

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор



О.В.Нестеров

«02» февраля 2010г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению изделия медицинского назначения: Наборы реагентов для прибора преаналитической подготовки ПЦР-анализов Cobas AmpliPrep и анализаторов Cobas TaqMan 48, Cobas TaqMan, Cobas AmpliCor



Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV

Для диагностики *IN VITRO*.

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV

HIMCAP

48 Tests P/N: 03568547 190

Промывочный реагент для COBAS AmpliPrep/
COBAS TaqMan

PG WR

5.1 Liters P/N: 03587797 190

Назначение теста

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV является *in vitro* тестом, основанным на амплификации нуклеиновых кислот, и предназначен для количественного определения РНК вируса гепатита С (ВГС) в человеческой плазме или сыворотке крови путем автоматической подготовки образцов в приборе COBAS AmpliPrep и автоматической амплификации и детекции в анализаторе COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48. Тест предназначен для использования совместно с клиническими данными и другими лабораторными маркерами ВГС-инфекции. Тест может применяться для определения вероятности устойчивого вирусологического ответа на ранних этапах терапии и оценки вирусного ответа на противовирусную терапию на основании определения изменений уровней РНК ВГС в плазме или сыворотке крови на протяжении курса антиретровирусной терапии.

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV не предназначен для скрининга на ВГС крови и ее продуктов или для подтверждающей диагностики ВГС-инфекции.

Введение

Вирус гепатита С¹ является самостоятельным этиологическим агентом, с которым связано 90-95% случаев посттрансфузионного гепатита ни-А ни-В^{2,3}. 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 манипуляциям³. Распространенность ВГС-инфекции, по данным иммунологических серологических исследований, составляет от 0.6% в Канаде до 1.5% в Японии².

Наличие у инфицированных ВГС пациентов антител анти-ВГС привело к созданию иммунологических тестов для специфичного выявления этих антител. Наличие 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, хотя определение капсидного антигена ВГС является возможным.

Определение уровней аланин аминотрансферазы (АЛТ) является суррогатным маркером ВГС-инфекции, однако этот метод не является прямым определением виремии ВГС. Уровень подъема АЛТ не коррелирует напрямую с уровнем виремии 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 виремии^{4,6}. С помощью ПЦР выявление виремии ВГС возможно до иммунологической сероконверсии^{7,8}, также данный метод позволяет определять вирусную нагрузку у позитивных по антителам пациентов с хронической ВГС-инфекцией, получающих лечение интерфероном⁹.

Принцип теста

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV является тестом на основе амплификации нуклеиновых кислот, предназначенным для количественного определения РНК ВГС в человеческой плазме или сыворотке крови. Подготовка образцов проводится автоматизировано в приборе COBAS AmpliPrep, амплификация и детекция проводится автоматизировано в анализаторе COBAS TaqMan или анализаторе COBAS TaqMan 48.

В основе теста COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV лежат три основных процесса: (1) выделение РНК ВГС 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 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV позволяет проводить автоматическую подготовку образцов с последующей автоматизированной обратной транскрипцией, ПЦР-амплификацией и детекцией мишени – РНК

ВГС и РНК количественного стандарта (КС) ВГС. Реагент Мастермикс содержит праймеры, специфичные и для РНК ВГС, и для РНК КС ВГС. Мастермикс был 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, применение которого позволяет компенсировать ингибирование и контролировать процессы пробоподготовки и амплификации, что обеспечивает более точное определение РНК ВГС в каждом образце. 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 TaqMap или анализатор COBAS TaqMap 48 рассчитывает концентрацию РНК ВГС в тестируемых образцах на основании сопоставления сигнала ВГС с сигналом КС ВГС в каждом образце и контроле.

Выбор мишени

Выбор последовательности-мишени РНК ВГС определяется наиболее консервативным участком генома среди разных генотипов ВГС^{10,11}. Для выделения РНК ВГС и РНК КС ВГС используется метод тотального выделения на кремниевом носителе, для амплификации РНК ВГС и РНК КС ВГС в качестве праймеров используются специфичные олигонуклеотиды. Применение мишень-специфичных и КС-специфичных олигонуклеотидных зондов, меченных двумя красителями каждый, позволяет независимое определение ампликонов ВГС и ампликонов КС ВГС. Соответственно, правильный выбор праймеров и олигонуклеотидных зондов крайне важен для нормального выявления всех субтипов ВГС. В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMap HCV для обратной транскрипции и амплификации используются праймеры к последовательности консервативной 5'-нетранслируемой области генома ВГС¹². Нуклеотидная последовательность праймеров была оптимизирована таким образом, чтобы амплификация генотипов ВГС была одинаково эффективной.

Подготовка образцов

В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMap HCV подготовка образцов проводится автоматизировано в приборе COBAS AmpliPrep методом тотального выделения на кремниевых носителях. Выделение проводится из 850 мкл плазмы или сыворотки крови. Вирусные частицы ВГС лизируются при нагревании во время инкубации с протеазой и хаотропным лизирующим/связывающим буфером, высвобождающим нуклеиновые кислоты и защищая 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 и магнитными стеклянными частицами. Затем смесь инкубируется и РНК ВГС и РНК КС ВГС 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 ВГС и РНК КС ВГС, вносятся в амплификационную смесь и переносятся в анализатор COBAS TaqMap или анализатор COBAS TaqMap 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

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^{13,14}. 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 TaqMap или COBAS TaqMap 48 нагревает реакционную смесь для того, чтобы денатурировать гибрид РНК:жДНК и открыть

сайты посадки праймеров. При охлаждении смеси праймеры гибридизуются с ДНК-мишенью. Термостабильная ДНК-полимераза *Thermus specie* Z05 (Z05) в присутствии ионов Mg^{2+} и избытке трифосфатов дезоксирибонуклеотидов (dNTPs) – трифосфатов дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезоксицитидина, дезоксиуридина и дезокситимидина, удлиняет присоединившиеся праймеры комплементарно матрице, в результате чего образуется молекула двуполечной 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. Амплифицируется только участок генома ВГС, ограниченный праймерами; полный геном ВГС не амплифицируется.

Избирательная амплификация

Избирательность амплификации нуклеиновой кислоты – мишени достигается в тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV 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, образовавшиеся в процессе ПЦР.

Детекция продуктов ПЦР в тесте COBAS TaqMan

В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV 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 ВГС и для КС ВГС олигонуклеотидные зонды мечены репортерным красителем и гасящим красителем. В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV, 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

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV 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.



Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV

Для диагностики *IN VITRO*.

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV

HIMCAP

48 Tests P/N: 03587819 190

Промывочный реагент для COBAS AmpliPrep/
COBAS TaqMan

PG WR

5.1 Liters P/N: 03587797 190

Назначение теста

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV является *in vitro* тестом, основанным на амплификации нуклеиновых кислот, и предназначен для количественного определения ДНК вируса гепатита В (ВГВ) 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 предназначен для использования совместно с клиническими данными и другими лабораторными маркерами ВГВ-инфекции для оценки вирусного ответа на противовирусную терапию на основании определения изменений уровней ДНК ВГВ в плазме.

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV не предназначен для скрининга на ВГВ крови и ее продуктов или для подтверждающей диагностики ВГВ-инфекции.

Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) является одним из нескольких вирусов, вызывающих гепатит. Более двух миллиардов человек в мире инфицированы или были инфицированы ВГВ, более 350 миллионов из них являются хроническими носителями инфекции¹. Для хронических носителей характерна высокая степень риска отдаленных осложнений инфекции, таких как хронический гепатит, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома^{2,3,4}. Серологические маркеры ВГВ широко используются для диагностики и прогноза острой и хронической инфекции ВГВ. Основным маркером ВГВ-инфекции является выявление поверхностного антигена ВГВ (HBsAg). Несмотря на то, что у носителей может исчезать HBsAg и появляться антитела к HBsAg, у них в дальнейшем остается высоким риск развития тяжелого поражения печени^{5,6}. Е антиген ВГВ (HBeAg) обычно используется как вторичный маркер активной репликации ВГВ, связанной с прогрессирующим заболеванием печени. Продолжающаяся циркуляция HBeAg указывает на повышенный риск развития заключительной стадии заболевания печени^{7,8}. Некоторые варианты ВГВ могут продуцировать HBeAg, не выявляемый в сыворотке крови, или могут утрачивать способность продуцировать HBeAg даже при активной инфекции⁹. Таким образом, применение данного маркера для мониторинга прогрессирования заболевания ограничено¹⁰. Показано, что выявление ДНК ВГВ в сыворотке крови имеет прогностическое значение с точки зрения исхода острой и хронической ВГВ-инфекции^{11,14}. Современные методы позволяют выявлять ДНК ВГВ после исчезновения HBsAg¹⁵, или при ВГВ-инфекции, не имеющей серологических маркеров¹⁶. Однако взаимосвязь между серологическими маркерами и уровнями ДНК ВГВ в настоящее время не установлена. Эффективность антивирусной терапии, используемой для лечения пациентов с ВГВ, может оцениваться на основании серологических маркеров или активности печеночных ферментов. Однако наиболее надежным и прямым методом измерения вирусной репликации является количественное определение ДНК ВГВ в сыворотке крови или плазме^{13,17-19}. Показано, что быстрое и устойчивое снижение уровней ДНК ВГВ у пациентов, получающих интерферон-альфа, ламивудин, ганцикловир или адефовир дипивоксил, является прогностическим фактором благоприятного результата терапии^{10,20-24}. Мониторинг уровней ДНК ВГВ позволяет прогнозировать развитие устойчивости к ламивудину²⁵. Таким образом, количественный тест для определения ДНК ВГВ является важным диагностическим инструментом, используемым совместно с определением серологических маркеров при ведении пациентов с ВГВ-инфекцией.

Концентрация ДНК ВГВ в плазме может определяться методами амплификации нуклеиновых кислот, например, в полимеразной цепной реакции (ПЦР)^{27,29}. В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV метод ПЦР используется для достижения максимальной чувствительности и динамического диапазона при количественном определении ДНК ВГВ в образцах плазмы с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Принцип теста

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV является тестом на основе амплификации нуклеиновых кислот, предназначенным для количественного определения ДНК ВГВ в человеческой плазме. Подготовка образцов проводится автоматизировано в приборе COBAS AmpliPrep, амплификация и детекция проводятся автоматизировано в анализаторе COBAS TaqMan или анализаторе COBAS TaqMan 48.

В основе теста COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV лежат два основных процесса: (1) выделение ДНК ВГВ из образца; (2) одновременная амплификация²⁷ в ПЦР ДНК-мишени и детекция расщепляемого олигонуклеотидного зонда, меченного двумя красителями, специфичного для выявляемой мишени.

Тест COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV позволяет проводить автоматическую подготовку образцов с последующей автоматизированной ПЦР-амплификацией и детекцией мишени – ДНК ВГВ и ДНК количественного стандарта (КС) ВГВ. Реагент Мастермикс содержит праймеры и зонды, специфичные для ДНК ВГВ, и для ДНК КС ВГВ. Мастермикс был разработан для одинаково эффективного количественного определения всех генотипов ВГВ от А до G. Выявление амплифицированной ДНК производится с помощью мишень-специфичного и КС-специфичного олигонуклеотидных зондов, меченных каждый двумя красителями, что позволяет проводить независимое выявление ампликона ВГВ и ампликона КС ВГВ.

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

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

Выбор мишени

Выбор последовательности-мишени ДНК ВГВ определяется наиболее консервативным участком генома среди разных генотипов ВГВ. Для выделения ДНК ВГВ и ДНК КС ВГВ используется метод тотального выделения на кремниевом носителе, для амплификации ДНК ВГВ и ДНК КС ВГВ в качестве праймеров используются специфичные олигонуклеотиды. Применение мишень-специфичных и КС-специфичных олигонуклеотидных зондов, меченных двумя красителями каждый, позволяет независимое определение ампликонов ВГВ и ампликонов КС ВГВ. Соответственно, правильный выбор праймеров и олигонуклеотидных зондов крайне важен для нормального выявления всех генотипов ВГВ. В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV для амплификации в ПЦР используются три праймера. Генерирующий флуоресцентный сигнал зонд, меченный двумя красителями, гибридизуется с минус-цепью и разрушается ДНК-полимеразой Z05 при удлинении праймеров. Ампликон генотипов А-Е состоит из 145 нуклеотидов. Ампликон генотипа G, однако, состоит из 181 нуклеотидов. Вставка величиной 36 нуклеотидов в высококонсервативном участке pre-Core/Core генома ВГВ является причиной большего ампликона генотипа G³⁰.

Подготовка образцов

В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV подготовка образцов проводится автоматизировано в приборе COBAS AmpliPrep методом тотального выделения на кремниевых носителях. Выделение проводится из 850 мкл плазмы. Вирусные частицы ВГВ лизируются при нагревании во время инкубации с протеазой и хаотропным лизирующим/связывающим буфером, высвобождающим нуклеиновые кислоты и защищающим ДНК ВГВ от действия ДНКаз, содержащихся в плазме. Протеаза и известное количество молекул защищенной ДНК КС ВГВ вносятся в каждый образец вместе с лизирующим буфером и магнитными стеклянными частицами. Затем смесь инкубируется и ДНК ВГВ и ДНК КС ВГВ 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 ДНК ВГВ и ДНК КС ВГВ, вносятся в амплификационную смесь и переносятся в анализатор COBAS TaqMan или анализатор COBAS TaqMan 48. Затем происходит амплификация РНК-мишени и РНК КС ВГВ и одновременная детекция расщепляемых меченных олигонуклеотидных зондов, специфичных для мишени и КС.

ПЦР-амплификация

Реакция ПЦР-амплификации проводится с помощью термостабильного рекомбинантного фермента *Thermus species* ДНК-полимеразы (Z05). В присутствии ионов марганца (Mn²⁺) и определенном составе буфера, Z05 обладает активностью ДНК-полимеразы^{31,32}. Это позволяет проводить ПЦР-амплификацию одновременно с детекцией ампликонов в реальном времени.

Обработанные образцы вносятся в амплификационную смесь в амплификационные пробирки (К-пробирки), в которых проводится ПЦР-амплификация. Термостабильная ДНК-полимераза *Thermus species* Z05 (Z05) в присутствии ионов Mn²⁺ и избытке трифосфатов дезоксинуклеотидов (dNTPs) – трифосфатов дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезоксицитидина и дезоксиуридина удлиняет присоединившиеся праймеры, образуя цепь ДНК.

Амплификация мишени

Обработанные образцы вносятся в амплификационную смесь в амплификационные пробирки (К-пробирки), в которых проводится ПЦР-амплификация. Термоциклер анализатора COBAS TaqMan или COBAS TaqMan 48 нагревает реакционную смесь для того, чтобы денатурировать двуцепочечную ДНК и открыть сайты посадки праймеров. При охлаждении смеси праймеры гибридизуются с ДНК-мишенью. Термостабильная ДНК-полимераза *Thermus specie* Z05 (Z05) в присутствии ионов Mg^{2+} и избытке трифосфатов дезоксирибонуклеотидов (dNTPs) – трифосфатов дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезоксицитидина и дезоксиуридина (вместо тимидина) 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. Амплифицируется только участок генома ВГВ, ограниченный праймерами; полный геном ВГВ не амплифицируется.

Избирательная амплификация

Избирательность амплификации нуклеиновой кислоты – мишени достигается в тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV за счет применения фермента AmpErase (урацил-N-гликозилазы) и трифосфата дезоксиуридина (dUTP). Фермент AmpErase распознает и катализирует разрушение цепей ДНК, содержащих дезоксиуридин²⁶, 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, образовавшиеся в процессе ПЦР.

Детекция продуктов ПЦР в тесте COBAS TaqMan

В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV используется метод ПЦР в реальном времени^{27,28}. 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 ВГВ и для КС ВГВ олигонуклеотидные зонды мечены репортерным красителем и гасящим красителем. В тесте COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV, для мечения зондов ВГВ и КС ВГВ 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 ДНК ВГВ и ДНК КС ВГВ 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 ДНК ВГВ и ДНК КС ВГВ. 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 HBV является количественным в широком динамическом диапазоне, поскольку мониторинг ампликонов производится в экспоненциальной фазе амплификации. Чем выше титр ВГВ, тем раньше флуоресцентный сигнал репортерного красителя зонда ВГВ превысит пороговый уровень флуоресценции (Рисунок 1). Поскольку количество ДНК КС ВГВ одинаково во всех образцах, флуоресцентный сигнал репортерного красителя зонда КС ВГВ 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 ВГВ в образце. Двукратное увеличение титра соответствует с уменьшением на 1 Ct для ДНК-мишени ВГВ, а 10-кратное увеличение титра соответствует уменьшению на 3.3 Ct.

CN4**AMPLICOR AVIDIN-HRP CONJUGATE****3 x 100 тестов**

Ампликор авидин-пероксидазный (HRP) конъюгат.
авидин- пероксидазный конъюгат в буферном растворе,
содержащий 1% ПроКлин (150) (консервант), эмульгатор,
бычий гамма глобулин и 0,1% фенол

SB3**Substrat A****5 x 75 тестов**

Ампликор субстрат А, раствор цитрата, содежащий 0,01%
перекиси водорода и 0,0% ПроКлин 150

SB**Substrat A**

Ампликор субстрат В содержит 0,1% 3,3' 5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ)

5 x 5 мл

В 40% диметилформамиде (ДМФ)

Внимание! ТМБ и ДМФ являются токсичными веществами, которые могут вызвать повреждение плода, кожи и глаз. Чтобы избежать повреждений, знакомьтесь с инструкциями по работе с токсичными веществами перед исследованием. В случае несчастного случая, если Вы почувствовали недомогание, то немедленно обратитесь за медицинской помощью (промаркируйте специально реагенты содержащие токсичные вещества).

COBAS AMPLICOR**Wash Buffer****WB**

(10X- Wash concentrate) Ампликор 10х отмывающий концентрат.
Фосфат натрия и солевой раствор с ЭДТА,
содержащий <2% детергента и 0,5% ПроКлин 300

2 x 250 тестов

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Для данного теста используется только человеческая плазма с антикоагулянтами ЭДТА и АСД. Гепарин, как было показано, ингибирует ПЦР и не должен быть применен в данном тесте.

Не пипетируйте ртом.

Не пить, не есть, не курить в рабочих зонах лаборатории. Одеть перчатки, лабораторную одежду и очки, когда работаете с образцами и реагентами набора. Мойте руки тщательно после работы с образцами и реагентами набора.

Избегайте микробной и рибонуклеазной контаминации реагентов, когда переносите аликвоты из реагентных флаконов. Используйте стерильные одноразовые пипетки и наконечники свободные от РНКаз.

Не сливайте реагенты.

Уничтожайте неиспользованные реагенты и загрязненный материал в соответствии с вашими государственными законами.

Не используйте набор после его даты годности.

Данные по сохранению отдельных реагентов, материалов требуйте от Ответственного (регионального) центра Рош или вашего местного офиса Рош.

Рабочий поток в лаборатории должен быть организован однонаправленно, начиная с Зоны приготовления реагентов и далее передвигаясь в Зону обработки образцов, зону постановки ПЦР и детекции ПЦР. До-амплификационные манипуляции должны начинаться с приготовления реагентов и далее продолжаются во время приготовления образца.

Манипуляции по приготовлению реагентов и обработки образцов осуществляются в специально отделенных зонах. Расходный материал и оборудование должно быть обозначено для каждой манипуляции и не используется в других этапах, не переносится из зоны в зону.

Перчатки используются только в данной зоне и не переносятся в другие зоны. Оборудование и материалы, применяемые для приготовления реагентов, не должны использоваться при обработке образцов или пипетирования в зонах постановки ПЦР или с другими источниками мишенной ДНК/РНК. Амплификационные и детекционные материалы и оборудование должны находиться в зонах амплификации и детекции все время.

Образцы должны обрабатываться также как любой инфекционный материал в соответствии с правилами работы с таким материалом в лабораториях («Правила биологической и микробиологической безопасности в биомедицинских лабораториях»).

Предполагается очищать и дезинфицировать все рабочие поверхности 10% дез. раствором.

Автоклавировать любое оборудование или материалы, которые были в контакте с клиническими образцами перед выбросом.

ВНИМАНИЕ.

Данный набор содержит компонент, полученный из человеческой крови (отрицательная плазма человеческая). Исходный материал для плазмы проанализирован по правилам США (FDA) и не обнаружено присутствие гепатита В (поверхностного антигена HbsAg), антител к ВИЧ 1,2 и к гепатиту С. Однако не известны методы, которые бы дали полную гарантию в том, что продукты человеческой крови не переносят инфекционных агентов. Поэтому все материалы, полученные от человека, должны рассматриваться как потенциально инфекционные. С такими реагентами должны работать, как с потенциально инфекционными, по «Правилам безопасности в микробиологических и биомедицинских лабораториях». Поэтому чистят и дезинфицируют поверхности 10% дезраствором. Автоклавируют любой материал или оборудование, которое приходило в контакт с отрицательной человеческой плазмой, прежде чем их выбросить.

ВИЧ-1 МОНИТОР количественный стандарт в.1,5, ВИЧ-1 МОНИТОР дилуэнт для образцов, ВИЧ-1 МОНИТОР (-) контроль, ВИЧ-1 МОНИТОР низкий (+) контроль,

ВИЧ-1 МОНИТОР высокий(+) контроль, **ВИЧ-1 МОНИТОР** реакционная смесь (master mix), **ВИЧ-1 МОНИТОР** раствор марганца содержат азид натрия. Азид натрия реагирует со свинцовыми и медными трубами, вызывая их коррозию. Поэтому, когда выливаются растворы с азидом натрия, их необходимо многократно разводить водой.

Одевайте очки, лабораторную одежду и перчатки, когда работаете с **ВИЧ-1 МОНИТОР** лизирующим реагентом, денатурирующим раствором, гибридационным буфером, авидин – HRP конъюгатом, субстратом А, субстратом В. Избегайте контакта этих материалов с кожей, глазами и слизистыми оболочками. Если же контакт случился, то немедленно промойте это место большим количеством воды. Если же пролили эти реагенты, то прежде чем вытереть насухо, разведите водой. Будет ожог если место контакта не обработать.

Субстрат В и его рабочая смесь содержат диметилформамид, который вызывает ожог, а при большой дозе при приеме внутрь тератогенное действие.

ОДЕВАЙТЕ ПЕРЧАТКИ КОГДА РАБОТАЕТЕ С ЭТИМИ РЕАГЕНТАМИ. СЛЕДУЕТ ИЗБЕГАТЬ КОНТАКТА С КОЖЕЙ И ВДЫХАНИЯ ПАРОВ ЭТИХ РЕАГЕНТОВ.

По токсикологическим причинам не давайте реагировать **ВИЧ-1** лизирующему реагенту, содержащему гуанидин тиоционат с раствором гипохлорида натрия.

Должны использоваться пробирки с завинчивающимися крышками, чтобы избежать разбрызгивания и потенциальной контаминации при обработке образцов.

ХРАНЕНИЕ И ТРЕБОВАНИЯ ВО ВРЕМЯ МАНИПУЛЯЦИЙ С РЕАГЕНТАМИ.

Сохраняйте **NHR**, **HIV-1(-)C**, **HIV-1 L(+)**, **HIV-1 (-)H (+)C** (**ВИЧ-1 МОНИТОР** контрольные реагенты (отрицательная человеческая плазма, **ВИЧ-1 МОНИТОР(-)** и **(+)** контроли) при 2-8°C. Эти реагенты стабильны до даты использования, которая указана на флаконе.

Храните **ВИЧ-1 МОНИТОР** реагенты для приготовления образцов при 2-8°C. Если образовался осадок в лизирующем реагенте во время хранения, прогрейте реагент при 25-37°C до полного растворения и перемешайте. Эти реагенты стабильны до даты использования указанной на флаконе. Рабочая лизирующая смесь (готовится добавлением **ВИЧ-1 МОНИТОР** количественного стандарта в **ВИЧ-1** лизирующий реагент) должна сохраняться при комнатной температуре и использоваться в течении 4 часов после ее приготовления.

Храните **HIV-1 MMX, v1,5** и **HIV-1 Mп +2** **ВИЧ-МОНИТОР** реагенты для амплификации при 2-8°C. Эти реагенты стабильны до даты использования, указанной на флаконе. Рабочая реакционная смесь, приготовленная добавлением **ВИЧ-1 МОНИТОР** раствора марганца в **ВИЧ-1 МОНИТОР** реакционную смесь, приготовленная добавлением **ВИЧ-1 МОНИТОР** раствора марганца в **ВИЧ-1 МОНИТОР** Реакционную смесь сохраняется при комнатной температуре в течение 4 часов до использования.

AD3 Реагент для разбавления ампликонов храните при 2-25°C. Однажды загруженный на **COBAS AMPLICOR** анализатор реагенты стабильны в течении 30 дней при 2-8°C.

AD3 может быть использован в течении 4 инструментальных циклов и должен храниться при 2-8°C между инструментальными циклами.

IMPS1, v1,5 и **IM4 v 1,5** должны храниться при 2-8°C. Эти реагенты стабильны до даты указанной на флаконе. Однажды смешанные эти реагенты стабильны 14 дней при 2-8°C. Смешанными эти реагенты могут быть использованы на приборе 2 инструментальных цикла (24 часа каждый цикл) и должны храниться при 2-8°C между инструментальными циклами.

IQ PS1v1,5 и **IQ4 v1,5** должны храниться при 2-8°C. Эти реагенты стабильны до даты указанной на флаконе. Однажды смешанные (**IQ PS1v1,5** и **IQ4 v1,5**) эти рабочие реагенты стабильны 30 дней при 2-8 °C. Рабочие реагенты могут быть использованы максимум 4 инструментальных цикла (24 часа каждый цикл) и должны храниться между циклами при 2-8°C



10.05.2019