разными операторами, между разными постановками, внутри постановки, и общую воспроизводимость определяли с помощью панели ВГС, основанной на клиническом образце ВГС генотипа 1 в плазме с ЭДТА и сыворотке крови. В Таблицах 5 и 6 приведены значения коэффициента вариации (%CV) для каждого компонента анализа воспроизводимости и общее значение %CV для ВГС генотипа 1.

Таблица 5
Воспроизводимость выявления ВГС генотипа 1 в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 (образцы плазмы с ЭДТА)

Компонент анализа воспроизводимости	Концентрация ВГС генотипа 1 (МЕ/мл)					
	4.44E+06	4.44E+05	4.44E+04	4.44E+03	4.44E+02	4.44E+01
Между сериями	4.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	15.4
Между приборами	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.3%
Между операторами	18.4%	17.7%	18.7%	16.8%	14.8%	12.7%
Между постановками	18.6%	20.7%	17.1%	12.7%	23.0%	9.8%
Внутри постановки	18.8%	17.6%	20.0%	24.4%	17.2%	28.0%
Общий CV%	32.6%	32.5%	32.3%	32.2%	32.3%	35.8%
n	48	48	48	48	48	48

Таблица 6
Воспроизводимость выявления ВГС генотипа 1 в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 (образцы сыворотки крови)

Компонент анализа воспроизводимости	Концентрация ВГС генотипа 1 (МЕ/мл)						
	1.17E+06	1.31E+05	1.31E+04	1.31E+03	1.31E+02	6.56E+01	3.28E+01
Между сериями	2.7%	0.0%	12.3%	13.9%	11.1%	0.0%	10.4%
Между приборами	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Между операторами	12.0%	12.8%	0.0%	0.0%	6.6%	0.0%	9.7%
Между постановками	16.5%	17.5%	16.2%	16.5%	16.9%	32.9%	31.2%
Внутри постановки	15.2%	13.9%	18.9%	12.9%	24.3%	36.5%	46.1%
Общий CV%	25.6%	25.8%	27.7%	25.1%	32.3%	49.1%	57.5%
n	72	72	72	72	72	72	72

Оценка воспроизводимости теста для генотипа 4 ВГС также проводилась с помощью панели образцов сыворотки крови и плазмы с ЭДТА с титрами ВГС от 5.87E+01 МЕ/мл до 1.17E+04 МЕ/мл. Общий коэффициент вариации %CV для генотипа 4 ВГС варьировал от 33.3% до 35.1%.

В. Линейный диапазон

Две панели для определения линейности теста, состоящих из 15 образцов защищенной РНК ВГС в плазме с ЭДТА или сыворотке крови, тестировали в трех сочетаниях серий наборов COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 и High Pure System Viral Nucleic Acid. 15 образцов панелей перекрывали диапазон концентраций от 7.83E+00 МЕ РНК ВГС/мл до 7.83E+08 МЕ РНК ВГС/мл, по результатам сравнения со вторичным стандартом ВГС (Lot GTR015), приготовленным на основе клинического образца ВГС генотипа 1a, откалиброванного относительно второго международного стандарта ВОЗ для молекулярных тестов на РНК ВГС (NIBSC Code 96/798)¹⁹. Каждую концентрацию тестировали в 12 повторах для каждого из 3 сочетаний серий наборов, что всего давало 36 повторов для каждой концентрации.

Линейность теста наблюдалась в диапазоне от 2.35E+01 МЕ РНК ВГС/мл до 3.91E+08 МЕ РНК ВГС/мл при анализе в соответствии с рекомендациями CLSI EP6-A, с критерием принятия $\pm 0.2 \log_{10}$. Как показано на Рисунках 8 и 9, при тестировании образцов защищенной РНК ВГС в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 при использовании с системой High Pure, результаты укладываются в пределах $0.3 \log_{10}$ от номинального значения в линейном диапазоне от 2.5E+01 МЕ РНК ВГС/мл до 3.91E+08 МЕ РНК ВГС/мл в образцах плазмы с ЭДТА и сыворотки крови.

Рисунок 8
Линейный диапазон теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure для образцов плазмы с ЭДТА

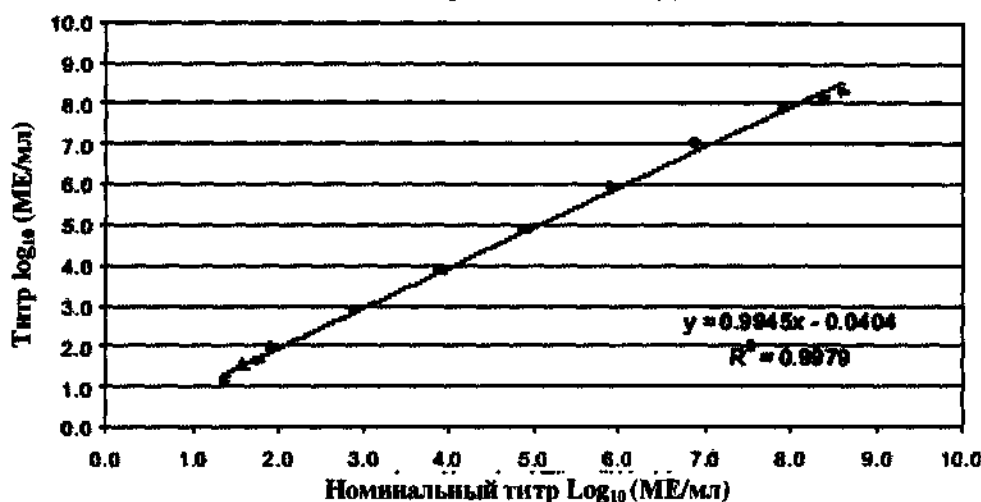
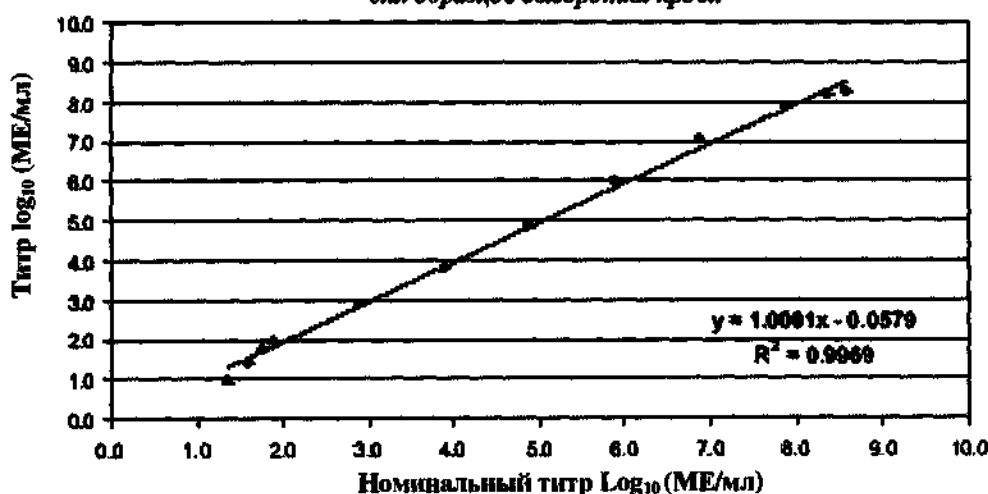


Рисунок 9
Линейный диапазон COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure для образцов сыворотки крови



Г. Чувствительность при определении разных генотипов ВГС

Количественное определение – клинические образцы

Всего 60 ВГС-положительных клинических образцов плазмы с ЭДТА и сыворотки крови, содержащих разные генотипы ВГС (1, 2а, 2, 3, 4, 5 и 6), анализировали в трех повторах в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 с системой High Pure (HCVHPSV2) и в тесте COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR Test, v2.0 (CAHCM).

Дополнительно образцы генотипов ВГС были получены в результате разведения 24 из вышеупомянутых 60 образцов в ВГС-отрицательной плазме с ЭДТА и 22 из вышеупомянутых 60 образцов в ВГС-отрицательной сыворотке крови.

Средние различия для $\log$ титров в тестах HCVHPSV2 и САНСМ для каждого генотипа составили $\leq 0.23 \log$ для всех клинических образцов (Таблица 7).

Таблица 7
Средние различия Log титров между HCVHPSV2 и САНСМ для каждого генотипа ВГС

Генотип ВГС	HCVHPSV2 - САНСМ	n
1	-0.12	25
2a	-0.21	7
2	-0.04	14
3	0.23	22
4	-0.07	16
5	-0.03	9
6	-0.15	13
Все генотипы ВГС	-0.03	106

Количественное определение - панель NIBSC

Панель генотипов ВГС, код NIBSC 02/202, тестировали COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 при использовании с системой High Pure. Как показано в Таблице 8, все 6 образцов разных генотипов ВГС дали значения, не различающиеся более чем на 0.25 $\log$ от номинальных значений.

Таблица 8
Различия между полученными и ожидаемыми Log титров образцов панели NIBSC для генотипов ВГС с 1 по 6

Генотип ВГС	Log ₁₀ МЕ/мл		
	Ожидаемое значение	Полученное значение	Ожидаемое - полученное значение
1	3.0	2.76	-0.24
2	3.0	3.15	0.15
3	3.0	3.01	0.01
4	3.0	2.78	-0.22
5	3.0	3.0	0.00
6	3.0	3.15	0.15

Чувствительность выявления генотипов

Чувствительность выявления всех генотипов ВГС определяли при анализе серий разведений вторичного стандарта ВГС (Lot 0002, генотип 1a) и доступных охарактеризованных клинических образцов ВГС, представляющих генотипы 2a, 2b, 3, 4, 5 и 6) в ВГС-отрицательной плазме с ЭДТА и сыворотке крови.

Концентрации исходного материала для серий разведений ВГС генотипов 2a, 2b, 3, 4, 5 и 6 определяли в тесте COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR Test, v2.0. Для каждой из двух серий набора COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 тестировали не менее 3 независимых серий разведений для каждого типа образцов и каждого генотипа. Каждую концентрацию тестировали не менее чем в 12 повторях в каждой серии набора COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0, что давало 24 повтора на каждую концентрацию.

Приведенные в Таблице 9 результаты свидетельствуют о выявлении ВГС генотипов с 1 по 6 в образцах плазмы с ЭДТА и сыворотки крови с нижним пределом чувствительности от 6.3 МЕ/мл до 19.4 МЕ/мл.

Таблица 9
Выявление генотипов ВГС с 1 по 6 в образцах плазмы с ЭДТА и сыворотки крови

Генотип ВГС	95 % PROBIT концентрации в МЕ/мл		Наблюдаемая минимальная концентрация, выявляемая с частотой не менее 95%	
	Плазма с ЭДТА	Сыворотка	Плазма с ЭДТА	Сыворотка
1	16.7	11.3	20	20
2a	11.8	19.4	20	20
2b	9.6	11.0	20	10
3	6.3	11.1	10	10
4	14.9	13.5	20	20
5	14.3	13.4	10	20
6	7.0	10.7	10	10

Д. Клиническая специфичность

Клиническую специфичность теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure (HCVHPSV2) определяли, анализируя 50 ВГС-серонегативных образцов плазмы с ЭДТА и 50 ВГС-серонегативных образцов сыворотки крови, тестируя каждый в двух сериях набора COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0. Результаты всех 200 тестов были отрицательными по РНК ВГС. На основании полученных результатов, клиническая специфичность теста HCVHPSV2 составила 100%.

Е. Аналитическая специфичность

Аналитическую специфичность определяли, добавляя микроорганизмы в ВГС-негативную плазму с ЭДТА и сыворотку крови человека. Для оценки потенциальной перекрестной реактивности теста COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure тестировали 12 представителей семейства *Flaviviridae* и 22 дополнительных микроорганизма. Ни один из не содержащих ВГС образцов, несущих РНК- или ДНК-содержащие микроорганизмы, не дал положительный результат по РНК ВГС. Список тестируемых микроорганизмов приведен в Таблице 10.

Таблица 10
Образцы, тестируемые при определении аналитической специфичности

<i>Микроорганизмы, тестируемые при изучении аналитической специфичности</i>		
Вирус западного Нила	Вирус гепатита G (GBV-C)	Вирус гепатита В, генотипы А и В
Вирус энцефалита Сент-Луиса	<i>Staphylococcus aureus</i> и <i>epidermis</i>	Папилломавирус человека 11, 18, 6В
Вирус Денге типы 1, 2, 3 и 4	Вирус Эпштейн-Барр	<i>Вирус варицелла эостер</i>
Вирус желтой лихорадки	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Candida albicans</i>
Вирус Зика	Аденовирус тип 3	HTLV I/II
Вирус Банзи	Цитомегаловирус, штамм Дэвис и Цитомегаловирус, штамм Тоуне	Вирус гриппа В
Вирус FSME	Вирус простого герпеса тип 1, МакИнтайр; тип 2, G	<i>Mycobacterium avium</i>
Вирус энцефалита долины Мюррея	Вирус гепатита А	ВИЧ

Ж. Сравнение с тестом COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 и тестом COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test

Всего 47 ВГС-положительных клинических образцов плазмы с ЭДТА и 47 ВГС-положительных клинических образцов сыворотки крови тестировали однократно в COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 с системой High Pure (HCVHPSV2) и в COBAS® AMPLICOR® HCV MONITOR Test, v2.0 (САНСМ). Всего 50 ВГС-положительных клинических образцов плазмы с ЭДТА и 50 ВГС-положительных клинических образцов сыворотки крови тестировали однократно в COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 с системой High Pure (HCVHPSV2) и в COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test (САРСТМ). Значения log титров РНК ВГС, полученные в тестах HCVHPSV2, САНСМ и САРСТМ для всех образцов, сгруппированные в соответствии с генотипом ВГС, приведены на Рисунках 10 и 11 в виде САНСМ против HCVHPSV2 и САРСТМ против HCVHPSV2, соответственно.

Рисунок 10
Корреляция результатов, полученных в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure (HCVHPSV2) и тесте COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test, v2.0 (CAHCM)

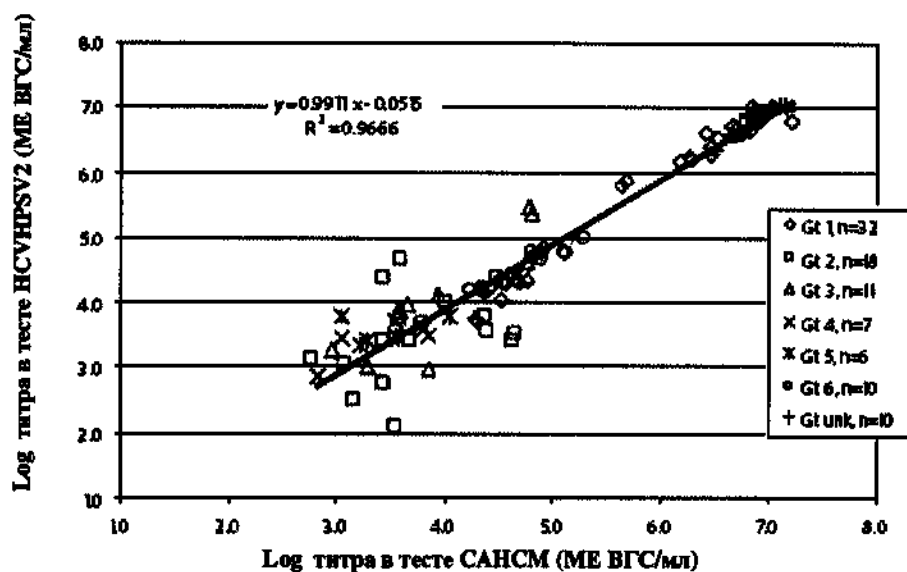
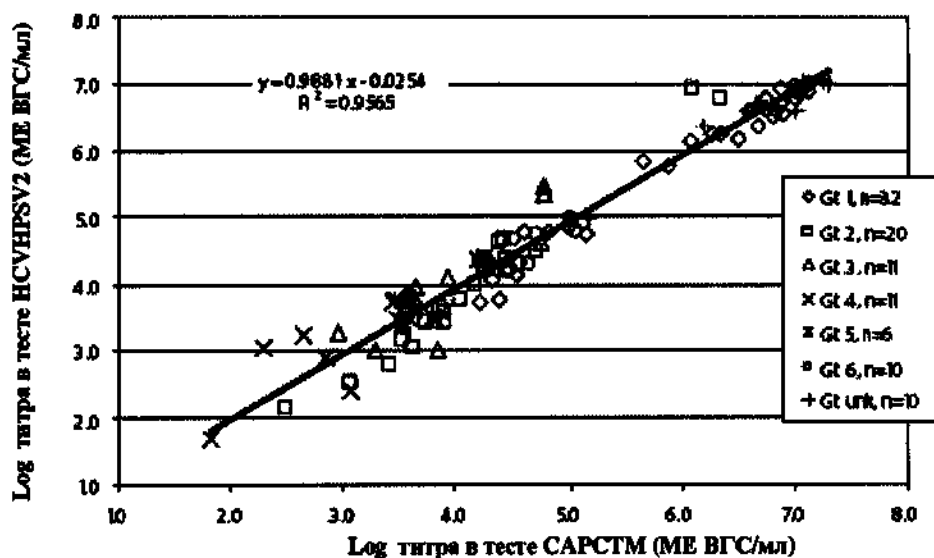


Рисунок 11
Корреляция результатов, полученных в тесте COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 применяемого с системой High Pure (HCVHPSV2) и тесте COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV Test (CAPCTM)



Литература

1. Orito, E., Mizokami, M., Suzuki, K. et al. 1995. Loss of serum HCV RNA at week 4 of interferon- α therapy is associated with more favorable long-term response in patients with chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology* 46:109-115.
2. Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. and Houghton, M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis viral genome. *Science* 244:359-362.
3. Alter, H. 1991. Descartes before the horse: I clone, therefore I am: The Hepatitis C virus in current perspective. *Annals of Internal Medicine* 115:644-649.
4. Lauer, G.M. and Walker, B.D. 2001. Hepatitis C Virus Infection. *New England Journal of Medicine* 345:41-52.
5. World Health Organization, *Weekly Epidemiological Record*, 1999. 74:421-428.
6. Kessler, H.H., Santner, B.J., Umlauf, F. et al. 1996. Quantitation and genotyping of Hepatitis C virus RNA in sera of hemodialysis and AIDS patients. *Clinical Diagnostic Virology* 5:73-78.
7. Orito, E., Mizokami, M., Nakano, T. et al. 1994. Serum hepatitis C virus RNA level as a predictor of subsequent response to interferon- α therapy in Japanese patients with chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology* 44:410-414.
8. Reichard, O., Yun, Z.B., Sonnerborg, A. et al. 1993. Hepatitis C viral titers in serum prior to, during, and after oral treatment with ribavirin for chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology* 41:99-102.
9. Puoti, M., Zonaro, A., Ravagli, A. et al. 1992. Hepatitis C virus RNA and antibody response in the clinical course of acute Hepatitis C virus infection. *Hepatology* 16:877-881.
10. Young, K., Resnick, R., and Myers, T. 1993. Detection of Hepatitis C virus RNA by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Journal of Clinical Microbiology* 31:882-886.
11. Stuyver, L., Rossau, R., Wyseur, A. et al. 1993. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *Journal of General Virology* 74:1093-1102.
12. Machida, A., Ohnuma, H., Tsuda, F. et al. 1992. Two distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies directed to the putative core protein. *Hepatology* 16:886-891.
13. Bukh, J., Purcell, R. H., and Miller, R.H. 1992. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 89:4942-4946.
14. Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E, Cheng L, Ramankutty T, Clarke D, Yawata H, Sakakura Y, Hirose T, Impriali C. 2001. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Clin Microbiol* 8:2937-45.
15. Smith, E.S., Li, A.K., Wang, A.M., Gelfand, D.H., Myers, T.M. 2003. Amplification of RNA: High-Temperature Reverse Transcription and DNA Amplification with a Magnesium-Activated Thermostable DNA Polymerase. In *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Dieffenbach C.W. and Dveksler G.S., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 211-219.
16. Longo, M.C., Berninger, M.S. and Hartley, J.L. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125-128.
17. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology* 10:413-417.
18. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, J.K., and Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994.
19. Saldanha, J., Heath, A., Aberham, C., Albrecht, J., Gentili, G., Gessner, M. and Pisani, G. 2005. World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays. *Vox Sanguinis* 88:202-204.
20. Richmond, J.Y. and McKinney, R.W. eds. 1999. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. HHS Publication Number (CDC) 93-8395.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline-Third Edition*. CLSI Document M29-A3 Wayne, PA:CLSI, 2005.
22. International Air Transport Association. *Dangerous Goods Regulations*, 41st Edition. 2000. 704 pp.

Набор High Pure System Viral Nucleic Acid Kit производится для:
Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ 08876 USA
A Member of the Roche Group



COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 manufactured by:
Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, 08876 USA
A Member of the Roche Group



Distributed by

Roche Diagnostics
Indianapolis, IN 46256 USA
(For Technical Assistance call the
Roche Response Center
toll-free: 1-800 526 1247)

Roche Diagnostics (Schweiz) AG
CH-6343 Rotkreuz

Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim, Germany

Roche Diagnostics S.L.
E-08006 Barcelona

Roche Diagnostica Brasil Ltda.
CNPJ nº 30.280.358/0001-86
Av. Engenheiro Billings, 1729
05321-010-São Paulo-SP
Serviço de atendimento ao
consumidor: 0800.77 20295

Roche Diagnostics
H7V 4A2 Laval, Quebec
(For Technical Assistance call:
Pour toute assistance technique,
appeler le: 1-877 273 3433)

Roche Diagnostics
F-38240 Meylan

Distributore in Italia:
Roche Diagnostics SpA
Piazza Durante 11
I-20131 Milano

Distribuidor em Portugal:
Roche Farmacêutica Quimica, Lda
P-2700 Amadora

ROCHE, AMPLICOR, AMPERASE, AMPLILINK, AMPLIPREP, COBAS, TAQMAN и HIGH PURE являются торговыми марками Roche.
ROCHE RESPONSE CENTER является сервисным знаком Roche.

Защищенная РНК® (Armored RNA®) является патентованной технологией, разработанной совместно Ambion, Inc. и Cenetron Diagnostics, LLC.

Патенты США #5,677,124, #5,919,625, и #5,939,262. Armored RNA® является торговой маркой Ambion и Cenetron.

ProClin являются торговой маркой Rohm and Haas Company.

Microsoft и Windows XP являются зарегистрированными марками или торговыми марками Microsoft Corporation в США и/или других странах.

Copyright 2007, Roche Molecular Systems, Inc. All rights reserved.

09/2007

Doc Rev. 3.0

04873505001-03



Roche Diagnostics GmbH
D-68298 Mannheim

