

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от «___» _____ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС»



В.Г. Нестеренко

_____ 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению «ViroSeq HIV-1»

Материалы расходные для проведения генотипирования вируса
иммунодефицита человека ViroSeq HIV-1 с целью выявления мутаций
лекарственной устойчивости

Предназначение

Система генотипирования ViroSeq HIV-1 предназначена для определения геномных мутаций ВИЧ, которые дают устойчивость к специфическим типам противовирусных препаратов, для проведения мониторинга и лечения ВИЧ инфекции. Конкретно, система генотипирования ViroSeq HIV-1 может быть использована для:

- Определения устойчивости ВИЧ-1 субтипа Б проб плазмы крови, собранной на ЭДТА с вирусной нагрузкой от 2000 до 750,000 копий/мл
- Генотипирования целостного протеазного гена ВИЧ-1 с кодонов 1-99 и две трети гена обратной транскриптазы (ОТ) с кодонов 1-335

Для того чтобы использовать систему генотипирования ViroSeq HIV-1:

- Пользователь (оператор или технолог) должен быть обучен работе с системой.
- Интерпретация и применение результатов должны быть сделаны квалифицированным врачом (терапевтом).

Набор не должен использоваться в качестве скринингового теста на ВИЧ или диагностического теста для подтверждения наличия ВИЧ инфекции.

Показания к применению

Показания к применению охватывают следующие популяции:

- ВИЧ-1 инфицированных лиц при несостоятельности лекарственной терапии (с повышенной вирусной нагрузкой) перед сменой терапии;
- ВИЧ-1 инфицированных лиц при первичном поступлении перед начальной лекарственной терапией.

Резюме и объяснение

Вирус Иммунодефицита Человека первого типа (ВИЧ-1) является этиологическим агентом, ответственным за пандемию Синдрома Приобретенного ИммуноДефицита (СПИДа) ([1,2]). Лечение ВИЧ-1 инфекции сильнодействующей антиретровирусной терапией может привести к выраженному и длительному подавлению репликации ВИЧ-1 ([3,4]). Однако, полное уничтожение ВИЧ-1 является проблематичным, поскольку латентная инфекция обеспечивает механизм персистенции вируса в течение всей жизни и вторичного его появления ([5,6]). Зачастую несостоятельность терапии происходит в результате несоблюдения (или неправильного соблюдения) режима терапии и/или появления вирусных штаммов, устойчивых к лекарствам ([7]). Эти ВИЧ-1 мутантные штаммы могут быть устойчивыми к одному или более лекарствам в каждом из трех классов антиретровирусных препаратов – нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы, не- нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы и ингибиторов протеазы ([8]). К тому же, устойчивость к данному лекарству может генерировать перекрестную устойчивость к другим лекарствам того же класса ([7,9]). Однако, несостоятельность терапии не всегда является результатом устойчивости ко всем лекарствам в режиме терапии ([10]). Следовательно, определение наилучшей спасающей терапии для пациентов, для которых оказались несостоятельными многие терапевтические режимы, является огромной проблемой.

Ключевым фактором в определении новых стратегий лечения является знание генотипа вирусной устойчивости, как показано наличием мутаций, присутствующих в массе вирусов в плазме пациентов ([11]). Ретроспективные и ожидаемые исследования, основанные на вмешательстве, свидетельствуют о клинической пользе тестирования устойчивости ([11-14]). Эти исследования указывают на то, что наличие лекарственной устойчивости является независимым фактором риска для несостоятельности терапии

([11]). В настоящее время тестирование устойчивости рекомендуется для выбора новых режимов терапии после неудачной терапии и для мониторинга терапии у беременных женщин ([11]). Тестирование устойчивости должно также рассматриваться перед началом терапии острых инфекций и лечения первичных (без осложнений) пациентов с установленной инфекцией ([11]).

Система генотипирования ViroSeq HIV-1 выявляет мутации в области ОТ и протеазы гена *pol* (полимеразы) и обеспечивает врачей отчетом, дающим генетические свидетельства вирусной устойчивости. Это целостная система, которая обеспечивает реагентами для выделения вирусной РНК из плазмы, ОТ-ПЦР и секвенирования ([15,16]). Весь ген протеазы и две трети гена обратной транскриптазы амплифицируются для получения ампликона 1.8 кб. Ампликон используется как образец для секвенирования с помощью семи праймеров, которое дает примерно 1.3 кб консенсус последовательность. Программное обеспечение сравнивает консенсус последовательность с известной референс последовательностью, HXB-2, для определения мутаций, присутствующих в пробе. В заключение, программное обеспечение ViroSeq использует патентованный алгоритм для анализа мутаций и генерирует отчет о лекарственной устойчивости.

Принципы процедуры анализа

Обучение оператора и ежегодная ресертификация являются критическими для выполнения анализа генотипирования ViroSeq HIV-1 и достижения правильных результатов.

Система генотипирования ViroSeq HIV-1 базируется на шести основных процедурах:

- Приготовление проб
- Обратная Транскрипция (ОТ)
- Полимеразная Цепная Реакция (ПЦР)
- Циклическое секвенирование
- Автоматическая детекция последовательности
- Анализ с помощью программного обеспечения

Приготовление проб

(Время, требуемое для завершения приготовления 12 проб составляет 2.5-3.0 часа; ручное время – 1.5 часа.)

Система для приготовления проб в системе генотипирования ViroSeq HIV-1 предназначена для выделения вирусной РНК ВИЧ-1 из 0.5 мл плазмы крови человека на ЭДТА. Проба плазмы вначале центрифугируется для при 4°C для того, чтобы сконцентрировать вирусные частицы ВИЧ-1 в осадке на дне пробирки. После удаления супернатанта, вирусные частицы в осадке разваливаются на составные части при использовании Буфера Лизиса Вируса (БЛВ). Вирусная РНК осаждается изопропанолом, затем образуется осадок и далее РНК очищается 70% этанолом. В итоге, очищенная вирусная РНК высушивается и ресуспендируется в растворителе РНК. Используя эту процедуру, система ViroSeq способна определить и генотипировать ВИЧ-1 пробы с вирусной нагрузкой от 2000 до 750,000 копий/мл.

Обратная транскрипция

(Время, требуемое для завершения транскрипции 12 проб составляет 2.0 часа; ручное время – 30 минут.)

Система генотипирования ViroSeq HIV-1 амплифицирует 1.8 кб область *pol* гена ВИЧ-1, которая простирается на весь ген протеазы и примерно две трети гена обратной транскриптазы (ОТ). После приготовления проб 10 мкл ресуспендированной РНК

переносится в 0.2 мл пробирки MicroAmp и нагревается до 65°C для того, чтобы релаксировать вторичную структуру РНК. Далее, 10 мкл реакционной смеси, содержащую Moloney Murine Leukemia Virus (MuLV) обратную транскриптазу, один праймер, дитиотрейтол (ДТТ), ингибитор РНКазы и дезоксинуклеотидтрифосфаты, добавляются в пробирки MicroAmp. Затем пробирки помещаются в термоциклер Applied Biosystems (GeneAmp® PCR System 9600 или 9700) и инкубируются в течение 1 часа для получения однонитевой комплементарной ДНК (кДНК).

Первое температурное условие (65°C, 30 сек) нарушает вторичную структуру РНК. Второе температурное условие в ОТ реакции - 42°C в течение 60 мин – позволяет праймерам связаться и удлиняться образующейся нити кДНК. Во время этого процесса однонитевые молекулы РНК ВИЧ-1, присутствующие в пробе, конвертируются в двунижевые РНК-кДНК гибриды. Пробы затем нагреваются до 99°C в течение 5 мин для инактивации фермента обратной транскриптазы. В заключение, пробы охлаждаются до 4°C в течение 10 мин – не превышайте длительности хранения 18 часов при 4°C. Эта температура гарантирует отсутствие деградации пробы перед следующим шагом.

Полимеразная цепная реакция

(Время, требуемое для завершения ПЦР 12 проб составляет 5.0 часов: ручное время – 15 минут.)

После обратной транскрипции РНК вирусной мишени, 30 мкл реакционной смеси, содержащей AmpliTaq Gold® ДНК полимеразу, прямой и обратный праймеры, dNTPs, AmpErase® UNG, добавляется к пробиркам с пробами, содержащими кДНК. Пробы затем переносятся в термоциклер (9600 или 9700) в рабочей области Амплифицированной ДНК и подвергаются действию установленных специфических температурных вариаций и условий в течение 4.5 часов.

Первый шаг в реакции ПЦР – единичный цикл при 50°C в течение 10 мин. На этой стадии фермент UNG контролирует контаминацию путем разрушения любых видов нуклеиновой кислоты, содержащей дезоксиуридин ([17]). ПЦР смесь (PCR Mix) ViroSeq содержит дезоксиуридин трифосфаты (dUTP), которые включаются в амплифицируемую ДНК во время ПЦР. Любой случайный остаток предварительно амплифицируемого материала, содержащий дезоксиуридин, выбирается и разрушается UNG, тогда как кДНК пробы, которая не содержит дезоксиуридин, остается интактной.

После контроля контаминации проба нагревается до 93°C в течение 12 мин для инактивации AmpErase UNG, активации AmpliTaq Gold ДНК-полимеразы и денатурации РНК-кДНК гибридов в однонижевые. Далее, существует три шага, повторяющихся 40 циклов на стадии ПЦР. Эти шаги: 93°C в течение 20 сек для денатурации ДНК в однонитевую, 64°C 45 сек для отжига праймера и 66°C 3 мин для элонгации праймера чтобы получить двунижевую ДНК. В течение этого процесса амплифицируется 1.8 кб фрагмент *pol* гена ВИЧ-1. Амплифицированные молекулы ДНК, также называемые ампликонами, затем нагреваются до 72°C в течение 10 мин для последнего удлинения, после чего охлаждаются до 4°C, при которых они хранятся готовыми для следующей процедуры.

Циклическое секвенирование

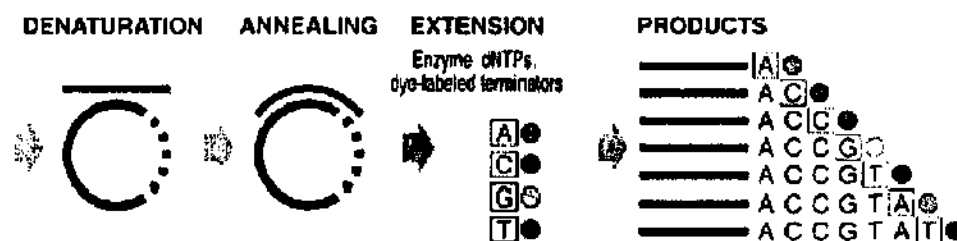
(Время, требуемое для завершения циклического секвенирования 12 проб составляет 5.0 часов; ручное время – 1.5 часа.)

ДНК-полимеразы копируют образцы однонитевой ДНК путем добавления нуклеотидов к растущей цепи, также известной как продукт элонгации. Элонгация цепи происходит у 3'

конца праймера, который прошел отжиг на комплементарной цепи. dNTP, добавленный к растущему продукту элонгации, выбирается путем парного соответствия основанию матричной цепи. Цепь удлиняется путем образования фосфодиэфирной связи между 3'-гидроксильной группой растущего конца праймера и 5'-фосфатной группой встраиваемого дезоксинуклеотида ([18]). Следовательно, рост идет в направлении от 5' к 3'.

ДНК-полимеразы могут также включать аналоги нуклеотидных оснований. Метод дидезокси секвенирования ДНК, разработанный Сангером с соавт. ([19]) использует это свойство путем применения 2',3'-дидезоксинуклеотидов (ddNTPs) в качестве субстратов. Однако, ddNTPs вызывают обрыв цепи при включении в 3' конце из-за отсутствия 3'-гидроксильной группы. Следовательно, цепь обрывается избирательно на А, Ц, Г или Т позиции. (Для более подробной информации см. *Applied Biosystems Automated DNA Sequencing Chemistry Guide*, P/N 4305080).

В стратегии Applied Biosystems для автоматического флуоресцентного секвенирования флуоресцентная метка включается в удлиняющуюся ДНК при использовании меченых терминирующих ddNTPs. Каждый из четырех ddNTPs помечен своим отдельным флуоресцентным красителем. Растущая цепь обрывается и метится одновременно при включении ddNTPs. Этот процесс создает «лестницу» ДНК последовательностей таким образом, что каждый последующий продукт элонгации длиннее на одну пару оснований предыдущего, как показано на диаграмме ниже. Терминаторы помечены таким образом, что А=зеленый, Ц=голубой, Г=желтый и Т=красный.



DENATURATION – денатурация
 ANNEALING – отжиг
 EXTENSION – элонгация
 PRODUCTS – продукты

Циклическое секвенирование в системе генотипирования ViroSeq HIV-1 имеет четыре стадии:

- Очистка ПЦР продукта
- Подсчет количества ДНК
- Циклическое секвенирование
- Очистка продуктов реакции секвенирования

Очистка ПЦР продукта

После ПЦР пробы очищаются, чтобы удалить невключившиеся dNTPs и праймеры при помощи Microcon® YM-100 микроконцентраторов, входящих в набор ViroSeq. Стадия очистки Microcon использует ультрафильтрационную мембрану, которая позволяет меньшим по размеру dNTPs и праймерам пройти сквозь нее, тогда как более крупные фрагменты ДНК-мишени остаются на верхней части фильтра. Эта стадия занимает примерно 25 мин.

Подсчет количества ДНК

5 мкл очищенного ПЦР продукта смешивается с эквивалентным количеством буфера для нанесения проб на агарозный гель и наносится на 1% агарозный гель, содержащий этидий бромид. Две аликвоты маркера количества ДНК также наносятся в следующую лунку. Электрофорез идет примерно 1 час, затем гель изымается и экспонируется под ультрафиолетовым (УФ) светом. Поскольку этидий бромид вызывает свечение ДНК в проходящем УФ, ДНК пробы может быть визуальна сравнена с различными фрагментами маркера количества ДНК с известной концентрацией ДНК. Из этого сравнения проводится полуколичественная оценка концентрации ДНК в каждой пробе и оставшийся ПЦР продукт разводится согласно оптимизированной концентрации для реакции циклического секвенирования.

Циклическое секвенирование

В системе генотипирования ViroSeq HIV-1 используется 7 праймеров (четыре-«вперед» и три обратных) для секвенирования всей области гена протеазы ВИЧ (кодоны 1-99) и две трети гена ОТ (кодоны 1-335). Химия терминатора BigDye[®], используемая в системе ViroSeq , позволяет достичь разрешения в 600 баз на генетическом анализаторе 3100. Следовательно, для завершения секвенирования фрагмента ДНК в 1.3 кб должны использоваться разнообразные праймеры.

Двенадцать микролитров каждой из семи смесей для секвенирования (по одной на каждый праймер) соединяются с 8 мкл очищенной, разведенной пробы в 96-луночной плашке или пробирке MicroAmp. Реакционные смеси инкубируются в термоциклере примерно 2.5 часа. Три шага повторяются в 25 циклах следующим образом: 96°C 10 сек для денатурации ДНК, 50°C 5 сек для отжига праймеров и 60°C 4 мин для элонгации праймеров. В конце процедуры пробы охлаждаются до температуры 4°C и хранятся до следующей стадии.

Очистка продуктов реакции секвенирования

Необходимо удалить все невключившиеся терминаторы BigDye из проб, для того чтобы они не интерферировали с секвенированными пробами и не мешали анализу. Система генотипирования ViroSeq HIV-1 предлагает три опции для очистки продуктов реакции секвенирования:

- Преципитация изопропанолом является простым, рентабельным решением проблемы очистки.
- Преципитация смесью этанол/ацетат натрия рекомендуется как рентабельный метод очистки.
- Планшеты CENTRI• SEP 96 column spin рекомендуются в случае, если время и простота использования являются преобладающими факторами над ценой. Этот метод очень простой и быстрый.

Автоматическая детекция последовательности.

(Время, требуемое для завершения автоматической детекции последовательности 12 проб составляет 14-15 часов; ручное время – 1 час.)

Автоматический секвенатор ДНК Applied Biosystems ABI Prism[®] детектирует флуоресценцию от четырех различно окрашенных терминаторов, которые используются для определения А, Ц, Г и Т реакции элонгации/терминации. Каждая краска испускает свет своей длины волны при возбуждении аргонным ионным лазером. Все четыре цвета,

и следовательно, все четыре основания, детектируются и различаются в единственном капилляре.

Очищенные продукты реакций циклического секвенирования набора ViroSeq ресуспендируются в Hi-Di формамиде при использовании Генетического Анализатора 3100. Все пробы термически денатурируются в термоциклере при 95°C 2 мин, затем охлаждаются на льду. Пробы затем электрокинетически перемещаются в 3100 капилляров. Каждый прогон в 16 капиллярах занимает 2.5 часа.

Секвенирование включает в себя образование электрического тока ионов от минуса к плюсу через POP-6 полимерную среду. Отрицательно заряженная ДНК, образующаяся в цикле секвенирования, мигрирует сквозь это поле, причем фрагменты меньшие по размеру мигрируют быстрее, чем большие. Поскольку каждый фрагмент проходит область показаний лазера, он поглощает в области длины волны возбуждения флуоресценции аргонного ионного лазера. Флуоресценция детектируется CCD камерой и конвертируется в сигнал основания последовательности с помощью программного обеспечения анализа секвенирования ДНК ABI Prism®. Результирующие файлы содержат информацию о последовательности по каждому из семи праймеров в каждой пробе. После завершения прогона секвенирования, данные из этих файлов автоматически анализируются с использованием программного обеспечения анализа секвенирования в системе генотипирования ViroSeq HIV-1.

Анализ с помощью программного обеспечения ViroSeq

(Время, требуемое для завершения анализа с помощью программного обеспечения ViroSeq 12 проб составляет 1.0-2.0 часа; ручное время – 5-15 мин.)

Программное обеспечение системы генотипирования ViroSeq HIV-1 берет данные о последовательности, полученные с семи праймеров, для каждой пробы и комбинирует информацию в единый проект. Во время сборки последовательностей с праймеров, создается консенсус последовательность, которая простирается на весь ген протеазы и до 335 кодона гена ОТ. Эта консенсус последовательность сравнивается с референс последовательностью известного штамма, HXB-2, для идентификации мест вариаций. Пользователь вручную подтверждает или модифицирует вариантные места для гарантии правильных сигналов оснований. В зависимости от качества данных секвенирования ручное редактирование одного проекта проб занимает 5-15 мин.

Программное обеспечение генотипирования ViroSeq предлагает пользователю три опции для отчета о результатах по проекту:

- Простая текстовая последовательность FASTA, содержащая только консенсус последовательность.
- Простой текстовый отчет мутаций, содержащий список найденных мутаций и категоризованных как известные (соответствующих признанным мутациям устойчивости), неизвестные или мутации вставки.
- Отчет по лекарственной устойчивости к вирусным препаратам, показывающий, являются ли обнаруженные мутации генетическим свидетельством устойчивости вируса. Эта интерпретация основывается на патентованном алгоритме, который определяет относительное развитие устойчивости к антивирусным лекарственным препаратам.

Предупредительные знаки об осторожности

Знаки (слова) предназначенные для внимания пользователя в документации

В тексте появляется пять предупреждающих знаков. Каждое слово подразумевает определенный уровень наблюдения или действия как описано ниже.

Замечание: Привлекает внимание к полезной информации.

ВНИМАНИЕ! Указывает на информацию, которая необходима для правильной работы инструмента, аккуратного использования химического набора или безопасного использования химического реактива.

 **CAUTION** Указывает на потенциально опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, может привести к небольшому или среднему повреждению. Он может быть также использован для предупреждения о небезопасной деятельности.

 **WARNING** Указывает на потенциально опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, могла бы привести к смерти или серьезному повреждению.

 **DANGER** Указывает на неминуемо опасную ситуацию, которая, если ее не избежать, приведет к смерти или серьезному повреждению. Это сигнальное слово должно быть ограничено самыми крайними ситуациями.

РЕАГЕНТЫ

Модуль приготовления проб ViroSeq HIV-1		48 анализов
Буфер Лизиса Вируса (БЛВ) ВИЧ, пробирка 43% гуанидина тиоцианата <2% дитиотрейтола <0.1% гликогена <1% N-лауроилсаркозина <1% цитрата натрия	Бесцветная крышка	2 x 14.4 мл
 43% w/v гуанидина тиоцианата Harmful	 CAUTION Контакт с кислотой или отбеливателем освобождает токсический газ	
 CAUTION ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ. Буфер Лизиса Вируса, содержащий гуанидин тиоцианат, вызывает ожог глаз и может вызвать раздражение кожи и респираторного тракта. Он вреден при вдыхании через кожу или проглатывании. Его воздействие может вызвать депрессию центральной нервной системы и повреждение почек. Контакт с кислотами или отбеливателями высвобождает токсический газ. НЕ ДОБАВЛЯЙТЕ кислоты или отбеливатель к любым жидким отбросам, содержащим Буфер Лизиса Вируса. Пожалуйста, читайте MSDS, и следуйте инструкциям по обращению. Носите соответствующие защитные очки, одежду и перчатки.		
Растворитель РНК, пробирка Поли рА РНК (синтетическая) <0.1% ЭДТА <0.1% Транс-НСI буфера 0.05% азида натрия	Прозрачная крышка	3 x 1.6 мл

Модуль ОТ-ПЦР ViroSeq HIV-1		48 анализов
Смесь ОТ ВИЧ, пробирка Трис-HCl буфер <0.1% хлорид магния <0.1% дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ <0.1% неинфекционных синтетических олигонуклеотидных ВИЧ-1 праймеров 0.05% азида натрия	Голубая крышка	384 мкл
Ингибитор РНКазы, пробирка 20 ед/мкл ингибитора РНКазы 50% глицерол	Белая крышка	1 x 48 мл
MuLV Обратная Транскриптаза, пробирка 50 U/мкл рекомбинантная Обратная Транскриптаза Вируса Лейкемии Мышей 50% глицерол	Фиолетовая крышка	1 x 48 мл
Смесь ПЦР ВИЧ, пробирка Трис-KCl буфер <0.1% хлорид магния <0.1% дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дУТФ <0.1% неинфекционных синтетических олигонуклеотидных ВИЧ-1 праймеров 0.05% азида натрия	Голубая крышка	1 x 1.42 мл
AmpliTaq Gold® ДНК полимеразы, пробирка 5 U/мкл AmpliTaq Gold® ДНК полимеразы 50% глицерол	Золотая крышка	1 x 24 мкл
AmpErase® UNG, пробирка 1 U/мкл урацил N-гликозилазы 5% глицерол	Зеленая крышка	1 x 48 мкл
DTT (100 mM), пробирка 100 mM 1.4% дитиотрейтол  Harmful	Желтая крышка	1 x 20 мкл
 CAUTION ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ. Дитиотрейтол (ДТТ), 100 mM может вызвать раздражение глаз, кожи, респираторного тракта, депрессию центральной нервной системы и повреждение почек. Пожалуйста, читайте MSDS и следуйте инструкциям по обращению. Носите соответствующие защитные очки, одежду и перчатки.		
Маркеры количества ДНК, пробирка Трис-ЭДТА буфер <0.1% маркера количества ДНК 0.2% лаурил сульфата натрия 17% сахарозы <0.1% бромфенолового синего	Прозрачная крышка	1 x 36 мкл
Буфер для напесения проб на агарозный гель, пробирка <0.1% бромфенолового синего 40% сахарозы <3.7% ЭДТА 0.5% лаурил сульфата натрия	Прозрачная крышка	1 x 240 мкл

Растворитель РНК, пробирка Поли рА РНК (синтетическая) Трис-НСl буфер 0.05% азид натрия	Прозрачная крышка	1 x 1.6 мл
---	----------------------	------------

Модуль секвенирования ViroSeq HIV-1		48 анализов
Буфер для нанесения, пробирка (только для прибора 377) <0.9% ЭДТА 5% голубой декстран	Прозрачная крышка	1 x 336 мкл
Формамид, рекристаллизованный, пробирка (только для прибора 337) >95% рекристаллизованного формамида  Irritant	Прозрачная крышка	1 x 1.68 мл

 **CAUTION** **ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ** Формамид вызывает раздражение глаз, кожи и респираторного тракта. Возможен вред для репродуктивной системы и патология плода. Пожалуйста, читайте MSDS и следуйте инструкциям по обращению. Носите соответствующие защитные очки, одежду и перчатки.

Смесь А ВИЧ SEQ, пробирка Готовая реакционная смесь BigDye® терминатор <0.1% неинфекционных синтетических олигонуклеотидных ВИЧ-1 праймеров и нуклеотидов <0.1% AmpliTaq® ДНК полимеразы, FS <0,1% хлорида магния	Белая крышка	1 x 567мкл
Смесь В ВИЧ SEQ, пробирка Готовая реакционная смесь BigDye® терминатор <0.1% псинфекционных синтетических олигонуклеотидных ВИЧ-1 праймеров и нуклеотидов <0.1% AmpliTaq® ДНК полимеразы, FS <0,1% хлорида магния	Белая крышка	1 x 567мкл
Смесь С ВИЧ SEQ, пробирка Готовая реакционная смесь BigDye® терминатор <0.1% неинфекционных синтетических олигонуклеотидных ВИЧ-1 праймеров и нуклеотидов <0.1% AmpliTaq® ДНК полимеразы, FS <0,1% хлорида магния	Белая крышка	1 x 567мкл
Смесь D ВИЧ SEQ, пробирка Готовая реакционная смесь BigDye® терминатор <0.1% неинфекционных синтетических олигонуклеотидных ВИЧ-1 праймеров и нуклеотидов <0.1% AmpliTaq® ДНК полимеразы, FS <0,1% хлорида магния	Белая крышка	1 x 567мкл
Смесь F ВИЧ SEQ, пробирка Готовая реакционная смесь BigDye® терминатор	Красная крышка	1 x 567мкл

<0.1% неинфекционных синтетических олигонуклеотидных ВИЧ-1 праймеров и нуклеотидов <0.1% AmpliTaq® ДНК полимеразы, FS <0,1% хлорида магния		
Смесь G ВИЧ SEQ, пробирка Готовая реакционная смесь BigDye® терминатор <0.1% неинфекционных синтетических олигонуклеотидных ВИЧ-1 праймеров и нуклеотидов <0.1% AmpliTaq® ДНК полимеразы, FS <0,1% хлорида магния	Красная крышка	1 x 567мкл
Смесь H ВИЧ SEQ, пробирка Готовая реакционная смесь BigDye® терминатор <0.1% неинфекционных синтетических олигонуклеотидных ВИЧ-1 праймеров и нуклеотидов <0.1% AmpliTaq® ДНК полимеразы, FS <0,1% хлорида магния	Красная крышка	1 x 567мкл

Контрольный модуль 8E5 ViroSeq HIV-1  CAUTION ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ Материал из человеческого источника. Смотрите вкладыш. Используйте универсальные меры предосторожности.		48 анализов
Положительный контроль 8E5 ВИЧ-1, пробирка Положительный контроль был приготовлен путем разведения культивируемого ВИЧ-1 вируса типа Б (8E5) в ВИЧ РНК-отрицательной плазме крови человека, нереактивной в FDA-лицензированных тестах на антитела к ВИЧ-1/2, HCV, HTLV-1 и HBs антигену. Вирус 8E5 содержит интактный, но дефектный вирусный геном, который содержит вставку в одно основание в кодоне 219 гена ОТ ([24]). Вирусная нагрузка – от 50,000 до 100,000 копий/мл.	Красная крышка	5 x 500 мкл
Отрицательный контроль 8E5 ВИЧ-1, пробирка Отрицательный контроль содержит нормальную плазму крови человека, негативную по ВИЧ РНК, нереактивную в FDA-лицензированных тестах на антитела к ВИЧ-1/2, HCV, HTLV-1 и HBs антигену.	Прозрачная крышка	5 x 950 мкл

Предостережения и меры предосторожности

1.	Только для использования для диагностики <i>in vitro</i> .
2.	Этот тест применяется только для использования с плазмой крови человека, собранной на антикоагулянте ЭДТА. НЕ используйте плазму, собранную на гепарине в данной процедуре, т.к. показано, что он ингибирует ПЦР.

3.	Не пипетируйте при помощи рта.
4.	Не ешьте, не пейте, не курите в рабочей области лаборатории. Носите соответствующие защитные приспособления при работе с образцами реагентами набора (н-р, защитные очки, перчатки и защитную одежду). Тщательно мойте руки после работы с образцами и реагентами набора.
5.	Избегайте микробной и рибонуклеазной контаминации реагентов при отборе аликвот из бутылочек с реагентами. Мы рекомендуем использование стерильных заменяемых пипеток и наконечников.
6.	Не объединяйте (не пулируйте) реагенты из различных партий или различных бутылок той же партии.
7.	Не используйте набор после истечения срока годности.
8.	Читайте и понимайте спецификации по безопасности материалов (MSDS) для набора Viro-Seq HIV-1 и других химических реактивов перед тем как обращаться и работать с любым химическим и опасным материалом. MSDS предоставляются по запросу в Эбботт Диагностикс по тел.+1 877-4Abbott(+1 877 422-2688). Для химических реактивов не производимых и не распространяемых Эбботт Диагностикс, Селера или Эпилайед Биосистемз, обращайтесь к производителю химического реактива за MSDS и указаниями по хранению, безопасному обращению или удалению.
9.	Из-за присутствия гуанидина тиоцианата в Буфере Лизиса Вируса, не добавляйте кислоты или отбеливающие вещества в реагент или к жидким отбросам. Может появиться токсический газ.
10.	Минимизируйте контакт с химическими реактивами. Носите соответствующие защитные приспособления при обращении с реактивами (н-р, защитные очки, перчатки и защитную одежду). За дополнительными указаниями по обращению справляйтесь в MSDS.
11.	Минимизируйте вдыхание реактивов. Не оставляйте контейнеры с химическими реактивами открытыми. Пользуйтесь ими только при адекватной вентиляции. За дополнительными указаниями по обращению справляйтесь в MSDS.
12.	Регулярно проверяйте реактивы на утечку или разливание/рассыпание. Если утечка или разливание/рассыпание произошло, следуйте процедуре очистки, рекомендуемой производителем, как указано в MSDS.
13.	Выполняйте все местные, районные, областные и национальные законы и правила о хранении реактивов, обращения с ними и по удалению их.
14.	Минимизируйте вдыхание и контакт с химическими отбросами. Носите соответствующие личные защитные средства при обращении с химическими отбросами (н-р, защитные очки, перчатки или защитную одежду). Обращайтесь с химическими отбросами в вытяжном шкафу.
15.	Размещайте неиспользованные реагенты и отбросы согласно с GLP (good laboratory practice, хорошей лабораторной практикой) и местными, районными, областными или национальными законами здравоохранения и охраны окружающей среды.
16.	 WARNING ОПАСНОСТЬ ОБРАЩЕНИЯ С ЛАЗЕРОМ. Экспозиция под прямыми или отраженными лучами лазера при 40 мВ в течении 0.1 сек может сжечь сетчатку и оставить постоянные слепые пятна. Никогда не смотрите прямо в лазерную щель и не позволяйте отражению от щели попадать в ваши глаза. Следуйте рекомендациям изготовителя по соответствующей защитной одежде и защитным приспособлениям для глаз.
17.	Следуйте однонаправленному технологическому процессу в лаборатории, начиная в преамплификационной области и двигаясь в

	постамплификационную область. В преамплификационной области начинайте с приготовления проб и переходите к ОТ-ПЦР. Предназначайте принадлежности и оборудование каждому отдельному виду деятельности и не используйте их для другой деятельности и не перемещайте их между областями. Носите перчатки в каждой области и снимайте их перед тем как покинуть данную область. Ограничьте распространение постамплификационного оборудования и принадлежностей только постамплификационной областью в течение всего времени.
18.	Обращайтесь со всеми образцами так, как будто они являются инфекционными. Используйте безопасные лабораторные процедуры, такие как изложенные в <i>Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories</i> ([20]) и в документе M29-T NCCLS ([21]). Тщательно мойте и дезинфицируйте все рабочие поверхности свежеприготовленным раствором 0.5% раствора гипохлорита натрия в деионизированной воде. НЕ используйте отбеливатель (0.5% гипохлорит натрия) для посуды или поверхностей, которые соприкасались с Буфером Лизиса Вируса. Замечание: коммерческий жидкий домашний отбеливатель обычно содержит гипохлорит натрия в концентрации 5.25%. Разведение 1:10 домашнего отбеливателя дает раствор 0.5% гипохлорита натрия.
19.	 WARNING БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ. Биологические пробы, такие как ткани и кровь имеют потенциал передавать инфекционные болезни. Следуйте указаниям Министерство Здравоохранения, Просвещения и Социального Обеспечения, опубликованных в <i>Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories</i> ([20]) и в Технике Безопасности и Стандартах Здоровья, Токсические и Опасные Вещества ([22]) относительно принципов оценки риска и безопасной лабораторной практики для деятельности с клиническими образцами. Вы можете получить дополнительную информацию на правительственном интернет-сайте: http://www.cdc.gov
20.	 WARNING ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ. Этанол является горючей жидкостью, а также горючи его испарения. Экспозиция может вызвать раздражение глаз, кожи и верхних дыхательных путей. Пролонгированный или повторный контакт может высушит кожу. Воздействие может вызвать подавление центральной нервной системы и повреждение печени. Держите вдали от нагревательных приборов, искр и пламени. Читайте MSDS и следуйте инструкциям по обращению. Носите соответствующие защитные очки, одежду и перчатки.
21.	 WARNING ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ. Изопропанол является горючей жидкостью, а также горючи его испарения. Экспозиция может вызвать раздражение глаз, кожи и верхних дыхательных путей. Пролонгированный или повторный контакт может высушит кожу и вызвать раздражение. Воздействие может вызвать такое действие на центральную нервную систему как дремота, головокружение и головная боль. Читайте MSDS и следуйте инструкциям по обращению. Носите соответствующие защитные очки, одежду и перчатки.
22.	 WARNING ХИМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ. Этидиум бромид вызывает раздражение глаз, кожи, респираторного тракта и известен как мутаген (т.е. он может менять генетический материал в живой клетке и имеет способность вызывать рак). Читайте MSDS и следуйте инструкциям по обращению. Носите соответствующие защитные очки, одежду и перчатки.

23.	Для образцов и контрольных проб должны использоваться пробирки с завинчивающимися крышками, чтобы предотвратить распыливание и возможную перекрестную контаминацию образцов. Не используйте захлопывающиеся крышки.
24.	Растворитель РНК, смесь ОТ ВИЧ и смесь ПЦР ВИЧ содержат азид натрия. Азид натрия может реагировать со свинцовыми и медными водопроводными трубами с образованием чрезвычайно взрывоопасных азидов металлов. Если удаление растворов, содержащих азид натрия происходит через лабораторные раковины, промойте сильной струей воды и большим ее объемом для предотвращения образования азидов.

Требования по хранению и обращению

Модуль	Условия хранения	Комментарии
Модуль приготовления проб ViroSeq™HIV-1 Модуль ОТ-ПЦР ViroSeq™HIV-1	Храните при • -15/-25°C • В холодильнике, размораживаемом ручным способом, свободном от ампликонов	После открывания, следующие компоненты должны быть перенесены и храниться в области амплифицированной ДНК при 2-8°C: • Маркеры количества ДНК • Буфер для нанесения проб на агарозный гель Замечание: все другие компоненты должны храниться при -15/-25°C в области, свободной от ампликонов.
Модуль контроля 8E5 ViroSeq™HIV-1	Храните при • -15/-25°C • В холодильнике, размораживаемом ручным способом, свободном от ампликонов	• По пять виалов с положительным от отрицательным контролем плазмы. • Оттаивайте по одному виалу положительного и отрицательного контроля. • Используйте в каждой постановке проб. • Не перезамораживайте.
Модуль секвенирования ViroSeq HIV-1	Храните при • -15/-25°C • В холодильнике, размораживаемом ручным способом, предназначенном только для амплифицированной ДНК	Эти материалы являются светочувствительными. Избегайте пролонгированной экспозиции на свету.

Образцы

А. Сбор образцов

Система генотипирования ViroSeq HIV-1 предназначена для использования с пробами плазмы только. Соберите 5 мл цельной крови в стерильную пробирку с ЭДТА антикоагулянтом (пробирки Vacutainer™PPT™ Brand, Becton-Dickinson #362788 или эквивалентные) и немедленно переверните пробирку 8-10 раз, чтобы перемешать.

ВНИМАНИЕ!

- Этот анализ был валидирован только для использования с пробами плазмы крови, собранных на ЭДТА
- Образцы, собранные на гепарине, не годятся для этого анализа.
- Как было показано следующие компоненты, содержащиеся в образцах плазмы, не влияют на результаты анализа:
 - липиды до 30 мг/мл
 - билирубин до 0.6 мг/мл
 - гемоглобин до 5 мг/мл

Мы рекомендуем отделять плазму от цельной крови в течение 30 мин после забора крови, но не позднее 120 минут после взятия при использовании PPT пробирок или их эквивалентов.

- Центрифугируйте пробирки при 1000-2000 x g при комнатной температуре (15-25°C) в течение 15 минут.
- Как можно скорее перенесите плазму из пробирок PPT (или эквивалентных) в стерильные, 1.5 мл полипропиленовые пробирки и храните их при -65/-80°C до использования.

Б. Транспортировка образцов

Транспортировка продуктов цельной крови человека, включая плазму, должна соответствовать государственным, областным и местным правилам по транспортировке этиологических агентов ([23]). Мы рекомендуем отделять плазму от цельной крови в пределах 30 мин, но не позднее чем через 120 мин.

Вы можете перевозить пробирки с плазмой при 2-8°C при доставке в пределах 24 часов, или перевозить пробирки с плазмой при -70°C или ниже на сухом льду.

В. Хранение образцов

Храните образцы плазмы при -65/-80°C. Не храните более 6 месяцев. Не замораживайте/размораживайте плазму более двух раз.

Процедура

ВНИМАНИЕ! Вы должны быть соответствующим образом обучены работать с данным анализом перед тем как приступить к работе. Ежегодная ресертификация требуется для того, чтобы быть квалифицированным для выполнения этого теста.

Материалы, поставляемые Селерой

Продукт	Каталожный № продукта в Селера	Для заказа № в списке Эбботт
Блоки расходных материалов		
ViroSeq HIV-1 Genotyping System v.2.0, упаковка 1 включая: • Модуль приготовления проб ViroSeq HIV-1 • Модуль ОТ-ПЦР ViroSeq HIV-1 • Модуль секвенирования ViroSeq HIV-1 • Контрольный модуль 8E5 ViroSeq HIV-1	4341573A	04J94-08
ViroSeq HIV-1 Genotyping System v.2.0, упаковка 2 включая: • Микроконцентраторы Microcon® • Оптические 96-луночные реакционные платы с крышками MicroAmp® • Пробирки с крышками MicroAmp®	4341573B	04J94-07
Кодированная панель для ежегодной ресертификации	Как обусловлено Селерой	-
Программное обеспечение		
Программное обеспечение v.2.5 и Руководство для оператора ViroSeq HIV-1	5000010	04J94-06
Программное обеспечение v.2.5 ViroSeq HIV-1	5000050 ВНИМАНИЕ! Никакого программного обеспечения не должно загружаться из интернета для этого использования	04J94-13

Материалы поставляемые, но продаваемые отдельно

Предмет	Шифр компонента (PN) в Applied Biosystems
ABI Prism® 3100 генетический анализатор с: • программным обеспечением по сбору данных верс.1.0.1 • PC компьютер с: - Microsoft® Windows® NT® v.4/0 - Процессором 550 MHz Intel® Pentium® III - 256 MB RAM - дисководом жесткого диска 18 GB	Applied Biosystems PN 3100-01 ВНИМАНИЕ! Никакого программного обеспечения не должно загружаться из интернета для этого использования
Программное обеспечение анализа секвенирования ABI Prism® версия 3.7 для компьютера Windows NT®	Applied Biosystems PN 4317380 Для получения дополнительных разрешений

	используйте PN 4310990 и укажите v.3.7 ВНИМАНИЕ! Никакого программного обеспечения не должно загружаться из интернета для этого использования
Термоциклер GeneAmp® ПЦР система 9600 или 9700	N801-0001 или N805-0001

Дополнительные материалы

Дополнительные материалы, имеющиеся в распоряжении от Applied Biosystems

Предмет	Шифр компонента (PN) в Applied Biosystems
Блоки расходных материалов	
Комплект капилляров 3100, 50 см	4315930
Основание для 96-луночной плашки	4317237
Стопорная планка для 96-луночной плашки	4317241
Перегородка для 96-луночной плашки	4315933
Основания и штативы/стопорные планки MicroAmp	Для полного списка см. PN 4341640 <i>Руководство к инструменту ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System</i>
Перегородка резервуара	4315932
Взаимозаменяемые детали	
Стеклянный шприц с полимерным защитным слоем на 0.5 мл	628-3731
Стеклянный шприц для наполнения ряда на 250 мкл	4304470
Уплотнительные кольца	221102
<i>Предмет</i>	<i>Шифр компонента (PN) в Applied Biosystems</i>
Химические реактивы/реагенты	
Полимер 3100 POP-6™	4316357
Стандарт секвенирования ABI Prism® BigDye® терминатор	4304154
Буфер генетического анализатора с ЭДТА (10X)	402824
Формамид Hi-Di™, бутылка 25 мл	4311320

Материалы требующиеся, но не поставляемые

Пользователь должен обеспечить следующее оборудование, материалы и реагенты.

Область 1: приготовление проб	
Оборудование и материалы	Поставщики
Ламинарный бокс (с защитой образцов и оператора)	Основной Лабораторный Поставщик (ОЛП)

Центрифуга с охлаждением (21000-25000 x g) с герметически закрывающимся ротором	ОЛП
Смеситель вортекс, платформная головка (2500 об/мин)	ОЛП
Пипетман 200-1000 мкл	ОЛП
Пипетман 20-200 мкл	ОЛП
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 1000 мкл	ОЛП
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 200 мкл	ОЛП
Пипетки без градуировки с тонким наконечником	ОЛП
Пробирки с завинчивающимися крышками на 1.5 мл (стерильные, свободные от РНКазы/ДНКазы) Должны выдерживать 21000-25000 x g	ОЛП
Перчатки без порошка	ОЛП
Лабораторная одежда/халаты	ОЛП
Реагенты	Поставщики
Отбеливатель (для уборки – сделайте 10% раствор перед использованием)	ОЛП
Этанол 70% (для очистки поверхностей)	ОЛП
Этанол 100%, не денатурированный (уровень качества – для молекулярной биологии)	ОЛП
Изопропанол 100%, ангидратный (качество ACS)	ОЛП
Вода стерильная, деионизированная, свободная от РНКазы/ДНКазы	ОЛП
Область 2: ОТ/ПЦР	
Оборудование и материалы	Поставщики
Стерильный ламинарный бокс (с защитой образцов и оператора)	ОЛП
Центрифуга типа эппендорф	ОЛП
Центрифуга с ротором для микротитражных планштов (необязательно)	ОЛП
Смеситель вортекс, платформная головка (2500 об/мин)	ОЛП
Пипетман 200-1000 мкл	ОЛП
Пипетман 20-200 мкл	ОЛП
Пипетман 10-100 мкл	ОЛП
Пипетман 0-20 мкл	ОЛП
Пипетман 0-10 мкл	ОЛП
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 1000 мкл	ОЛП
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 200 мкл	ОЛП
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 100 мкл	ОЛП

Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 20 мкл	ОЛП
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 10 мкл	ОЛП
Перчатки без порошка	ОЛП
Лабораторная одежда/халаты	ОЛП
Реагенты	<i>Поставщики</i>
Отбеливатель (для уборки – сделайте 10% раствор перед использованием)	ОЛП
Этанол 70% (для очистки поверхностей)	ОЛП
Область 3: амплифицированная ДНК	
Общие материалы и реагенты	<i>Поставщики</i>
Пипетман 20-200 мкл	ОЛП
Пипетман 10-100 мкл	ОЛП
Пипетман 0-20 мкл	ОЛП
Пипетман 0-10 мкл	ОЛП
Лента алюминиевой фольги с адгезивной стороной (опции 1 и 2 ниже)	VWR BK538619
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 200 мкл	ОЛП
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 100 мкл	ОЛП
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 20 мкл	ОЛП
Носики к автоматической пипетке (пипетману), устойчивые к аэрозолям, свободные от РНКазы на 10 мкл	ОЛП
Агарозный гель, содержащий этидиум бромид	ОЛП
Отбеливатель (для уборки – сделайте 10% раствор перед использованием)	ОЛП
Этанол 70% (для очистки поверхностей)	ОЛП
Этидиум бромид	ОЛП
Буфер TBE, 10x	ОЛП
Вода стерильная, деионизированная, свободная от РНКазы/ДНКазы	ОЛП
Очистка последовательностей	<i>Поставщики</i>
Опция 1: изопропанол 100%, ангидратный (качество ACS)	ОЛП
Опция 2: этанол 100%, не денатурированный (уровень качества – для молекулярной биологии)	ОЛП
Опция 2: 3М ацетат натрия, pH 4.6	ОЛП
Опция 3: CENTRI•SEP 96-луночные планшеты	Princeton Separations CS-961 (или альтернативный протокол в разделе Г4 этого документа)
Оборудование	<i>Поставщики</i>
Центрифуга типа эппендорф (до 15000 x g)	ОЛП

Центрифуга с ротором для планшет для микротитрования (до 2000 x g)	ОЛП
Центрифуга с вакуумным насосом (при использовании CENTRI•SEP 96-луночных планшет). Должна иметь: • Мощность для создания вакуума • Ротор с поворотными держателями для планшет	ОЛП
Бокс с Ультрафиолетовым светом (300 нм УФ лампа)	ОЛП
Прибор для электрофореза в агарозном геле (с источником питания, создающем напряжение 10 вольт/см агарозного геля)	ОЛП

Действия, необходимые перед использованием системы генотипирования ViroSeq HIV-1.

Перед началом использования все операторы должны пройти подготовку с последующей дачей разрешения в Селера (или у уполномоченного назначенного инструктора), чтобы квалифицированно выполнять анализ генотипирования на приборе.

Как только удостоверение (сертификат) получено, необходимы ежегодные ресертификации для поддержания квалифицированного выполнения данного анализа. Требования к ежегодной ресертификации следующие:

- Выполнить анализ на специальной кодированной панели проб плазмы крови, полученных от инфицированных людей, как определено компанией Селера.
- Предоставить образы агарозных гелей всех проб и компилированных последовательностей каждой положительной пробы в компанию Селера (или заранее назначенному инструктору) для оценки качества и точности результатов.
- Получить и хранить документацию сертификации от компании Селера (или от уполномоченного назначенного инструктора).

Организация рабочего пространства

Обратите особое внимание на планировку и организацию лаборатории. Область, где работают с амплифицированной ДНК, должна быть физически изолирована от рабочего пространства для приготовления проб и ОТ-ПЦР (Обратной Транскрипции – Полимеразной Цепной Реакции).

Различные части процедуры генотипирования с использованием системы генотипирования ViroSeq HIV-1 должны быть выполнены в разных рабочих пространствах. Каждое рабочее пространство должно иметь специально предназначенные пипетки, оборудование и обеспечение для регулярного успешного выполнения анализа. Существует три рекомендуемых рабочих пространства:

- Область 1: Приготовление проб (преамплификация). Это рабочее пространство используется для выполнения **Приготовления Проб** и работы с инфицированными ВИЧ-1 пробами.
- Область 2: ОТ-ПЦР (преамплификация). Это рабочее пространство используется для выполнения стадий **Обратной Транскрипции** и **ПЦР**.
- Область 3: Амплифицированная ДНК (постамплификация). Это рабочее пространство предназначено для **ПЦР** амплификации, **Циклического**

Секвенирования и Автоматической Детекции Последовательности и других видов деятельности, которые требуют обращения с амплифицированной ДНК.

В идеальном случае, Области 1 и 2 должны быть отделены друг от друга для предотвращения потенциального переноса экзогенной РНК или ДНК в рабочее пространство ОТ-ПЦР. Однако, если Области 1 и 2 локализованы в одной и той же комнате, они должны быть ясно очерчены. Настольные боксы (шкафы биологической защиты) могут служить для изоляции областей в этой комнате.

Пипетки и другое оборудование, используемое в Области 1 рутинно подвергаются контакту с патогенами человеческой крови и не должны быть использованы в Области 2, или любом другом месте вне Области 1.

При возможности, используйте специально предназначенное место, такое как биологический бокс с источником УФ изучения для подготовки реагентов для стадий ОТ и ПЦР. УФ бактерицидные лампы в большинстве боксов повреждают ДНК, оставленную на открытых поверхностях, делая ее непригодной для последующей амплификации.

ВНИМАНИЕ! Не используйте гамма излучение на пробирках MicroAmp PCR. Это может ингибировать ПЦР впоследствии выполняемой в этих пробирках.

Поддерживайте строгую физическую изоляцию между рабочим пространством амплифицированной ДНК (Область 3) и другими двумя областями во избежание переноса амплифицированной ДНК из Области 3.

Из-за типа оборудования, используемого в рабочем пространстве амплифицированной ДНК (Область 3), требуется относительно большое место. Это требование пространства обычно превышает требование пространства для Областей 1 и 2.

Хорошая практика ПЦР требует от вас:

- Использовать ленту с цветным кодированием для каждой области, чтобы идентифицировать реагенты и оборудование.
- Обращайтесь с реагентами, оборудованием и наборами в перчатках без порошка все время для предотвращения контаминации РНК-ой с открытой кожи.
- Ограничьте число процессируемых одновременно проб до осуществимого числа. Эта предосторожность снижает риск перепутать пробы и вероятность контаминации проб.
- Используйте стерильные, заменяемые, гидрофобные наконечники пипеток с фильтром и микроцентрифужные пробирки.
- Всегда снимайте наконечник пипетки перед работой с другой пробой.
- Имейте только одну пробирку или пробу открытой во время добавления реагентов, и закрывайте крышку перед переходом к другой пробе.
- Избегайте движения ваших рук над открытыми пробирками при пипетировании.
- Тщательно протирайте все рабочие поверхности 10% (v/v) отбеливающего раствора перед началом процедуры. Используйте заменяемую бумагу для покрытия рабочего стола (такую как Benchkote) для предотвращения аккумуляции ДНК или инфекционного материала.
- Носите специально предназначенную одежду для каждой области.
- Часто меняйте перчатки для предотвращения контаминации от пробы к пробе. Меняйте перчатки везде, где они могут быть контаминированы ДНК или где вы покидаете рабочее пространство.

Предотвращение деградации РНК

Для успешного генотипирования является критичным предотвращение деградации РНК в тестируемых пробах.

РНК разрушается РНКазами. Эти ферменты от природы присутствуют в клетках и освобождаются при лизисе клеток. РНКазы могут оставаться в пробах, полученных из клеток, если очистка незавершенная. Также из-за того, что РНКазы секретируются вашей кожей, РНКазы могут быть введены в пробы путем контакта с поверхностями, к которым вы прикасались.

РНКазы очень стабильны и не нуждаются в каких-либо кофакторах, поэтому они сохраняются на поверхностях и остаются функциональными в широком диапазоне окружающих условий. Они имеют высокую активность, поэтому даже маленькое количество РНКазы может вызвать значительную потерю в пробе РНК.

Источники контаминации РНКазой включают:

- Обычную лабораторную стеклянную и пластиковую посуду
- Кожу и волосы
- Контаминированные растворы

Также из-за того, что РНКазы могут попасть с вашей кожи, вам следует носить перчатки все время во время обращения с образцами, реагентами, оборудованием и разовыми материалами.

Технологический процесс

Вы можете завершить процедуру за два или более дней. При остановке в заданных моментах, вы должны хранить приготовленные пробы соответственно до момента когда вы готовы продолжить.

Моменты остановки даны ниже и ясно указаны в процедуре.

ВНИМАНИЕ! Храните все пробы, контроли, и реагенты на холоду (2-8°C) до мастермикса (разведений и добавлений реагентов). Как только мастермикс сделан, храните его при комнатной температуре, но держите исходные реагенты на льду.

При завершении...	Храните пробы при...	Не дольше чем...
А. Приготовления проб	От -65 до -80° C	2 недели
Б. Обратной транскрипции	От -15 до -25° C	2 недели
В. ПЦР	От -15 до -25° C	2 недели
Г. Циклического секвенирования	От -15 до -25° C	3 дня
Д. Очистки последовательностей	От -15 до -25° C	1 неделю

Количество проб в одной постановке

Набор системы генотипирования ViroSeq™ HIV-1 содержит достаточно реагентов для постановки 48 тестов. Мы рекомендуем включать в отдельные постановки по 12 проб, что дает возможность сделать 4 постановки на набор. Постановки с меньшим количеством проб увеличивают число циклов заморозки-разморозки и манипуляций с реагентами, и могут привести к сниженным эксплуатационным качествам или контаминации.

ВНИМАНИЕ! Не замораживайте-размораживайте реагенты более чем пять (5) раз.

Контроли

Положительный и отрицательный контроли должны быть включены в каждую постановку. Система генотипирования ViroSeq™ HIV-1 включает неинфекционный модуль контроля вируса ВИЧ-1, состоящий из 5 пробирок (как для положительного, так для отрицательного контролей). Контроли ViroSeq™ HIV-1 могут рассматриваться как часть лабораторной программы контроля качества для поддержания воспроизводимости от лота к лоту, технических вариаций и идентификации систематических ошибок. Для более подробной информации см. раздел «Контроль качества» перед разделом «Результаты» данной инструкции.

Положительный контроль (8E5) является неинфекционным ([24]) вирусом ВИЧ-1 с концентрацией 50 000 – 100 000 копий/мл. Разведение 1:10 положительного контроля (5000 – 10000 копий/мл) может быть использовано в каждой постановке для гарантирования должной работы реагентов. Он сконструирован так, чтобы имитировать пробы пациентов во всех аспектах процедуры тестирования ViroSeq™ HIV-1, начиная с «А. Приготовление проб» и по «Е. Анализ с помощью программного обеспечения ViroSeq™ HIV-1».

Отрицательный контроль является нормальной плазмой крови человека, которая не содержит ВИЧ-1 РНК. Она должна быть использована начиная с «А. Приготовление проб» и по «Г2. Подсчет ДНК» в разделе «Г. Циклическое секвенирование» для гарантирования отсутствия контаминации. Из-за характера процесса автоматического секвенирования ДНК, не рекомендуется прогон отрицательного контроля.

Протокол

А. Приготовление проб

(Время для завершения подготовки 12 проб в целом составляет 2.5-3.0 часа; «ручное» время – 1.5 часа).

ВНИМАНИЕ! Выполняйте эту процедуру в преамплификационной Области 1.

А1. Предварительные действия Чтобы подготовиться к анализу:

1.	Охладите центрифугу с охлаждением и ротор до 2-8°C, согласно инструкциям фирмы-производителя.
2.	Разморозьте пробы плазмы и положительного и отрицательного контролей при комнатной температуре (15-25°C).
3.	Держите открытой только одну пробирку с пробой или реагентом за раз.

А2. Выделение ВИЧ-1 Для того, чтобы выделить вирусную РНК: вирусной РНК

1.	Перемешайте на вортексе пробы плазмы в течение 3-5 сек
2.	Центрифугируйте 1-2 сек при 2000x g, чтобы собрать содержимое на дно пробирки.
3.	Промаркируйте пробы согласно вашему лабораторному протоколу, затем разаликвотьте по 0.5 мл плазмы в чистые, свободные от РНКазы и ДНКазы пробирки с завинчивающимися крышками.
4.	Приготовьте контроль РНК с низкой концентрацией. Смешайте в микроцентрифужной пробирке:

	- 50 мкл 8Е5 положительного контроля - 450 мкл отрицательного контроля (отрицательная плазма) и промаркируйте соответствующе
5.	Сделайте ориентационную отметку на стороне пробирки и крышке.
6.	Вставьте пробы в ротор так, чтобы ориентационная отметка смотрела на внешнюю часть обода ротора. Замечание: Используйте герметически завинчивающийся ротор с кольцевым уплотнителем для предотвращения распыливания и образования аэрозолей.
7.	Центрифугируйте при 21000 – 25000x g в течение 60 мин при 2-8° С.
8.	Пока пробы центрифугируются: • Разморозьте Буфер Лизиса Вируса (БЛВ) при комнатной температуре. Замечание: Если вы видите преципитат, нагрейте БЛВ до 37° С до его растворения, затем охладите его до комнатной температуры. • Разморозьте растворитель РНК и храните его при 2-8° С. • Приготовьте 70% этанол и храните его при 2-8° С для использования на шаге 20.
9.	Вытащите пробы сразу же, как остановится ротор.
10.	Осторожно удалите супернатант из пробирок, используя автоматическую пипетку с тонким наконечником. Не повредите осадок (который может быть невидимым). НАКОНЕЧНИК: При отсасывании начните ниже уровня мениска и двигайте наконечник вниз вдоль стенки, противоположной ориентационной отметке. Удалите столько супернатанта, сколько это возможно без повреждения осадка.
11.	Добавьте 600 мкл БЛВ к каждому осадку.
12.	Перемешайте на вортексе 3-5 сек.
13.	Центрифугируйте 3-5 сек при 2000x g для того, чтобы собрать содержимое на дно пробирки.
14.	Оставьте пробы при комнатной температуре (15-25°С) для того, чтобы быть уверенным в завершении лизиса вируса.
15.	Добавьте 600 мкл изопропанола к каждой пробе.
16.	Перемешайте на вортексе каждую пробирку 3-5 сек.
17.	Вставьте пробы в ротор так, чтобы ориентационная отметка смотрела на внешнюю часть обода ротора.
18.	Центрифугируйте пробы 12500-15000x g при комнатной температуре 15 мин.
19.	Осторожно удалите супернатант автоматической пипеткой с тонким наконечником. Не повредите осадок (который может быть невидимым).
20.	Добавьте 1 мл 70% этанола (приготовленного на шаге 8) в каждую пробирку.
21.	Перемешайте каждую пробирку на вортексе 3-5 сек.

22.	Вставьте пробы в ротор так, чтобы ориентационная отметка смотрела на внешнюю часть обода ротора.	
23.	Центрифугируйте 12500-15000x g при комнатной температуре 5 мин.	
24.	Осторожно удалите супернатант автоматической пипеткой с тонким наконечником. Не повредите осадок (который может быть невидимым). Удалите этанол настолько, насколько это возможно.	
25.	Центрифугируйте 1-2 сек при 2000x g, чтобы собрать остаточную жидкость на дно пробирки.	
26.	Осторожно удалите остаточный этанол другой автоматической пипеткой с тонким наконечником. Высушите на воздухе пробирки, подержав их с открытыми крышками 1-5 мин, или до тех пор, пока не будет видно никакого этанола. ВНИМАНИЕ! Является критичным удаление всего видимого этанола. Остаточный этанол ингибирует реакцию ОТ-НЦР.	
27.	Ресуспенсируйте каждый осадок в холодном (2-8° C) растворителе ДНК согласно следующим указаниям:	
	Если вирусная нагрузка составляет	То добавьте это количество растворителя РНК
	> 15000 копий на мл	100 мкл
	2000-15000 копий на мл	50 мкл
	неизвестно	50 мкл
	Контроли	
	Неразведенный положительный	100 мкл
	Слабоположительный	50 мкл
	Отрицательный	50 мкл
28.	Интенсивно перемешайте на вортексе 10 сек для ресуспендирования осадка. Может остаться немного нерастворимого материала.	
29.	Центрифугируйте 1-2 сек при 2000x g, чтобы собрать содержимое на дно пробирки.	
30.	Когда процедура закончена: • Переходите к Обратной Транскрипции или • Остановитесь и храните пробы в холодильнике при температуре от -65°C до -80°C. ВНИМАНИЕ! Не замораживайте- размораживайте РНК более двух (2) раз. Не храните РНК более двух недель.	

Б. Обратная Транскрипция

ВНИМАНИЕ! Выполняйте эту процедуру в преамплификационной Области 2.

Б1. Предварительные действия Для того, чтобы подготовиться к реакциям ОТ:

1.	Если необходимо, разморозьте пробы РНК. Будьте уверены также, что вы разморозили и положительный и отрицательный контроли РНК.
2.	Перемешайте на вортексе 3-5 сек.
3.	Промаркируйте одну 0.2-мл Micro-Amp пробирку для каждой пробы РНК.
4.	Разморозьте HIV RT Mix и ДТТ. Перемешайте на вортексе 3-5 сек.
5.	Достаньте ингибитор РНКазы и MuLV обратную транскриптазу из набора.
6.	Центрифугируйте все пробирки с реагентами и пробами 1-2 сек при 2000x g чтобы собрать содержимое на дно.
7.	Храните все реагенты и пробы при 2-8° С или на льду до использования.

Б2. Постановка реакций Обратной Транскрипции

Замечание: Используйте только термоциклеры GeneAmp 9600 или 9700.

Замечание: Запрограммируйте термоциклер до начала реакции (см. шаг 5). За детальными инструкциями по программированию обращайтесь к операционному руководству по термоциклеру.

Для того чтобы начать и провести реакции ОТ:

1.	Приготовьте ОТ мастермикс согласно следующей таблице. По окончании, верните сток (стандартные) растворы в холодильник на -5/-25°C.			
	Реагент	Объем для 1 реакции (мкл)	Объем для 5 реакций (мкл)	Объем для 15 реакций (мкл)
	HIV RT Mix	8	40	120
	Ингибитор РНКазы	1	5	15
	MuLV Обратная Транскриптаза	1	5	15
	ДТТ, 100 mM	0.4	2.0	6.0
	Конечный объем	10.4	52.0	156.0
	Замечание: Приготовьте достаточный объем для 1-2 реакций сверх рассчитанных для компенсации потерь при пипетировании.			
2.	Смешайте ОТ мастермикс на вортексе 3-5 сек.			
3.	Центрифугируйте 1-2 сек при 2000x g чтобы собрать содержимое на дно пробирки.			

	ВНИМАНИЕ! Держите ОТ мастермикс при комнатной температуре (15-25° С) до того как вы добавите его в реакционные пробирки, но не оставляйте его при комнатной температуре дольше чем на 30 мин.																					
4.	Добавьте 10 мкл вирусной РНК в 0.2 мл MicroAmp пробирки и возвратите сток вирусной РНК на лед. ВНИМАНИЕ! Используйте чистый наконечник для каждого добавления.																					
5.	Сразу же закройте крышками и поместите MicroAmp пробирки в термоциклер, который установлен на условия, указанные ниже, и запускайте программу. Нагрейте пробы вместе с термоциклером до 65°C. Пока РНК нагревается, держите ОТ мастермикс при комнатной температуре. Замечание: остановите выполнение реакции после 42°C (5 минутный шаг) и немедленно переходите к шагу 6. The graph illustrates a thermal cycling protocol. It begins at 65°C, where it holds for 0:30 (30 seconds). The temperature then decreases to 42°C, where it holds for 5:00 (5 minutes). A vertical line at the 60:00 mark indicates a manual stop point. Following this, the temperature increases to 99°C, where it holds for 5:00 (5 minutes). Finally, the temperature drops to 4°C, where it remains indefinitely (indicated by an infinity symbol ∞).																					
<table><tr><th>Температура (°C)</th><th>Время</th><th>Процесс</th></tr><tr><td>65</td><td>30 секунд</td><td>Релаксация вторичной структуры РНК</td></tr><tr><td>42</td><td>5 минут</td><td>Охлаждение до оптимальной температуры для активности фермента</td></tr><tr><td colspan="3">Ручная остановка и выполнение шага 6, затем нажмите Resume</td></tr><tr><td>42</td><td>60 минут</td><td>Обратная Транскрипция</td></tr><tr><td>99</td><td>5 минут</td><td>Инактивация MuLV Обратной Транскриптазы</td></tr><tr><td>4</td><td>Задержка (>10 минут)</td><td>Задержка до момента когда вы готовы продолжить</td></tr></table>		Температура (°C)	Время	Процесс	65	30 секунд	Релаксация вторичной структуры РНК	42	5 минут	Охлаждение до оптимальной температуры для активности фермента	Ручная остановка и выполнение шага 6, затем нажмите Resume			42	60 минут	Обратная Транскрипция	99	5 минут	Инактивация MuLV Обратной Транскриптазы	4	Задержка (>10 минут)	Задержка до момента когда вы готовы продолжить
Температура (°C)	Время	Процесс																				
65	30 секунд	Релаксация вторичной структуры РНК																				
42	5 минут	Охлаждение до оптимальной температуры для активности фермента																				
Ручная остановка и выполнение шага 6, затем нажмите Resume																						
42	60 минут	Обратная Транскрипция																				
99	5 минут	Инактивация MuLV Обратной Транскриптазы																				
4	Задержка (>10 минут)	Задержка до момента когда вы готовы продолжить																				

	Замечание: Установите объем в термоциклере 20 мкл при затребовании. ВНИМАНИЕ! Остановка GeneAmp® 9600 и 9700 длится только 10 мин. Шаг 6 должен быть выполнен в течение 10 мин.
6.	Пока прибор стоит, сделайте следующее: А. Немедленно удалите пробы РНК из термоциклера. Б. Добавьте 10 мкл ОТ мастермикса комнатной температуры в каждую реакционную пробирку и закройте пробирки. В. Интенсивно перемешайте штатив с пробями 3-5 секунд. Г. Центрифугируйте штатив с пробирками 1-2 секунды при 2000х g чтобы собрать содержимое на дно.
7.	Возвратите пробы в термоциклер и нажмите Resume.
8.	После завершения программы ОТ, держите пробы в термоциклере по меньшей мере 10 мин при 4°C, но не более 18 часов.
9.	Когда программа завершена: • Переходите к ПЦР или • Остановитесь и храните пробы в холодильнике при температуре от -15°C до -25°C до тех пор, пока вы не готовы выполнить ПЦР, но не храните больше двух недель.

В. ПЦР

В1. Предварительные действия

ВНИМАНИЕ! Выполняйте эту процедуру в преамплификационной Области 2.
Для того, чтобы подготовиться к ПЦР:

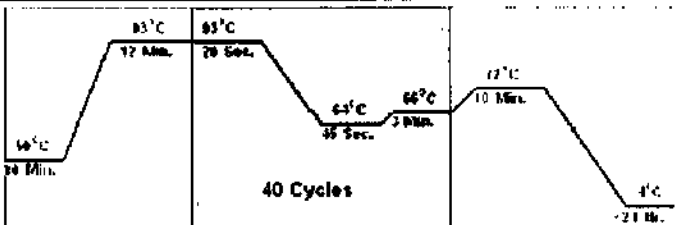
1.	Если пробы заморожены, оттайте их при комнатной температуре (15-25° C).
2.	Центрифугируйте пробы при 2000х g 1-2 сек чтобы собрать содержимое на дно пробирки.
3.	Разморозьте HIV PCR Mix.
4.	Перемешайте на вортексе 3-5 сек.
5.	Достаньте реагенты AmpliTaq Gold и AmpErase UNG из набора. Разморозьте и перемешайте на вортексе 1-2 сек.
6.	Центрифугируйте все реагенты 1-2 сек при 2000х g чтобы собрать содержимое на дно.

В2. Постановка реакции ПЦР

Замечание: Используйте только термоциклеры GeneAmp 9600 или 9700.

Замечание: Запрограммируйте термоциклер до начала реакции (см. шаг 5). За детальными инструкциями по программированию обращайтесь к операционному руководству по термоциклеру.

Для того чтобы поставить ПЦР:

1.	Приготовьте мастермикс ПЦР. Смешайте в стерильной 1.5 мл центрифужной пробирке:			
	Реагент	Объем для 1 реакции (мкл)	Объем для 5 реакций (мкл)	Объем для 15 реакций (мкл)
	HIV PCR Mix	29.5	147.5	442.5
	AmpliTaq Gold polymerase	0.5	2.5	7.5
	AmpErase UNG	1	5	15
	Конечный объем	31	155	465
	Замечание: приготовьте достаточный объем для 1 реакции сверх намеченных, чтобы компенсировать потери при пипетировании.			
2.	Перемешайте ПЦР мастермикс 3-5 сек на вортексе.			
3.	Центрифугируйте 1-2 сек при 2000x g чтобы собрать содержимое на дно пробирки.			
4.	Добавьте 30 мкл ПЦР мастермикса в каждую пробирку с реакцией ОТ, содержащую ВИЧ-1 кДНК. Конечный объем теперь составляет 50 мкл.			
5.	Установите программу термоциклера следующим образом:			
				
	Температура (°C)	Время	Циклы	
	50	10 мин	1	
	93	12 мин	1	
	93	20 сек	40	
	64	45 сек		
	66	3 мин		
	72	10 мин	1	
	4	Задержка	-	

	Замечание: установите объем на термоциклере 50 мкл, если запрашивается
6.	Работайте с пробамми для термоциклера в Области 3. Не возвращайтесь в Область 2 в конце дня.
7.	Перенесите пробирки в термоциклер и запустите программу.
8.	Когда программа завершена: • Переходите к стадии очистки или • Остановитесь и храните пробы в холодильнике при температуре от -15°C до -25°C. ВНИМАНИЕ! Не оставляйте пробирки на холоду более 24 часов. Остаточная активность UNG может разрушить вашу амплифицированную ДНК.

Г. Циклическое секвенирование

Выполняйте эту процедуру в постаmplификационной Области 3.

Г1. Очистка продуктов ПЦР

Для того, чтобы сконцентрировать и очистить продукты ПЦР:

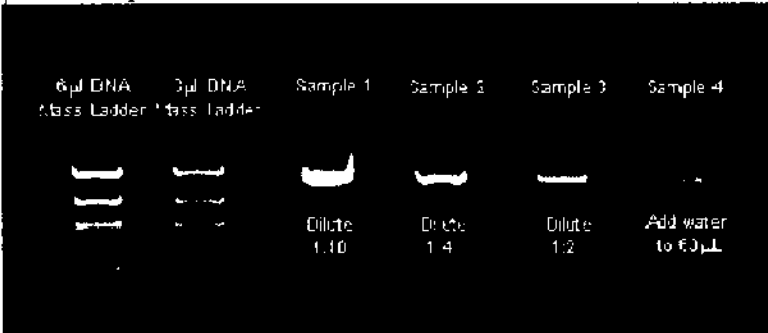
1.	Соберите микроконцентратор. а. Для каждой пробы промаркируйте - одну 1.5 мл пробирку для концентрирования - одну колонку Microcon Spin б. В каждую пробирку вставьте соответствующую промаркированную колонку Microcon Spin белой мембраной кверху.
2.	Осторожно перенесите пипеткой 300 мкл стерильной деионизированной воды в резервуар каждого микроконцентратора. ВНИМАНИЕ! Не трогайте мембрану наконечником пипетки.
3.	Перенесите пипеткой 50 мкл ПЦР-продукта каждой пробы в резервуар, наполненный водой соответствующе помеченного концентратора. ВНИМАНИЕ! Не трогайте мембрану наконечником пипетки.
4.	Плотно закройте каждую пробирку с помощью прикрепленной крышки.
5.	Центрифугируйте приготовленные микроконцентраторы при 450-550x g 15 мин.
6.	Откройте крышки пробирок и осторожно добавьте 35 мкл стерильной, деионизированной воды в центр каждого микроконцентратора. ВНИМАНИЕ! Не трогайте мембрану наконечником пипетки.
7.	Слейте содержимое микроконцентраторов в новые, промаркированные пробирки. а. Вытащите микроконцентраторы из пробирки, содержащей фильтрат. б. Переверните микроконцентратор на верх новой, соответствующим образом промаркированной 1.5 мл

	пробирки для каждой пробы. в. Выбросьте старую пробирку с фильтратом.
8.	Центрифугируйте приготовленные микроконцентраторы при 450-550x g 5 мин.
9.	Вытащите и уберите микроконцентраторы, оставляя пробы в пробирках. Замечание: Каждая пробирка содержит теперь примерно 35-60 мкл очищенного ПЦР продукта.
10.	Плотно закройте каждую пробирку с помощью прикрепленной крышки и : • Переходите к постановке агарозного геле-электрофореза или • Остановитесь и храните пробы в холодильнике при температуре от -15°C до -25°C, но не больше двух недель.

Г2. Количественная оценка ДНК

Для того, чтобы провести агарозный геле-электрофорез:

1.	Разморозьте маркеры количества ДНК при комнатной температуре (15- 25° C). Это займет по меньшей мере 30 мин. Перемешайте на вортексе 10-15 сек перед использованием.		
2.	Разморозьте буфер для нанесения образцов при комнатной температуре. Это займет по меньшей мере 30 мин. Перемешайте на вортексе 10-15 сек перед использованием.		
3.	Приготовьте 1% агарозный гель,используя TBE, содержащий 0.5 мкг/мл этидиум бромид (или используйте купленный 1% агарозный гель).		
4.	Приготовьте 1X TBE буфер, содержащий 0.5 мкг/мл этидиум бромид.		
5.	Поместите приготовленный гель в камеру для геля.		
6.	Добавьте достаточное количество 1X TBE буфера так, чтобы покрыть гель.		
7.	Для каждой пробы смешайте: • 5 мкл буфера для нанесения образцов • 5 мкл очищенного ПЦР продукта		
8.	Нанесите маркеры количества ДНК. А. 6 мкл на дорожку 1 Б. 3 мкл на дорожку 2		
	Это дает следующие результаты:		
	Полосы		Дорожка 6
	Положение	Длина (кб)	мкл (нг)
	Верхняя	2.0	100
	Вторая	1.2	60
	Третья	0.8	40
9.	Нанесите на оставшиеся дорожки по 10 мкл каждой из проб.		

	ВНИМАНИЕ! Будьте уверены в том, что отметили где какая проба нанесена (на какой дорожке).	
10.	Проводите электрофорез при 10 вольт/см до тех пор, пока бромфеноловый синий не пройдет по меньшей мере 5 см геля.	
11.	Рассмотрите гель под УФ светом.	
12.	Сфотографируйте гель, используя время экспозиции, которое не насыщает пленку и дает различия в интенсивности фрагментов маркеров массы ДНК.	
13.	Оцените количество ПЦР продуктов в каждой пробе путем сравнения интенсивности каждой полосы с интенсивностью низкомолекулярных полос маркеров количества ДНК (см. иллюстрацию далее)	
14.	Разведите оставшийся ПЦР продукт для каждой пробы деионизированной дистиллированной водой (длН ₂ O) согласно следующей таблице.	
	Если интенсивность полосы	То
	20-40 нг	Доведите объем пробы до 60 мкл
	40-60 нг	Разведите вашу пробу 1:2 длН ₂ O (1 часть пробы на 1 часть воды)
	60-100 нг	Разведите вашу пробу 1:4 длН ₂ O (1 часть пробы на 3 части воды)
	>100 нг	Разведите вашу пробу 1:10 длН ₂ O (1 часть пробы на 9 частей воды)
Замечание: полоса ОТ-ПЦР продукта должна иметь интенсивность равную или больше чем 20 нг полоса маркера для того, чтобы быть уверенным в высоком качестве последовательности.		
Иллюстрация:		
		
15.	Перемешайте каждую разведенную пробу на вортексе 3-5 сек	
16.	Центрифугируйте 1-2 сек при 2000x g чтобы собрать содержимое на дно пробирки.	
17.	Когда процедура закончена, переходите к Циклическому Секвенированию.	

Замечание: Не делайте реакций секвенирования для отрицательного контроля.

ВНИМАНИЕ! Смеси для секвенирования светочувствительны. Не подвергайте действию света смеси в течение длительных периодов.

Разморозьте смеси для секвенирования ВИЧ-1 при комнатной температуре (15-25° C).

2.	Установите формат реакции. Вы можете использовать одну из следующих опций. • Одну реакционную пробирку MicroAmp для каждой смеси HIV SEQ • 8-стриповые реакционные пробирки MicroAmp в штативе MicroAmp • Оптическую 96-луночную реакционную планшетку MicroAmp (предоставляется в наборе)
----	---

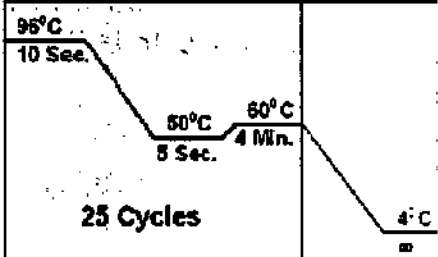
ВНИМАНИЕ! Если вы используете оптическую 96-луночную реакционную планшку MicroAmp, вы должны учитывать расположение проб, а также инструментальную платформу, которую вы используете

[illegible]

Планшет 3100 с нанесенными пробой 1 (S1), начиная в колонке 1 96-луночной планшеты, S2 в колонке 2 и так далее. Ряд Н не используется, если вы не хотите прогнать 13 проб на одной планшете.

3.	В каждой пробирке или лунке соедините следующим образом:
----	--

Компонент	Объем для одной реакции (мкл)
-----------	-------------------------------

	Добавьте одну из следующих смесей HIV-1 SEQ в каждую пробирку или лунку плашки: HIV SEQ Mix A HIV SEQ Mix B HIV SEQ Mix C HIV SEQ Mix D HIV SEQ Mix F HIV SEQ Mix G HIV SEQ Mix H	12													
	Разведенный, очищенный продукт ПЦР	8													
4.	Закройте крышки пробирок или крышку оптической 96-луночной реакционной плашки MicroAmp.														
5.	Центрифугируйте при комнатной температуре 5-10 сек.														
6.	Перенесите пробы в термоциклер.														
7.	Установите программу термоциклера следующим образом:														
	 The graph illustrates a thermal cycling program for 25 cycles. It starts at 96°C for 10 seconds, then drops to 50°C for 5 seconds, followed by 60°C for 4 minutes. After 25 cycles, the temperature drops to 4°C for a final hold. The label '25 Cycles' is placed below the first three stages of the cycle.														
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Температура (°C)</th><th>Время</th><th>Циклы</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96</td><td>10 сек</td><td rowspan="3">25</td></tr> <tr> <td>50</td><td>5 сек</td></tr> <tr> <td>60</td><td>4 мин</td></tr> <tr> <td>4</td><td>Задержка</td><td>-</td></tr> </tbody> </table> Замечание: не оставляйте ваши пробы на холоду более 24 часов. Храните ваши пробы при -15/-25°C.	Температура (°C)	Время	Циклы	96	10 сек	25	50	5 сек	60	4 мин	4	Задержка	-	
Температура (°C)	Время	Циклы													
96	10 сек	25													
50	5 сек														
60	4 мин														
4	Задержка	-													
8.	Запустите термоциклер.														
9.	Когда программа завершена: • Переходите к стадии очистки или • Остановитесь и храните пробы в холодильнике при температуре от -15°C до -25°C. Не храните пробы более 3-х дней при -15/-25°C.														

Г4. Очистка последовательностей

Замечание: существует три метода, рекомендованных для очистки продуктов реакций секвенирования с BigDye терминатором. Пожалуйста, обратитесь к секции «Очистка последовательностей на стр. Введения, если вы еще не выбрали наилучшую опцию для вашей лаборатории.

Опция 1: изопропанол

Чтобы провести очистку с использованием изопропанола:

1.	Достаньте штатив MicroAmp из термоциклера и откройте все колпачки на пробирках или крышку планшеты		
2.	К каждому образцу добавьте: • 20 мкл деионизированной воды • 60 мкл 100% изопропанола Или вы можете также приготовить свежий основой (концентрированный) раствор путем комбинирования • 1 части деионизированной воды • 3 частей 100% изопропанола Затем добавьте 80 мкл к каждой смеси пробы.		
3.	Закройте пробирки крышками или планшеты – адгезивной лентой алюминиевой фольги.		
4.	Перемешайте на вортексе или переверните несколько раз штатив для смешивания.		
5.	Инкубируйте смеси проб: • При комнатной температуре • В темноте • 15 минут		
6.	Центрифугируйте штатив/планшет при 1500-2000 x g в течение 45 минут.		
7.	Как только центрифуга остановится, осторожно снимите крышечки или ленты без повреждения осадков.		
8.	Немедленно поместите фильтровальную бумагу или ткань без линта (пуха и корпий) на верх штатива/планшета и переверните его.		
9.	Поместите штатив или планшет в центрифугу в перевернутом состоянии поверх ткани без линта или фильтровальной бумаги и центрифугируйте при 700 x g 1 минуту. ВНИМАНИЕ! Вы должны провести крутку в перевернутом состоянии сразу же после центрифугирования или будет потеря сигнала.		
<table border="1"> <tr> <td>Если штатив/планшет...</td> <td>Затем...</td> </tr> </table>		Если штатив/планшет...	Затем...
Если штатив/планшет...	Затем...		

	стоит более минуты перед перевернутым вращением	Центрифугируйте его в исперсвернутом состоянии 5 мин при 1500-2000 x g перед выполнением перевернутой крутки.
10.	Когда центрифуга остановится, достаньте штатив/планшет и либо: • перейдите к «Автоматическому определению последовательности», либо • закройте штатив/планшет крышечками или алюминиевой лентой и храните при $-15/-25^{\circ}\text{C}$ в темноте. Анализируйте пробы в пределах одной недели. ВНИМАНИЕ! Используйте темную коробку для хранения. Продукты секвенирования светочувствительны.	

Опция 2: этанол/ацетат натрия

Для проведения очистки с помощью этанола/ацетата натрия:

1.	Приготовьте раствор ацетата/этанола путем соединения следующих компонентов на реакцию: • 2 мкл 3.0 М ацетата натрия, pH 4.6 • 50 мкл 100% этанола Замечание: приготовьте для одной реакции больше, чем нужно. ВНИМАНИЕ! Приготовьте свежий раствор для каждой партии преципитации.
2.	Добавьте 52 мкл раствора ацетата/этанола к каждой реакции секвенирования.
3.	Закройте пробирки крышками или планшет адгезивной лентой алюминиевой фольги.
4.	Смешайте путем переворачивания три раза или на вортексе. ВНИМАНИЕ! Перемешайте тщательно на данном этапе. Это существенно для эффективной преципитации.
5.	Центрифугируйте при 2000 x g 20 минут.
6.	Как только центрифуга остановится, снимите крышки или ленту без повреждения осадков.
7.	Немедленно поместите фильтровальную бумагу или ткань без линта поверх штатива/планшета и переверните его.
8.	Центрифугируйте при 150 x g 1 мин.
9.	Добавьте 150 мкл 70% этанола в каждую лунку.
10.	Центрифугируйте при 2000 x g 5 мин.
11.	Немедленно поместите фильтровальную бумагу или ткань без линта поверх штатива/планшета и переверните его.
12.	Центрифугируйте при 150 x g 1 мин.

13.	Когда центрифуга остановится, достаньте штатив/планшет и либо: • перейдите к «Автоматическому определению последовательности», либо • закройте штатив/планшет крышечками или алюминиевой лентой и храните при $-15/-25^{\circ}\text{C}$ в темноте. Анализируйте пробы в пределах одной недели. ВНИМАНИЕ! Используйте темную коробку для хранения. Продукты секвенирования светочувствительны.
-----	--

Опция 3: очистка с помощью планшет CENTRI•SEP 96

ВНИМАНИЕ! Планшеты CENTRI•SEP 96 чувствительны к температуре. Не храните планшеты при температуре ниже 4°C . Планшеты перед использованием выдержать при комнатной температуре.

Чтобы провести очистку с помощью планшет CENTRI•SEP 96:

1.	Удостоверьтесь, что планшеты CENTRI•SEP 96 имеют комнатную температуру.
2.	Уберите адгезивную заклеивающую фольгу со дна планшеты CENTRI•SEP 96 и затем с верха.
3.	Подготовьте планшет CENTRI•SEP 96. А. Поставьте (пристыкуйте) планшет CENTRI•SEP 96 на верхнюю часть MicroAmp оптической 96-луночной реакционной плашки и свяжите две платы вместе лубяным волокном (рогожей, мочалом). Б. Центрифугируйте платы при $700 \times g$ 2 мин чтобы набить колонку. В. Снимите обвязку и разделите платы/планшеты. Г. Уберите остаточную жидкость из отмывочной платы путем интенсивного встряхивания. Д. Промойте и сохраните MicroAmp оптическую 96-луночную реакционную плашку для повторного использования в качестве отмывочной платы.
4.	Поместите Princeton 96-луночную плату для сбора проб на 96-луночное основание, затем стыкуйте планшет CENTRI•SEP 96 на верх.
5.	Привяжите плашки к 96-луночному основанию так, чтобы быть уверенными, что вы выровняли все буквенно-цифровые индексы на всех плашках.
6.	Нанесите продукты секвенирования. Используя многоканальную пипетку, перенесите 20 мкл каждой реакции секвенирования в отдельные лунки в планшет CENTRI•SEP 96. • Осторожно поместите пробы в центры гелевых слоев. Не помещайте пробы на края лунок. • Не прикасайтесь к гелю носиками пипетки.

7.	Центрифугируйте плату при 700 x g 2 мин.
8.	Уберите только планшеты CENTRI•SEP 96 (вы должны иметь примерно 20 мкл в каждой лунке платы для сбора проб).
9.	Подсушите пробы в центрифуге с вакуумным насосом, снабженной соответствующим ротором. Не пересушивайте пробы.
10.	Когда высушивание завершено, то • Переходите к «Автоматическому определению последовательностей, либо • Заклейте плашку лентой ThermoSeal (вложена в упаковку планшета CENTRI•SEP 96). Анализируйте пробы в пределах одной недели. ВНИМАНИЕ! Используйте темную коробку для хранения. Продукты секвенирования светочувствительны.

Д. Автоматическое определение последовательности

Автоматическое определение последовательности должно быть выполнено на генетическом анализаторе ABI Prism® 3100. Пожалуйста, прочтите *Руководство по эксплуатации генетического анализатора ABI Prism® 3100 системы генотипирования ViroSeq HIV-1* для правильного использования инструмента 3100, включая установку, требования калибровки и процедуры контроля качества.

Проводите эту процедуру в постамплификационной Области 3.

Е. Анализ с помощью программного обеспечения ViroSeq.

Для детальных инструкций пожалуйста обращайтесь к *Руководству по программному обеспечению версия 2.5 системы генотипирования ViroSeqHIV-1*, включенному в программное обеспечение ViroSeq. Даны следующие процедуры:

- Создание нового проекта
- Информация о пробе
- Процедура редактирования
- Печатный отчет

ВНИМАНИЕ! Не выполняйте одновременно анализ данных и не используйте другое программное обеспечение во время секвенирования. Данные секвенирования должны быть перенесены в другой компьютер на анализ, если компьютер 3100 занят сбором данных.

Контроль качества

Контрольный модуль 8E5 ViroSeq, содержащий как положительные, так и отрицательные контроли, предоставляется вместе с системой генотипирования ViroSeq HIV-1. Положительный и отрицательный контроли должны использоваться в каждой постановке. Положительный контроль ViroSeq необходим для успешного мониторинга как ОТ-ПЦР, так и генотипирования. Отрицательный контроль ViroSeq необходим для успешного мониторинга только РТ-ПЦР.

Успешное проведение ОТ-ПЦР

Успешное проведение ОТ-ПЦР определено в разделе «Г2. Подсчет количества ДНК». Чтобы быть уверенным в высоком качестве последовательности, интенсивность ОТ-ПЦР полосы должна быть равна или выше интенсивности полосы, соответствующей 20 нг контроля в агарозном геле. Пробы плазмы с вирусной нагрузкой выше 2000 копий/мл должны, следовательно, давать по меньшей мере 20 нг продукта ОТ-ПЦР на данной стадии. Если вирусная нагрузка падает ниже 1000 копий/мл, шанс успешного проведения ПЦР уменьшается. Однако, любая проба со счетом ДНК 20 нг или выше может быть секвенирована с получением генотипа, независимо от начальной концентрации в плазме. Положительный контроль ViroSeq (8E5) имеет начальную вирусную нагрузку от 50 000 до 100 000 копий/мл; слабый положительный контроль (разведение 1:10) имеет вирусную нагрузку от 5000 до 10000 копий/мл. Отрицательный контроль не имеет детектируемой ВИЧ-1 РНК.

Таблица 1. Предполагаемые результаты для ОТ-ПЦР для контролей ViroSeq:

Положительный/слабоположительный контроль		Отрицательный контроль	
Предполагаемое значение	>40 нг/5 мкл (неразведенный) >20 нг/5мкл (слабоположительный)	Предполагаемое значение	0 нг
Если...	Тогда...	Если...	Тогда...
Интенсивность полосы: • положительной, неразведенной: <40 нг • слабоположительной <20 нг	Постановка недействительна. Повторите тестирование.	Какая-нибудь полоса присутствует в агарозном геле	Произошла контаминация из пробы в пробу. • Все результаты по пробам недействительны • Повторите начиная с «А. Приготовление проб» по «Г2. Определение количества ДНК»
Все другие реакции с пробам не удалась (менее 20 нг/5 мкл)	Произошла системная ошибка. • Повторите все пробы и контроли		
Неудача повторяется	Свяжитесь со службой поддержки Эбботт Диагностики (пожалуйста, посмотрите номер, указанный в конце этого документа)		

Успешное проведение генотипирования

Успех генотипирования определяется качественно в процессе анализа с помощью программного обеспечения ViroSeq. Для того чтобы успешно генотипировать пробу, шесть или семь праймеров ViroSeq должны быть собраны в проект для получения консенсус последовательности (A или D,B,C,F,G,H). К тому же, качественная оценка качества последовательности должна быть сделана для того, чтобы быть уверенным в надежности и точности результатов. Высокий шум фона может помешать определению

смеси вирусов. Программное обеспечение версии 2.5 ViroSeq распознает вирусную смесь, если присутствует второй пик, который составляет по меньшей мере 30% первого пика.

Таблица 2. Предполагаемые результаты генотипирования для контролей ViroSeq:

Положительный контроль		Отрицательный контроль
Предполагаемое значение	• Собраны все семь праймеров • Нет мутаций лекарственной устойчивости • Две новых мутации - протеаза V31 - OT L214F - Нет перепутанных оснований*	Не используйте отрицательный контроль для мониторинга успеха или неудачи генотипирования. Негативные контроли, которые не содержат ДНК, могут в действительности внести вклад в неудачу определения проб из-за обратных электрических эффектов, которые пустые капилляры оказывают на капиллярные секвенирующие инструменты.
Выполните качественную визуальную инспекцию электрофореграмм для оценки качества последовательности и степени интенсивности фона в контроле. Проверьте данные постановки на правильную калибровку инструмента. Если постановка показывает соответствующие и пропорциональные пики «поддержки» (меньшие пики другого цвета), то создайте и установите новый инструментальный (матриксный) файл и проанализируйте данные с помощью программного обеспечения анализа секвенирования с использованием нового инструментального файла.		

Положительный контроль ViroSeq (8E5) является неинфекционным вирусом ВИЧ-1 и должен иметь слабый фон либо не иметь его вообще. Любые сообщенные в отчете мутации отличные от тех, которые даны выше, могут свидетельствовать об ошибке редактирования или о проблеме с качеством секвенирования. Сравнение с результатами других проб необходимо для определения причины неудачи. Например:

- Если пики фона относятся к неудачному контролю, эти пики видны в каждой пробе, и все пробы имеют шум одного и того же цвета для данного основания, то новый инструментальный (матриксный) файл должен быть создан и установлен. Данные должны быть проанализированы повторно с помощью программного обеспечения анализа секвенирования с использованием нового инструментального файла.
- Если цвета пиков фона случайны, то все пробы и контроли должны быть повторены от «Б. Обратная транскрипция» по «Е. Анализ с помощью программного обеспечения ViroSeq».

Если неудачи повторяются, пожалуйста, свяжитесь со службой поддержки потребителя Эбботт Диагностикс по номеру, указанному в конце этого документа.

Замечание: Положительный контроль ViroSeq (8E5) имеет вставку в одно основание в кодоне 219 гена ОТ, которая делает вирус неинфекционным. Мутация 219 не появляется в процессе редактирования или в отчете об антиретровирусной лекарственной устойчивости, поскольку это мутация сдвига рамки и она не найдена в клинических вирусных пробах.

Результаты

Интерпретация отчета о лекарственной устойчивости к ретровирусам

Лабораторная информация и информация о пробах

Эта часть отчета определяется пользователем. В меню редактирования опция Редактирования Отчета об Устойчивости открывает диалоговое окно для введения информации.

Устойчивость к ретровирусу ВИЧ-1.

Устойчивость к ретровирусу сообщается для трех классов лекарств:

- Нуклеозидные Ингибиторы Обратной Транскриптазы
- Не- Нуклеозидные Ингибиторы Обратной Транскриптазы
- Ингибиторы Протеазы

Данные устойчивости сообщаются в крайней левой колонке отчета. Они даются для каждого лекарства в пределах класса и основаны на мутациях, найденных в пробе. Присутствие специфических мутаций или их комбинаций дает один из следующих сигналов:

- **High** указывает на высокий уровень устойчивости.
- **Poss** указывает на возможную устойчивость. Мутации и комбинации мутаций, которые не удовлетворяют критерию **High**, но дают основания думать о возможной устойчивости.
- **None** указывает на недостаточные основания в пользу резистентности.

Замечание: названия **High-m** и **Poss-m** используются в разделе Нуклеозидные Ингибиторы Обратной Транскриптазы отчета, если определение устойчивости базируется на присутствии мутации Q151M или вставке в кодоне 69 ([11]). Эти мутации в комбинации с другими заменами дают множественную нуклеозидную устойчивость ко многим лекарствам.

При представлении мутаций используются договоренности о стиле, цвете и пунктуации, чтобы показать, как эти мутации соотносятся с развитием лекарственной устойчивости.

- **Красным жирным шрифтом в рамке** – мутации, которые сами по себе или в комбинации с другими мутациями приводят к сигналу **High**.
- **Подчеркнутый оранжевый жирный шрифт** – мутации, которые сами по себе или в комбинации с другими мутациями приводят к сигналу **Poss**.
- **Голубой жирный шрифт** – мутации, которые очень мало вносят в развитие устойчивости. Более чем одна из этих мутаций требуется для получения сигнала **Poss**.
- **[Жирный зеленый шрифт в квадратных скобках]** – мутации, которые являются компенсаторными, т.е. их действие направлено на восстановление чувствительности к лекарствам. Примером служит действие мутации M184V/I на устойчивость к AZT ([25]).

Новые мутации

Раздел Новых Мутаций отчета перечисляет мутации, обнаруженные в пробе, которые не входят в список Программного обеспечения версии 2.5 ViroSeq известных позиций лекарственной устойчивости. Новые мутации устанавливаются для гена протеазы или ОТ.

Условные обозначения

Последний раздел отчета содержит цветовой ключ и список Мутаций Устойчивости к ВИЧ-1, которые используются в алгоритме для определения лекарственной устойчивости.

Алгоритм

Интерпретация основана на патентованном алгоритме, который определяет относительный вклад мутации в открытых рамках считывания обратной транскриптазы или протеазы в развитие устойчивости к антиретровирусному препарату. Мутации, включенные в алгоритм, основывались на:

- Мутациях, определенных FDA как имеющих клиническое применение ([35, таблицы А и Б]).
- Мутациях, перечисленных как первичные и вторичные в рекомендациях Международного Общества США по СПИДу ([11]).
- Этот список был недавно обновлен на интернет- сайте IAS-USA (<http://www.iasusa.org/>)
- Мутациях, перечисленных в исследованиях GART ([12]) и VIDART ([13]), как предсказывающие устойчивость к лекарствам.
- Рекомендациях Объединенной Группы по Устойчивости, основанных на их анализе нескольких ретроспективных и предстоящих исследованиях ([26]).
- Дополнительных мутациях, которые были введены в схему, основываясь на более недавних отчетах и консультациях с экспертами в данной области для обеспечения интерпретаций, согласующихся с текущей литературой ([14,8,27,28,29,30]).

Относительный вклад специфических мутаций в направлении развития устойчивости был оценен на основании данных, полученных из клинических испытаний и измерений IC₅₀ при введении мутации в штаммы дикого типа ВИЧ-1. Действие мутаци(й) на восприимчивость к лекарству было также оценено в клинических изолятах. Когда было возможно, данные по связыванию лекарства и информация об уровнях лекарства в плазме также были использованы для оценки действия мутации или комбинации мутаций в создании устойчивости к лекарству. Отчет содержит отдельные разделы по Нуклеозидным Ингибиторам Обратной Транскриптазы (NRTIs), Не-Нуклеозидным Ингибиторам Обратной Транскриптазы (NNRTIs) и Ингибиторам Протеазы (PIs). Мутации, используемые в определении резистентности, перечислены в отчете схематически вместе с названием лекарства.

Алгоритм был разработан так, чтобы рассмотреть все возможные комбинации мутаций, которые могут дать устойчивость к данному лекарству. Присутствие специфической мутации или комбинации мутаций будет приводить к одному из трех интерпретационных отчетов, перечисленных ниже:

1. Высокий уровень очевидности устойчивости, сообщаемый как **High**.
2. Недостаточно свидетельств устойчивости, сообщается как **None**.
3. Мутации или комбинации мутаций, которые не отвечают критериям, требуемых для индикации высокого уровня очевидности устойчивости, но давали основания думать об устойчивости, сообщаемой как **Poss** (возможная).

Термины **High-m** и **Poss-m** используются в разделе NRTI отчета, если определение устойчивости основывается на присутствии мутации Q151M или вставке в кодоне 69 ([11]). Эти мутации вместе с другими заменами дают множественную нуклеозидную устойчивость (MNR) ко многим лекарствам. Если более высокий рейтинг устойчивости получается при базировании на мутациях, вносящих специфический вклад в развитие

устойчивости, это будет преимущественно иметь место из-за отчета, составленного благодаря MNR.

Мутации кодированы и представлены различными шрифтами в отчете по Антиретровирусной Лекарственной Устойчивости, чтобы показать их отношение к развитию лекарственной устойчивости. Мутации, обозначенные жирным красным шрифтом (в рамке) – обычно те, которые сами по себе или в сочетании с другими мутациями приводят к отчету **High**. Мутации, обозначенные жирным оранжевым шрифтом (подчеркнутым) – обычно те, которые сами по себе или в сочетании с другими мутациями будут инициировать **Poss** (возможный) отчет устойчивости. Мутации, обозначенные голубым шрифтом, меньше всего вносят вклад в развитие лекарственной устойчивости, и более чем одной подобной мутации требуется для инициации «возможного» отчета устойчивости. Компенсаторные мутации или мутации, которые «противостоят» фенотипу устойчивости, изображены жирными зелеными буквами внутри квадратных скобок. Хорошим примером является действие мутации M184V/I на устойчивость к AZT ([25]).

Является общепринятым мнение, что развитие устойчивости к лекарству - это продолжительный процесс с некоторыми мутациями, дающими низкий уровень устойчивости, другими мутациями, дающими более высокий уровень устойчивости и комбинациями, имеющими дополнительное, синергическое или иногда компенсаторное действие ([33, 34, 25]). Взаимодействие между мутациями, дающими устойчивость к лекарству, хорошо определено для некоторых лекарств, но не для всех. Необходимы дополнительные исследования для расшифровки точных вкладов этих комбинаций мутаций в развитие высокого уровня устойчивости. В отдельных случаях, когда данные не ясно указывали на высокий уровень очевидности устойчивости, детектируемые мутации могут предсказывать будущую неминуемую устойчивость. Мы считаем, что сообщение о них как маркеров возможной устойчивости дает определенные преимущества врачам.

Отчет также содержит «отказы» с единичной * указывающей, что детекция по меньшей мере одной мутации, связанной с лекарством, не была подтверждена, независимо от того, нужна или нет данная мутация для достижения разряда устойчивости (к * «отказу» в этом разделе не обращаются). Двойной ** указывает на то, что «полезность» по меньшей мере одной из мутаций или комбинаций мутаций в определении рейтинга устойчивости для лекарства не была подтверждена. Тройной *** указывает на то, что оба «отказа» применимы.

Ниже перечислены мутации, дающие устойчивость к лекарствам; численные оценки, используемые в алгоритме определения категории устойчивости и различные возможные комбинации мутаций, которые дают определенный отчет по устойчивости (перечисленные комбинации не все инклюзивны). Мутации с обновленной IAS-USA ([11]), список FDA утвержденных мутаций ([35]), анализ RCG ([26]) и исследование GART ([12]) были перечислены где необходимо.

Где возможно, комбинации перечисленных мутаций выводятся из опубликованных данных, указывающих кратные изменения IC_{50} , наблюдаемых для рекомбинантных штаммов вирусов в культуре тканей. Численные оценки, приписываемые индивидуальным мутациям, также отражают кратные изменения в IC_{50} , когда эти мутации вводятся в штаммы дикого типа ВИЧ-1. Интерпретации, основанные на наличии индивидуальных мутаций или комбинации мутаций, которые выверены согласно таблицам FDA, «не отказаны», тогда как те, которые находятся вне пределов правил, объединенных в таблицах FDA, «отказаны» при помощи двойной звездочки **.

Для оценки кумулятивного действия большого числа комбинаций мутаций, которые происходят из-за замен нескольких аминокислот в протеазе и обратной транскриптазе, что

может давать устойчивость, мы присвоили численные значения мутациям. Индивидуальное численное значение мутации и общий счет значений «кат-офф» для данной категории устойчивости специфичны для данного лекарства и для мутаций, дающих устойчивость к этому лекарству. Общий счет значений «кат-офф» были присвоены определенному лекарству таким образом, что кумулятивный эффект комбинаций мутаций (множественные мутации) мог быть оценен и приписан к определенной категории устойчивости к лекарству. Эти численные значения также имеют целью программирование алгоритма.

Мы использовали следующие критерии при присвоении численных значений мутациям и общего счета значений «кат-офф» (перечисленных ниже) для определения категории устойчивости:

- Когда предоставлялись определенные руководящие принципы, численные значения и значения «кат-офф» выбирались таким образом, чтобы комбинации мутаций в пределах таблиц FDA ([35]) приводили бы к правильному отчету по устойчивости, как определено направляющими принципами в таблице.
- Мутациям с максимальным вкладом в развитие устойчивости, обычно тем, которые дают устойчивость, присутствуя как единичная мутация, было присвоено самое высокое численное значение (обычно 1.0). Соответственно, эти мутации ассоциировались с наибольшим увеличением в IC_{50} при введении в штаммы дикого типа ВИЧ-1 и безусловно были связаны с устойчивостью во многих клинических испытаниях.
- Мутациям с менее выраженным эффектом и требующим аккумуляции двух или более мутаций для возникновения устойчивости были приписаны средние значения (обычно 0.5 – 0.25). Например, при рассмотрении устойчивости к AZT, мы присвоили значение 1.0 для мутации T215Y/F и значение 0.5 для мутаций M41L и K70R. Замена T215Y/R приводит к возрастанию IC_{50} в 12-16 раз для AZT, тогда как M41L и K70R дают 9-кратное увеличение в IC_{50} .
- Мутациям с наименьшим вкладом в развитие устойчивости, но наблюдаемым у пациентов, леченых лекарством и имеющим слабое действие на значения IC_{50} в культуре, были присвоены низкие значения (обычно 0.1). Присутствие этих мутаций могло приводить к отчету возможной устойчивости. Некоторые из этих мутаций могут усиливать действие основных мутаций. В некоторых случаях множественные мутации в этой категории в комбинации с мутациями со средними значениями могли приводить к устойчивости.
- Значения были приписаны таким образом, что комбинации мутаций, известных как способных генерировать устойчивость, делали бы это, если они были определены в анализе.

A. Устойчивость к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ)

A1. Зидовудин (zidovudine), AZT (AZT), ретровир (retrovir)

Мутация	Счет
T215F/Y	1.0
Если присутствует V184V/I	0.75
M41L	0.5
D67N	0.5
K70R	0.5
L210W	0.5

K219Q/E	0.5
G333D/E	0.5

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.5	Нет свидетельства устойчивости
От 0.5 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
M41L	M41L	K70R	215F/Y ±41L ±67N ±70R ±210W ±219E/Q
D67N	D67N	T215Y/F	
K70R	K70R	M41L	
L210W	L210W	D67N	
T215Y/F	T215Y/F	L210W	
K219Q/E	K219Q/E	K219Q	
	G333D/E		

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Любые две или более из: M41L D67N K70R L210W T215Y/F K219Q/E G333D/E	Высокая (High)
T215Y/F сама по себе (без M184V/I)	Высокая** (High**)
T215Y/F и M184V/I	Возможная** (Possible**)
Одна любая из: M41L D67N K70R L210W K219Q/E G333D/E	Возможная** (Possible**)
Ни одна из указанных выше	Никакая

Замечание: Устойчивость к АЗТ также будет отмечена в отчете если сошлись критерии мульти-нуклеозидной устойчивости (MNR), благодаря мутации Q151M или 69-й вставки. Смотрите ниже категории MNR 7 и 8.

A2. Ставудин (stavudine), д4Т (d4T), зерит (zerit)

Мутация	Счет
V75T	1.0
M41L	0.25
D67N	0.25
K70R	0.25
L210W	0.25
T215F/Y	0.25
K219Q/E	0.52

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.25	Нет свидетельства устойчивости
От 0.25 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
M41L	нет	V75T	75T
D67N			
K70R			
V75T/M/S/A			
L210W			
T215Y/F			
K219Q/E			

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
V75T сама по себе	Высокая (High)
Любые две или более из: M41L D67N K70R L210W T215Y/F K219Q/E	Высокая** (High**)
От одной любой до трех из: M41L D67N K70R L210W T215F/Y K219Q/E	Возможная** (Possible**)
Ни одна из указанных выше	Никакая

Замечание: Устойчивость к д4Т также будет отмечена в отчете если сошлись критерии мульти-нуклеозидной устойчивости (MNR), благодаря мутации Q151M или 69-й вставки. Смотрите ниже категории MNR 7 и 8.

A3. Диданозин (Didanosine), ddl (ddl), Видекс (Videx)

Мутация	Счет
L74V	1.0
K65R	0.5
M184V/I	0.5
T69D	0.5

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.5	Нет свидетельства устойчивости
От 0.5 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
K65R	K65R	K65R	74V
L74V	L74V	L74V	65R
M184V/I	M184V/I	M184V/I	69D
			184V
			215Y

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
L74V сама по себе	Высокая (High)
K65R + M184I/V	Высокая (High)
K65R + T69D	Высокая** (High**)
M184I/V + T69D	Высокая** (High**)
Любая из: K65R T69D M184V/I	Возможная** (Possible**)
Ни одна из указанных выше	Никакая

Замечание: Устойчивость к диданозину (ddl) также будет отмечена в отчете если сошлись критерии мульти-нуклеозидной устойчивости (MNR), благодаря мутации Q151M или 69-й вставке. Смотрите ниже категории MNR 7 и 8.

A4. Зальцитабин (zalcitabine), ddC (ddC), ХИВИД (HIVID)

Мутация	Счет
T69D	1.0
K65R	1.0
L74V	1.0
M184V/I	1.0

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <1.0	Нет свидетельства устойчивости
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
K65R	K65R	K65R	74V
T69D	T69D	T69D	65R
L74V	L74V	L74V	69D
M184V/I	M184V/I	M184V/I	184V
			215F/Y

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Любая одна или более из: K65R T69D K74V M184V/I	Высокая (High)
Ни одна из указанных выше	Никакая

Замечание: Устойчивость к зальцитабину (ddC) также будет отмечена в отчете если сошлись критерии мульти-нуклеозидной устойчивости (MNR), благодаря мутации Q151M или 69-й вставке. Смотрите ниже категории MNR 7 и 8.

А6. Абакавир (Abacavir), АБЦ (ABC), зиаген (Ziagen)

Мутация	Счет
K65R	0.7
L74V	0.7
M184V/I	0.7
Y115F	0.7
M41L	0.10
D67N	0.10
K70R	0.10
L210W	0.10
T215Y/F	0.10
K219Q/E	0.10

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.3	Нет свидетельства устойчивости
От 0.3 до <1.5	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.5	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)
M41L	K65R	K65R
K65R	L74V	L74V
D67N	M184V/I	M184V
K70R	M41L	M41L
L74V	D67N	D67N
Y115F	K70R	K70R
M184V	Y115F	Y115F
L210W	L210W	L210W
T215Y/F	T215Y/F	T215Y/F
K219Q/E	K219Q/E	K219Q

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Три или более из: K65R L74V M184V/I Y115F	Высокая (High)
Любые две из: K65R M184V/I Y115F L74V и одна или более из: M41L D67N K70R L210W T215F/Y K219Q/E	Высокая (High)
Одна или две из: K65R M184V/I Y115F L74V	Возможная** (Possible**)
Три или более из: M41L D67N K70R L210W T215F/Y K219Q/E	Возможная** (Possible**)

Ни одна из: K65R M184V/I Y115F L74V и две и менее из: M41L D67N K70R L210W T215F/Y K219Q/E	Никакая
---	---------

Замечание: Устойчивость к абакавиру (ABC) также будет отмечена в отчете если сошлись критерии мульти-нуклеозидной устойчивости (MNR), благодаря мутации Q151M или 69-й вставке. Смотрите ниже категории MNR 7 и 8.

A7. Мульти-НИОТ устойчивость А, МНУ-А, (условие: счет идет если только присутствует мутация Q151M)

Мутация	Счет
Q151M	1.5
A62V	0.25
S68G	0.25
V75I	0.25
F77L	0.25
F116Y	0.25

Общий счет	Интерпретация
От 1.5 до <2.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 2.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
Q151M	Q151M	Основные Q151M A62V V75I F77L F116Y	151M ±62V ±75I ±77L ±116Y
A62V	A62V		
V75I	S68G		
F77L	V75I		
F116Y	F77L		
	F116Y		

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Q151M + две или более из: A62V S68G V75I F77L F116Y	Высокая (High)
Q151M + одна из: A62V S68G V75I F77L F116Y	Возможная** (Possible**)
Q151M одна	Возможная** (Possible**)
Без Q151M	Никакая

Замечание: МНУ-А дает устойчивость к ZDV, ddI, ddC, d4T** и ABC. Текущий список ФДА не включает d4T ([35]).

А8. Мульти-НИОТ устойчивость Б, МНУ-Б, (условие: счет идет если только присутствует мутация вставки 69)

Мутация	Счет
Вставка 69	1.5
M41L	0.25
D67N	0.25
K70R	0.25
T215Y/F	0.25
L210W	0.25
K219Q/E	0.25

Общий счет	Интерпретация
От 1.5 до <2.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 2.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)
69ins	69ins	69ins
M41L	M41L	M41L
D67N	D67N	D67N
K70R	K70R	K70R
A62V	A62V	A62V
L210W	L210W	L210W
T215Y/F	T215Y/F	T215Y/F
K219Q/E	K219Q/E	K219Q

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
69ins + две или более из: M41L D67N K70R T215F/Y L210W K219Q/E	Высокая (High)
69ins + одна из: M41L D67N K70R T215F/Y L210W K219Q/E	Возможная** (Possible**)
69ins одна	Возможная** (Possible**)
Без 69ins	Никакая

Замечание: MHY-B дает устойчивость к ZDV, ddl, ddC, d4T** и ABC. Текущий список ФДА не включает d4T ([35]).

Б. Устойчивость к ННИОТ (не нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы)
 Б1. Невирапин (Nevirapine), (НВП, NVP) вирамун (Viramune)

Мутация	Счет
K103N	1.0
V106A	1.0
Y181C/I	1.0
G190A/S	1.0
V188C/L	1.0
V108I	0.5
L100I	0.5
K101E	0.5
M230L	0.5
Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.5	Нет свидетельства устойчивости
От 0.5 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
L100I	L100I	K103N	103N
K103N	K103N	V106A	106A
V106A	V106A	V108I	181C/I
V108I	V108I	Y181C/I	188C
Y181C/I	Y181C/I	Y188C/L/H	
Y188C/L/H	Y188C/L	G190A/S	
G190A/S			
M230L			

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Любая одна или более из: K103N V106A Y181C/I Y188C/L	Высокая (High)
G190A/S	Высокая** (High)**
L100I + V108I	Высокая (High)
L100I + K101E и/или M230L	Высокая** (High)**
V108I + K101E и/или M230L	Высокая** (High)**
K101E + M230L	Высокая** (High)**
Любая одна из: L100I V108I K101E M230L	Возможная** (Possible**)
Ни одна из указанных выше	Никакая

Б2. Делавирдин (Delavirdine), (ДЛВ, DLV), рескриптор (Rescriptor)

Мутация	Счет
K103N	1.0
V106A	1.0
Y181C/I	1.0
Y188C/L	1.0
P236L	0.5
M230L	0.5
L100I	0.5
K101E	0.5
G190A/S	0.5

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.5	Нет свидетельства устойчивости
От 0.5 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)
L100I	K103N	Основные K103N Y181C P236L
V106A	V106A	
K103N	Y181C/I	
Y181C/I	Y188C/L	
Y188L		
G190A/S		
M230L		
P236L		

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Любая одна или более из: K103N V106A Y181C/I Y188C/L	Высокая (High)
Любые две или более из: L100I K101E G190A/S M230L P236L	Высокая** (High)**
Любая одна из: L100I K101E G190A/S M230L P236L	Возможная** (Possible**)
Ни одна из указанных выше	Никакая

Б3. Эфавиренц (Efavirenz), (ЭФВ, EFV) сустина (Sustiva)

Мутация	Счет
K103N	1.0
V188C/L	1.0
G190A/S	1.0
L100I	0.5
K101E	0.5
V108I	0.5
Y181C/I	0.5
P225H	0.5
M230L	0.5
V106A	0.25

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.25	Нет свидетельства устойчивости
От 0.25 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)
L100I	L100I	K103N
K103N	K103N	Y188L
V106A	V108I	G190A/S
V108I	Y188C/L	L100I
Y181C/I		V108I
Y188L		P225H
G190A/S		K101E/Q
P225H		
M230L		

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Любая одна или обе из: K103N Y188C/L	Высокая (High)
G190A/S	Высокая** (High)**
L100I + V108I	Высокая (High)
Любые две или более из: K101E Y181C/I P225H M230L	Высокая** (High)**
Одна из: L100I V108I и одна из: K101E Y181C/I P225H M230L	Высокая** (High)**
Любая одна из: L100I K101E V106A V108I Y181C/I P225H M230L	Возможная** (Possible**)
Ни одна из указанных выше	Никакая

В. Устойчивость к ингибиторам протеазы

В1. Индинавир (Indinavir), ИДВ (IDV), Криксиван (Crixivan)

Мутация	Счет
M46I	0.5
I54V	0.5
V82A/F/T/S	0.5
I84V	0.5
L90M	0.5
L10I/R/V	0.1
K20M/R	0.1
L24I	0.1
V32I	0.1
M36I	0.1
A71V/T	0.1
G73A/S	0.1
V77I	0.1

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.2	Нет свидетельства устойчивости
От 0.2 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
Первичные (основные) M46I/L V82A/F/T/S I84V	M46I I54V V82A/F/T/S I84V	V32I V82A/F/T I84V L90M	Любые три должны присутствовать 10I/R/V 20M/R 24I 36I/L 46I/L 48V 54V 63P 71T/V 82A/F/T 90M
Вторичные L10I/R/V K20M/R L24I V32I M36I I54V A71V/T G73S/A V77I L90M	L90M		
			Одна из нижеуказанных должна присутствовать 46I/L 82A/F/T 84V

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Любые две или более из: M46I I54V V82A/F/T/S I84V L90M	Высокая (High)
Любая одна из: M46I I54V V82A/F/T/S I84V L90M и любые пять или более из: L10I/R/V K20M/R L24I V32I M36I A71V/T G73A/S V77I	Высокая** (High)**
Любая одна из: M46I I54V V82A/F/T/S I84V L90M	Возможная** (Possible**)
Любые две или более из: L10I/R/V K20M/R L24I V32I M36I A71V/T G73A/S V77I	Возможная** (Possible**)
Любая одна или ни одна из: L10I/R/V K20M/R L24I V32I M36I A71V/T G73A/S V77I	Никакая

В2. Ритонавир (Ritonavir), РТВ (RTV), Норвир (Norvir)

Мутация	Счет
M46I	0.5
I54V	0.5
V82A/F/T/S	0.5
I84V	0.5
L90M	0.5
L10I/R/V	0.1
K20M/R	0.1
L33F	0.1
V32I	0.1
M36I	0.1
M46L	0.1
I54L	0.1
A71V/T	0.1
V77I	0.1

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.2	Нет свидетельства устойчивости
От 0.2 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
Первичные (основные) V82A/F/T/S I84V	M46I I54V V82A/F/T/S I84V	V32I V82A/F/T/S I84V L90M	Любые три из 10I/R/V 20M/R 24I 36I/L 46I/L 48V 54V 63P 71T/V 82A/F/T 84V 90M
Вторичные	L90M		
L10/F/I/R/V K20M/R L33F V32I M36I M46I/L I54V/L A71V/T V77I L90M			
			Одна из ниже- дующих должна присутствовать 46I/L 82A/F/T 84V

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Любые две или более из: M46I I54V V82A/F/T/S I84V L90M	Высокая (High)
Любая одна из: M46I I54V V82A/F/T/S I84V L90M и любые пять или более из: L10I/R/V K20M/R L33F V32I M36I M36L I54L A71V/T V77I	Высокая** (High)**
Любая одна из: M46I I54V V82A/F/T/S I84V L90M	Возможная** (Possible**)
Любые две или более из: L10I/R/V K20M/R L33F V32I M36I M36L I54L A71V/T V77I	Возможная** (Possible**)
Любая одна или ни одна из: L10I/R/V K20M/R L33F V32I M36I M36L I54L A71V/T V77I	Никакая

В3. Саквинавир (Saquinavir), (СКВ, SQV), Фортоваза (Fortovase)

Мутация	Счет
G48V	1.0
I54V	0.5
I84V	0.5
V82A/F/T/S	0.5
L90M	0.5
L10I/R/V	0.1
M46I	0.1
I54L	0.1
A71V/T	0.1
G73S	0.1
V77I	0.1

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.1	Нет свидетельства устойчивости
От 0.1 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
Первичные	M46I	G48V	48V + 90M
G48V	G48V	V82A/T	90M или 48V±63P
L90M	I54V	I84V	71T/V
Вторичные	V82A/F/T/S	L90M	
L10I/R/V	I84V		
I54V/L	L90M		
A71V/T			
G73S			
V77I			
V82A			
I84V			

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
G48V сама по себе	Высокая** (High)**
Любые две или более из: G48V I54V V82A/F/T/S I84V L90M	Высокая (High)

Любая одна из: I54V V82A/F/T/S I84V L90M и любые пять или более из: L10I/R/V M46L I54L A71V/T G73S V77I	Высокая** (High)**
Любая одна из: I54V V82A/F/T/S I84V L90M L10I/R/V M46I/L I54L A71V/T G73S V77I	Возможная** (Possible**)
Ни одна из указанных выше	Никакая

В4. Нельфинавир (nelfinavir), НФВ (NFV), вирасепт (Viracept)

Мутация	Счет
D30N	1.0
L90M	1.0
I84V	0.5
V82A/F/T/S	0.5
N88D	0.5
L10I/F	0.1
M36I	0.1
M46I/L	0.1
I54V	0.1
A71V/T	0.1
V77I	0.1

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.1	Нет свидетельства устойчивости
От 0.1 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)	ГАРТ (GART)
Первичные	D30N	D30N	30N
D30N	M46I	V82F	±36I/L
L90M	I54V	I84V	±46I/L
Вторичные	V82A/F/T/S	L90M	±71T/V
L10I/F	I84V		±77I
M36I	N88D		±88D
M46I/L	L90M		
A71V/T			
V77I			
V82A/F/T/S			
I84V			
N88D/S			

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
Любая одна или обе из: D30N L90M	Высокая (High)
Любые две или более из: V82A/F/T/S I84V N88D	Высокая (High)
Любая одна из: 82A/F/T/S I84V N88D	Возможная** (Possible**)
Любая одна из: V82A/F/T/S I84V N88D и любые пять или более из: L10I/F M36I M46I/L I54V A71V/T V77I	Высокая** (High)**
Любая одна или более из: L10I/F M36I M46I/L I54V A71V/T V77I	Возможная** (Possible**)
Ни одна из указанных выше	Никакая

B5. Ампренавир (Amprenavir), АПВ (APV), агенераза (Agenerase)

Мутация	Счет
I50V	1.0
I84V	0.75
I54V	0.25
M46I	0.25
I47V	0.25
L10F/I/R/V	0.1
V32I	0.1

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.1	Нет свидетельства устойчивости
От 0.1 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)	РЦЖ (RCG)
Первичные	M46I	V32I
I50V	I50V	I50V
I84V	I54V	I84V
Вторичные	I84V	
L10F/I/R/V	L90M	
V32I		
M46I/L		
I47V		
V77I		
I54V/L		

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
I50V + любая одна из: M46I I54V I84V	Высокая (High)
I50V сама по себе	Высокая** (High)**
I84V + одна из: M46I I54V	Высокая (High)
I84V + I47V	Высокая** (High)**
Любая одна или более из: L10I/F/R/I/V V32I M46I I47V I54V I84V	Возможная** (Possible**)
Ни одна из указанных выше	Никакая

В6. АБТ 378/р (АБТ 378/г), лопинавир (Lopinavir), ЛПВ (LPV), калетра (Kaletra)

Мутация	Счет
V82A/F/T/S	0.25
I84V	0.25
L10F/I/R/V	0.1
K20M/R	0.1
L24I	0.1
M46I/L	0.1
F53L	0.1
I54V/L/T	0.1
L63P	0.1
A71I/L/T/V	0.1
L90M	0.1

Общий счет	Интерпретация
От 0 до <0.3	Нет свидетельства устойчивости
От 0.3 до <1.0	Устойчивость возможна (частичная устойчивость)
≥ 1.0	Устойчивость

Список мутаций по данным разных источников

ИАС (IAS)	ФДА (FDA)
L10F/I/R/V	M46I
K20M/R	I54V
L24I	V82A/F/T/S
M46I/L	I84V
F53L	L90M
I54V/L	
L63P	
A71V/T	
V82A/F/T/S	
I84V	
L90M	

Возможные комбинации	Интерпретация (устойчивость)
V82A/F/T/S + 184V + любые пять или более из: L10F/I/R/V K20M/R L24I M46I/L F53L I54L/T/V L63P A71I/L/T/V L90M	Высокая (High)
V82A/F/T/S + любые восемь или более из: L10F/I/R/V K20M/R L24I M46I/L F53L I54L/T/V L63P A71I/L/T/V L90M	Высокая (High)
184V + любые восемь или более из: L10F/I/R/V K20M/R L24I M46I/L F53L I54L/T/V L63P A71I/L/T/V L90M	Высокая (High)
V82A/F/T/S + 184V + менее пяти из: L10F/I/R/V K20M/R L24I M46I/L F53L I54L/T/V L63P A71I/L/T/V L90M	Возможная** (Possible**)
V82A/F/T/S + 184V + от одной до семи из: L10F/I/R/V K20M/R L24I M46I/L F53L I54L/T/V L63P A71I/L/T/V L90M	Возможная** (Possible**)

184V + от одной до семи из: L10F/I/R/V K20M/R L24I M46I/L F53L I54L/T/V L63P A711/L/T/V L90M	Возможная** (Possible**)
Любые три или более из: L10F/I/R/V K20M/R L24I M46I/L F53L I54L/T/V L63P A711/L/T/V L90M	Возможная** (Possible**)
Любые две или менее из: L10F/I/R/V K20M/R L24I M46I/L F53L I54L/T/V L63P A711/L/T/V L90M	Никакая**
Ни одна из указанных выше	Никакая**

Ограничения метода

Реагенты и Химия:

- Только обученные пользователи допускаются к проведению анализа ViroSeq.
- Точность и надежность результатов зависят от надлежащего забора пробы и ее хранения до анализа.
- Кровь, собранная в Гепариновые пробирки не подходит для проведения ПЦР и данной методики
- Тестирование на устойчивость к антиретровирусным препаратам было валидировано только для образцов с вирусной нагрузкой в интервале от 2000 до 750,000 копий в мл. В типичной популяции ВИЧ-положительных пациентов в США, которая находится на высокоэффективном антиретровирусном терапевтическом лечении, у примерно 25% пациентов может ожидаться сниженная (подавленная) вирусная нагрузка. Эти пробы не всегда могут давать интерпретабельные результаты с системой генотипирования ViroSeq HIV-1, если вирусная нагрузка ниже 1000 копий/мл. Пользователи должны тестировать пробы с вирусной нагрузкой 2000 копий/мл или больше.

• Независимо от вирусной нагрузки, интенсивность полосы в агарозе РТ - ПЦР продукта должна быть равна или больше чем интенсивность контрольной полосы в 20 нг для получения высококачественного сиквенса.

• Присутствие фермента AmpErase UNG в системе генотипирования ViroSeq HIV-1 снижает риск контаминации только амплифицированным ранее продуктом. При этом контаминация от образца к образцу или контаминация от позитивного контроля к образцу все же может происходить. Внимательное соблюдение организации рабочих зон (областей) и методики снижает возможность контаминации.

• В данном анализе могут быть использованы термоциклер и автоматический секвенатор ДНК только от Applied Biosystems.

• В согласии с черновым руководящим документом FDA для генотипирования ВИЧ-1, аналитические исследования с использованием системы генотипирования Viro-Seq HIV-1 не были завершены для предела детекции для следующих мутаций:

Ген	Мутация
OT	E44D, S68G, V75T, L100I, K101E, V108I, Y181I, G190A, G190S, P225H, M230L, P236L, G333D, G333E
Протеаза	L10F, L10V, K20M, L24I, V32I, L33F, M46L, I47V, F53L, I54L, A71I, A71T, A71L, G73A, G73S, V77L, N88D

Программное обеспечение ViroSeq и Результаты:

- Только обученные пользователи допускаются к использованию программного обеспечения ViroSeq
- Точность и надежность результатов зависят от хорошего качества секвенирования. Высокий фон и данные шума могут мешать точному определению последовательности оснований.
- Понимание и использование редакционных указаний в руководстве по программному обеспечению *ViroSeq HIV-1 Genotyping System Software v. 2.5 software Manual*, поможет в получении более точных данных по последовательностям и выявить мутации, которые в противном случае могут быть пропущены.
- Для образования некоторых мутаций, таких как V82T, V82S, T215Y и др., необходимы множественные замены нуклеотидов в пределах кодона дикого типа. В этих случаях, когда присутствуют смеси вируса дикого типа и мутантной формы, отчет программы сообщает о наличии двух аминокислот, и также приводит аминокислоты, относящиеся к другим возможным комбинациям кодона. Например, для смеси Val (GTC) и Ser (TCC) в кодоне 82, программа информирует о наличии Val, Ser, Ala (GCC) и Phe (TTC) – V, S, A, и F. Это является ограничением всех методологий секвенирования популяций, заключающееся в том, что они не определяют связь (соединение) нуклеотидов из единичного шаблона (образца).

Мутации: Вставки



WARNING

В редких случаях вставки могут приводить к неточному отчету по устойчивости к препаратам.

1. Программное обеспечение ViroSeq не предназначено для разрешения ситуаций когда присутствуют два доминантных вида вируса и один не имеет вставок, тогда как другой имеет. Эта ситуация легко выявляется при использовании программного обеспечения ViroSeq и описывается на стр.3-15 руководства по программному обеспечению (ViroSeq Software Manual)

2. Использование секвенирования гена при генотипировании вирусов со вставками может дать неединственные решения для локализации вставок и существования мутаций в непосредственной близости от вставки. Это ограничение проиллюстрировано и обсуждено в разделе «Мутации вставки» на стр. 3-15 руководства по программному обеспечению (ViroSeq Software Manual)

Программное обеспечение ViroSeq не может интерпретировать пробу со смесью двух или более популяций вируса, где одна популяция содержит вставку, а другие нет (для дальнейшей информации, см. «Мутации вставки» на стр.3-15 руководства по программному обеспечению).

Мутации в генах протеазы и обратной транскриптазы ВИЧ-1, вызывающие устойчивость к антиретровирусным препаратам, наиболее часто возникают из-за не синонимичных замен нуклеотидов, приводящих к изменениям в аминокислотном составе, и, следовательно, выявляются рутинно. Недавно, был описан новый класс инсерционных мутаций, со вставками аминокислот в районе кодона 69 гена Обратной Транскриптазы (RT). Программное обеспечение ViroSeq может выявлять мутации вставки, когда мутация присутствует в гомогенной популяции. Однако программа ViroSeq не в состоянии интерпретировать результаты, если в пробе присутствуют две и более популяций вируса, где одна популяция содержит вставку, а другая нет. Это ограничение существует для всех методологий секвенирования. Мутации вставки в смеси приводят к различной длине последовательности для разных популяций вируса, приводящим к секвенирующим «лесенкам», которые не выравниваются по направлению вниз от вставки. Этот феномен ясно виден при использовании программного обеспечения ViroSeq в виде серий многочисленных смесей, начинающихся в конце вставки и продолжающихся до конца последовательности пробы для данного праймера.

Если наблюдается такое рассогласование, для идентификации мутаций вставки следует применять другие методы (такие как анализ пробы или клонирование).

Вставка в кодоне 69 встречается с очень низкой частотой, менее 1%, у пациентов с пролонгированной терапией ([31]). В недавних сообщениях показывают, что исследователям не удавалось выявить мутацию в смесях (дикий тип и мутант) у пациентов имеющих вирус со вставкой в кодоне 69 ([32]). Этот результат дает основание думать, что мутация вставки быстро замещала дикий тип, и смеси, если есть таковые, присутствовали бы с очень низкой частотой.

Тактико-технические данные

Тактико-технические данные системы генотипирования ViroSeq HIV-1 были оценены при использовании вирусных и клинических проб, содержащих определенные мутации, которые дают вирусную устойчивость при антиретровирусной терапии. Клинические пробы, использованные в анализе, были получены про- и ретроспективно от взрослых и детей и педиатрических пациентов (в возрасте от 4-х месяцев до 17 лет), принимающих антиретровирусную терапию. Представленные результаты определяют чувствительность анализа, специфичность, воспроизводимость и точность относительно правильного определения специфических мутаций в генах ОТ и протеазы ВИЧ-1, которые дают устойчивость к одобренным медицинским препаратам. Клинические образцы также были использованы в исследованиях для определения доли успешных секвенирований и способности определять мутации в смесях и для определения клинической пригодности. Были оценены способность системы генотипирования ViroSeq HIV-1 определять специфические мутации, которые дают вирусную устойчивость в пробе пациента, оценивать определение лекарственной устойчивости и генерировать конечный Отчет по Антиретровирусной Лекарственной Устойчивости, который точно следует основанному на правилах интерпретационному алгоритму. Использование системы генотипирования ViroSeq HIV-1 увеличит способность врачей оценивать эффективность лекарства и

создавать индивидуальные терапевтические стратегии в сочетании с другими клиническими результатами, такими как клиническая картина, лабораторные показатели и антиретровирусная история.

Таблица 3 представляет собой список мутаций, которые полностью проверены при 2000 копий РНК на мл в согласии с документом ФДА «Draft Guidance Document on HIV Drug Resistance Genotype Assays»

Таблица 4 представляет собой список мутаций, которые полностью проверены при 1000 копий РНК на мл в согласии с документом ФДА «Draft Guidance Document on HIV Drug Resistance Genotype Assays»

Таблица 5 представляет собой список мутаций, которые использованы в основном на правилах интерпретационном алгоритме ViroSeq.

Таблица 6 представляет собой список лекарств для которых лекарственная устойчивость оценена в Отчете по Антиретровирусной Лекарственной Устойчивости ViroSeq.

Полностью верифицированный список характеристик

Согласно требованиям ФДА в «Draft Guidance Document on HIV Drug Resistance Genotype Assays» ниже перечислены мутации, которые определяются с чувствительностью более чем 90% согласно спецификации в случаях:

- аналитических испытаний на пределе детекции (2000 копий/мл) с 40% мутантных образцов
- испытаний по клинической валидации с панелью 50 клинических изолятов (вирусная нагрузка от 1800 до 10500)

Мутации M184I, V82F и V82S были определены в клинических пробах, которые являлись частью исследования по клинической валидации с высокой вирусной нагрузкой (более чем 10500). Они не включены в верифицированный список, данный в Таблице 3.

Таблица 3. Полностью верифицированный список характеристик на пределе детекции (LOD) 2000 копий/мл.

В обратной транскриптазе							
M41L	A62V	K65R	T69D	K70R	L74V	F77L	K103N
F116Y	V118I	Q151M	Y181C	M184V	L210W	T215Y	T215F
K219E	K219Q						
В протеазе							
L10I	K20R	D30N	M36I	M46I	G48V	I54V	L63P
A71V	V82T	V82A	I84V	L90M			

Таблица 4. Полностью верифицированный список характеристик на пределе детекции (LOD) 1000 копий/мл.

В обратной транскриптазе							
M41L	A62V	K65R	L74V	F77L	K103N	F116Y	V118I
Y181C	M184V	L210W	T215F	K219Q			
В протеазе							
L10I	D30N	M36I	M46I	G48V	I54V	L63P	A71V
V82T	I84V	L90M					

Таблица 5. Мутации, проанализированные в наших исследованиях и использованные в основном на правилах интерпретационном алгоритме для оценки вирусной устойчивости включают:

В обратной транскриптазе							
M41L	E44D	A62V	K65R	D67N	S68G	T69D	K70R
L74V	V75I	V75T*	F77L	L100I	K101E	K103N	V106A*
V108I	Y115F	F116Y	V118I	Q151M	Y181C	V181I	M184V
M184I*	Y188C*	V188L*	G190A	G190S	L210W	T215Y	T215F
K219Q	K219E	P225H*	M230L*	P236L*	G333D*	G333E*	Мутация вставки в кодоне 69* (69 вставка)
В протеазе							
L10I	L10F	L10R	L10V	K20M	K20R	L24I*	D30N
V32I	L33F	M36I	M46I	M46L	I47V	G48V	I50V*
F53L	I54V	I54L*	I54T	L63P	A71I	A71L	A71T
A71V	G73A	G73S	V77I	V82A	V82F	V82S	V82T
I84V	N88D	L90M					

*- Эти мутации не были определены ни в одной из биологических проб, протестированных в наших исследованиях.

Таблица 6. Отчет по Антиретровирусной Лекарственной Устойчивости ViroSeq сообщает данные по вирусной устойчивости к следующим лекарствам:

Нуклеозидные ингибиторы ОТ*	Не-нуклеозидные ингибиторы ОТ	Ингибиторы протеазы
Epivir®/Lamivudine/3TC	Rescriptor®/delavirdine/DLV	Agenerase®/amprenavir/APV
IIIVID®/Zalcitabine/ddC	Sustiva®/efavirenz/EFV	Crixivan®/Indinavir/IDV
Retrovir®/zidovudine/AZT	Viramune®/Nevirapine/NVP	Fortovase®/saquinavir/IDV
Videx®/didanosine/d4T		Kaletra®/Iopinavir/ABT378/r
Zerit®/stavudine/d4T		Norvir®/ritonavir/RTV
Ziagen®/abacavir/ABC		Viracept®/nelfinavir/NFV

*- отчет также дает оценку мультинуклеозидной устойчивости благодаря присутствию комплекса Q151M или вставки 69 ([11]). Устойчивость к Combivir® и Trizivir® может быть выведена из отчета.

Аналитическая чувствительность

Два параметра были использованы для определения аналитической чувствительности.

- Определение минимальной вирусной нагрузки ВИЧ-1 для надежной детекции мутации
- Определение наименьшего количества мутантного вируса в смеси, которое позволяет надежную детекцию мутации.

Предел детекции

Детекция мутаций

Система ViroSeq была способна правильно определить мутации специфической лекарственной устойчивости, перечисленные ниже при 1000 копий/мл в 100% мутантных проб и при 2000 копий/мл в 40% мутантных проб.

Описание исследования. Для этих исследований предел детекции определен как наименьшая вирусная нагрузка с чувствительностью 100%. Это исследование использует единственный набор реагентов. Двенадцать рекомбинантных вирусов были определены в отрицательной плазме со 100% чистотой и 40/60 мутантный/дикий тип при следующих вирусных нагрузках:

100	6000
200	20 000
600	60 000
1000	200 000
2000	750 000

Каждая проба была протестирована в дубликate. Некоторые мутации появлялись в более чем одном рекомбинантном клоне.

Результаты

- Когда мутация присутствовала в 100% вирусной популяции, пределе детекции для всех мутаций был 100 копий/мл – это означает, что 100% чувствительность и 100% специфичность была получена при 1000 копий/мл для всех следующих мутаций.
- В последующих исследованиях при 2000 копий/мл в смеси 40/60, чувствительность для D67N и T69D была 83% и 50% соответственно для одного из трех наборов реагентов.

Таблица 7. Мутации определенные со 100% чувствительностью в 100% мутантных проб при 1000 копий/мл

В обратной транскриптазе					
M41L	A62V	K65R	D67N	T69D	K70R
L74V	V75I	F77L	K103N	V106A	Y115F
F116Y	V118I	Q151M	Y181C	M184I/V	Y188C/L
L210W	T215F/Y	K219E/Q	S69SSS [(мутация вставки в кодоне 69 (69 вставка)]		
В протеазе					
L10I/R	K20R	D30N	M36I	M46I	G48V
I50V	I54V	L63P	A71V	V82A/F/S/ T	I84V
L90M					

- Когда мутация присутствует в смеси 40/60 мутантный/дикий тип, совокупная чувствительность была больше чем 97% и совокупная специфичность детекции была больше чем 99.9% для всех мутаций при всех вирусных нагрузках больше чем 1000 копий/мл.
- Только при вирусной нагрузке 2000 копий/мл и в смеси 40/60 мутантный/дикий тип, совокупная чувствительность была 98.1% (4 ложно негативных (FN)/206) и совокупная специфичность была 99.9% (1 ложно положительный (FP)/1422).

- Только при вирусной нагрузке 1000 копий/мл и в смеси 40/60 мутантный/дикий тип, совокупная чувствительность была 92.7% (15 ложно негативных (FN)/206) и совокупная специфичность была 99.9% (1 ложно положительный (FP)/1422).

- Таблица 8 (обратная транскриптаза) и таблица 9 (протеаза) перечисляют чувствительности для индивидуальных мутаций в 40% мутантной смеси при вирусной нагрузке 1000 копий/мл и более.

Кроме того, каждой мутации было присвоено значение предела детекции.

Таблица 8. Чувствительность определения мутаций обратной транскриптазы при уровне смеси 40%

Мутация Обратной Транскриптазы	Чувствительность при >1000 копий/мл (№ истинно положительных)	Чувствительность при >1000 копий/мл (№ истинно положительных)	Требование LOD (предела детекции) комментарии
M41L	98.8 (82)	100 (71)	2000
A62V	100 (41)	100 (35)	1000
K65R	100 (13)	100 (11)	1000
D67N	91.6 (76)	93 (66) В последователь- ном исследовании трех наборов дру- гой (отличный от двух других) набор дал 83% чувстви- тельность при 2000 копий/мл, два других набора дали 100% чувстви- тельность.	Не определен (1)
T69D	92.9 (13)	100 (12) В последователь- ном исследовании трех наборов дру- гой (отличный от двух других) набор дал 50% чувстви- тельность при 2000 копий/мл, два других набора дали 100% чувстви- тельность.	2000
K70R	98.2 (54)	100 (47)	2000
L74V	100 (14)	100 (12)	1000
V75I	97.6 (40)	97.1 (34)	6000 (2)

F77L	100 (41)	100 (35)	1000
K103N	98.6 (68)	100 (59)	2000
V106A	100 (25)	100 (21)	1000
Y115F	85.2 (23)	95.7 (22)	6000 (3)
F116Y	100 (41)	100 (35)	1000
V118I	100 (28)	100 (24)	1000
Q151M	97.6 (40)	100 (35)	2000
Y181C	100 (54)	100 (46)	1000
M184I	100 (14)	100 (12)	1000
M184V	98.9 (92)	98.7 (78)	1000 (4)
Y188C	100 (14)	100 (12)	1000
Y188L	100 (13)	100 (11)	1000
L210W	100 (53)	100 (45)	1000
T215F	98.8 (82)	100 (71)	2000
T215Y	95.8 (23)	100 (20)	2000
K219E	78.6 (11)	83.3 (10)	2000 (5)
K219Q	97.6 (40)	97.1 (34)	1000 (6)

Таблица 9. Чувствительность определения мутаций протеазы при уровне смеси 40%

Мутация Протеазы	Чувствительность при >1000 копий/мл (№ истинно положительных)	Чувствительность при >1000 копий/мл (№ истинно положительных)	Требование LOD (предела детекции) комментарии
L10I	100 (12)	100 (10)	1000
L10R	100 (14)	100 (12)	1000
K20R	91.7 (11)	100 (10)	2000
D30N	100 (14)	100 (12)	1000
M36I	100 (12)	100 (10)	1000
M46I	97.6 (40)	97.1 (34)	1000 (7)
G48V	100 (14)	100 (12)	1000
I50V	100 (14)	100 (12)	1000

I54V	100 (12)	100 (10)	1000
L63P	100 (26)	100 (22)	1000
A71V	91.7 (11)	90.0 (9)	1000 (8)
V82A	96.4 (27)	100 (24)	2000
V82F	100 (13)	100 (11)	1000
V82S	85.7 (12)	83.3 (10)	1000 (9)
V82T	100 (27)	100 (23)	1000
I84V	100 (26)	100 (22)	1000
L90M	98.8 (79)	98.5 (67)	1000 (10)

Комментарии:

1. Мутация OT D67N является мутацией, которую анализ определяет с меньшей чувствительностью. Было семь FN результатов из 83 определений при вирусной нагрузке >1000 копий/мл. D67N была определена с 100% чувствительностью в пяти из вирусных панелей (MC1, MC2, MC3, MC4 и MC5). Однако, с одним из образцов панелей (GT1a) было семь FN результатов.
2. Требуемый LOD для мутации V75I составляет 6000 копий/мл (6 истинно положительных определений). При 2000 копий/мл и выше, наблюдался один FN из 42 ожидаемых определений. Только при 1000 копий/мл чувствительность была 100%.
3. Требуемый LOD для мутации OT Y115F составляет 6000 копий/мл (4 истинно положительных определения). При вирусной нагрузке 6000 копий/мл и выше наблюдалась 100% чувствительность; при 2000 копий/мл был один FN из четырех ожидаемых определений.
4. Мутация OT M184V была определена со 100% чувствительностью (28 определений) при 1000 и 2000 копий/мл. Однако, был один FN при 6000 копий/мл (из 84 определений). Следовательно, LOD для этой мутации заявляется при 1000 копий/мл.
5. Мутация OT K219E имела в целом три FN результата, с одним FN результатом при 1000 копий/мл и два других при 60 000 копий/мл. Это был аномальный результат, поскольку мутация была определена со 100% чувствительностью при других вирусных нагрузках (6000, 20 000, 200 000 и 750 000 копий/мл). Следовательно, LOD заявляется при 2000 копий/мл.
6. Мутация OT K219Q связана с одним FN результатом при 6000 копий/мл (из 40 определений в целом) и определена со 100% чувствительностью при вирусной нагрузке 1000 и 2000 копий/мл (12/12). Следовательно, LOD для данной мутации заявляется при 1000 копий/мл.
7. Протеазная мутация M46I связана с одним FN результатом при 2000 копий/мл (из 40 определений) и определена со 100% чувствительностью при 1000 копий/мл и для всех вирусных нагрузок выше 2000 копий/мл. Следовательно, LOD для этой мутации в 40% смеси составляет 1000 копий/мл.
8. Протеазная мутация A71V связана с одним FN результатом при 6000 копий/мл (из 12 определений в целом) и определена со 100% чувствительностью при вирусной нагрузке 1000 и 2000 копий/мл. Следовательно, LOD для этой мутации заявляется при 1000 копий/мл.
9. Протеазная мутация V82S связана с двумя FN результатами при 6000 копий/мл (из 12 определений в целом) и определена со 100% чувствительностью при вирусной

нагрузке 1000 и 2000 копий/мл. Следовательно, LOD для этой мутации заявляется при 1000 копий/мл.

10. Протеазная мутация L90M связана с одним FN результатом при 6000 копий/мл (из 80 определений в целом) и определена со 100% чувствительностью при вирусной нагрузке 1000 и 2000 копий/мл. Следовательно, LOD для этой мутации заявляется при 1000 копий/мл.

Детекция смесей

Система ViroSeq может точно определять:

- 24 мутаций, если они присутствуют в качестве смеси на 40% уровне при 2000 копий/мл
- 11 мутаций, если они присутствуют в качестве смеси на 30% уровне при 2000 копий/мл
- 3 мутации, если они присутствуют в качестве смеси на 20% уровне при 2000 копий/мл

Описание исследования. В данном исследовании одиннадцать рекомбинантных клонов были определены при трех вирусных нагрузках (2000, 50 000 и 750 000 копий/мл) в шести смесях вирусов (100, 80, 60, 40, 30 и 20% мутантов)

Результаты

- При вирусной нагрузке 2000 копий/мл, мутации были определены с >95% чувствительностью при уровнях смеси данных ниже.

Таблица 10. Определение при 2000 копий/мл

Уровень смеси мутанта (%)	Ген обратной транскриптазы	Ген протеазы
20	-	L10R D30N I50V
30	K65R K70R Y181C M184I Y188C T215F K219E/Q	V82F V82S V82T
40	M41L T69D L74V V75I F77L K103N V106A F116Y V118I Y188L M184V L210W T215Y	L10I K20R M36I M46I G48V I54V L63P A71V V82A I84V L90M

Определение конкордантности

Для определения общих тактико-технических данных для аналитической специфичности, интерферирующих субстанций, неточности и воспроизводимости, постановка анализа была оценена с использованием конкордантности последовательностей между тестируемой пробой и ожидаемым (референтным) генотипом. Конкордантность $\geq 95\%$ принималась как хорошая постановка анализа. В определении конкордантности, как ложно отрицательные (ожидаемая мутация не определяемая в тестируемой пробе), так и ложно положительные (определяемые мутации в тестируемой пробе, которые не присутствуют в референтном генотипе) были вычтены из общего счета конкордантности. Счет конкордантности является истинным измерением точности анализа (специфичности и чувствительности). Счет конкордантности был произведен для каждой пробы против референс генотипа для каждого гена. Счет конкордантности RMC определен в Таблице 11.

Таблица 11. Конкордантность с референтой мутацией (RMC)

		Референс Генотип		Итого
		PM+	PM-	
Тестируемый генотип	PM+	a	b	a+b
	PM-	c	d	c+d
	Итого	a+c	b+d	NG

$$RMC = \frac{(a + d) - (b + c)}{N_G}$$

Где:

a = число кодонов, содержащих референтную мутацию (PM) как в референс, так и в тестируемом генотипах.

b = число кодонов, содержащих референтную мутацию, определенную в тестируемом генотипе и не определенную в референс генотипе.

c = число кодонов, содержащих референтную мутацию, определенную в референс генотипе, но не в тестируемом генотипе.

d = число кодонов без референтных мутаций, как определено для референс и тестируемого генотипов.

N_g = общее число возможных мутаций устойчивости, проанализированных в каждом гене.

Аналитическая специфичность

Система ViroSeq способна точно определять смеси генотипов в пробах вируса в присутствии инфекционных агентов, находимых у ВИЧ-1 инфицированных пациентов. Исследование по аналитической специфичности показывает, что присутствие родственных и не родственных ВИЧ-1 вирусов, составляющее примерно пятикратную вирусную нагрузку, не влияет на постановку анализа. Присутствие этих инфекционных агентов не приводило к уровню конкордантности ниже 90% для 72 протестированных проб. Это доказывает то, что ни один из инфекционных вирусов не снижает специфичность системы ViroSeq в плане точности определения специфических мутаций (предварительно перечисленных) в ВИЧ-1, которые дают вирусную устойчивость к лекарствам.

Результаты показывают, что ни один из перечисленных ниже организмов не мешал ни не был детектирован в анализе ViroSeq

Родственные вирусы	Сопутствующие инфекции
HIV-2	Цитомегаловирус
HTLV-1	Вирус Эпштейна-Барра
HTLV-2	Гепатит В
	Гепатит С

Интерферирующие субстанции

Обычно встречающиеся биологические субстанции и ингибиторы обратной транскриптазы и лекарства против нее, которые присутствуют в плазме крови пациентов были протестированы системой ViroSeq на их возможность препятствовать определению мутаций, которые дают вирусную устойчивость. В этом исследовании любая субстанция, которая вызывала конкордантность менее чем 90% между генотипом тестируемой пробы и ожидаемым генотипом, считалась мешающей выполнению анализа.

Результаты свидетельствуют, что обычно встречающиеся биологические субстанции и ингибиторы обратной транскриптазы и лекарства против нее, находящиеся у ВИЧ-1 инфицированных пациентов, не мешают анализу. Они включают:

- Антиретровирусные препараты AZT, ddI, 3TC, d4T, абакавир, невирапин, эфавиренц.
Замечание: Мутации обратной транскриптазы V118I и Q151M были определены в 14 из 16 пробах (88% чувствительности). Все другие мутации имели чувствительность выше чем 94%.
- Жиры (30 мг/мл), билирубин (0.6 мг/мл) и гемоглобин (5 мг/мл)

Точность и воспроизводимость

Система ViroSeq способна воспроизводимо определять мутации специфической лекарственной устойчивости в различных местах определения и с разными операторами, с разными партиями, в пределах разных повторов в анализе и в пределах разных постановок.

Это утверждение подкреплено исследованиями по аналитической неточности и клинической воспроизводимости. Исследование по неточности показывает, что уровень для вариабельности между анализами (%CV) составлял 0.1 – 1.4 % и что уровень вариабельности в пределах анализа составлял 0.1 – 5.3 %. Исследование по клинической воспроизводимости показывает, что система ViroSeq может воспроизводимо определять специфические мутации, которые дают лекарственную устойчивость в пробах ВИЧ-1 инфицированных пациентов с низкой вирусной нагрузкой (1800 – 10 500 копий/мл), когда мутации составляли 40% или более квазивидов с CV <0.1%, что гораздо ниже уровня значимости (> 5%).

Исследование неточности

В исследование неточности проверяли шесть смесей мутант/дикий тип при вирусной нагрузке 2000 копий/мл и уровне смеси 40% в дубликатах в десяти постановках для оценки вариабельности в системе генотипирования ViroSeq HIV-1 между постановками (см результаты в таблице 12 ниже).

Таблица 12. Оценка коэффициента вариации по рекомбинантному вирусу и гену

Мутантный вирус	Ген	%CV	
		От опыта к опыту	В пределах опыта
GT-4	ОТ	<0.1	2.6
	Протеаза	<0.1	<0.1
MC-1	ОТ	<0.1	3.7
	Протеаза	<0.1	1.8
MC-2	ОТ	<0.1	2.3
	Протеаза	<0.1	2.2
MC-5	ОТ	1.4	1.6
	Протеаза	<0.1	<0.1
MC-6	ОТ	<0.1	10.9*
	Протеаза	<0.1	3.3
MC-7	ОТ	<0.1	5.3
	Протеаза	<0.1	2.2

*Это значение является результатом одной пробы, в которой только 3 из 13 мутаций были определены. Для этой пробы, выход ОТ-ПЦР не отвечал требованиям спецификации – он был примерно 10 нг, что меньше чем требуемый минимум выхода в ОТ-ПЦР в 20 нг, необходимый для реакций секвенирования.

Данные таблицы 12 показывают, что %CV от опыта к опыту находится в пределах <0.1-1.4. Пять из 6%CV составляют менее 0.1, и один - 1.4. %CV в пределах опыта находится в рамках <0.1-5.3.

Результаты этого исследования подтверждают заявление Селеры о том, что система генотипирования ViroSeq HIV-1 имеет незначимую вариабельность от опыта к опыту ($\leq 5\%$).

Исследование клинической воспроизводимости

Клиническая воспроизводимость системы генотипирования ViroSeq HIV-1 была оценена в мульти-центровом исследовании для определения вариабельности анализа в зависимости от места проведения и разных лотов. В трех местах тестировали 11 проб пациентов с вирусной нагрузкой в пределах 1800 – 10 500 копий/мл. Каждая из этих 11 проб была протестирована в дубликate с тремя разными лотами (наборами), что давало 18 значений данных на образец (3 места x 3 лота x 2 реплики). Определение всех мутаций присутствующих в образце было оценено и сравнено для установления вариабельности (%CV). Результаты в таблице 13 показывают, что вариации в зависимости от места проведения и номера партии пренебрежимо малы для системы ViroSeq.

Таблица 13. Результаты по клинической воспроизводимости

Источник вариаций	Диапазон % CV	
	ОТ	Протеаза
От места к месту	<0.1	<0.1
От лота к лоту	<0.1	<0.1
Внутри анализа	<0.1	<0.1 – 4.7*
Итого	<0.1	<0.1

* Для большинства проанализированных проб, %CV внутри анализа был <0.1. Две пробы имели значения 1.3 и 4.7.

Результаты этого исследования подтверждают заявление Селеры о том, что система генотипирования ViroSeq HIV-1 демонстрирует не значимую (<5%) вариабельность от места к месту и от лота к лоту.

Степени успеха секвенирования и ОТ-ПЦР

Система ViroSeq способна успешно генотипировать значительную часть ($\geq 98\%$) проб популяции – мишени, если доступны достаточные количества продукта ОТ-ПЦР.

Это заявление подтверждается исследованием по успешности секвенирования, которое дает степень успеха 100% для получения адекватного продукта ОТ-ПЦР (≥ 20 нг/5 мкл) и степень успеха 99% для генерации генотипа в пробах 100 взрослых инфицированных ВИЧ-1 пациентов. К тому же, педиатрическое исследование ACTG 377 демонстрирует степень успеха 98% для получения адекватного ОТ-ПЦР продукта и генерацию генотипа в 196 пробах из педиатрической популяции, инфицированной ВИЧ-1 ([16]). Проанализированные пробы имели вирусную нагрузку в пределах от 1084 до $> 750\,000$ копий/мл.

Сто образцов от взрослых ВИЧ-1 инфицированных пациентов были проскринированы для получения проб, дающих представление о географической кросс секции, состоящей из различных вирусных нагрузок и мутаций устойчивости. Пятьдесят из этих проб были сгруппированы в категорию с низкой вирусной нагрузкой (1800-10 500 копий/мл) и пятьдесят – в категорию с высокой вирусной нагрузкой (свыше 10 500 копий/мл).

Для исследования PACTG 377, три лаборатории (Johns Hopkins, UCLA и New Jersey Medical & Dental School) и три оператора протестировали 196 проб, которые имели вирусную нагрузку > 1084 копий/мл. Результаты исследования опубликованы в Journal of Clinical Microbiology ([16]) выборочные данные представлены ниже в таблицах 14 и 15.

Таблица 14. Пробы PACTCG 377, использованные для анализа (педиатрические)

Лаборатория	1	2	3	Сумма
Число проб	65	66	65	196
Пределы объема (мл)	0.1-0.5	0.1-0.1	0.05-0.5	0.05-0.5
Средний объем (мл)	0.42	0.4	0.43	0.42
Число проб < 0.5 мл	29/65 (45%)	30/66 (45%)	24/65 (37%)	84/196 (43%)
Диапазон вирусной нагрузки (копий/мл)	1084-1 794 664	1205-750 000	1370-3 484 991	1084-3 484 991

Таблица 15. Степень успеха для ОТ-ПЦР и секвенирования

	Низкая вирусная нагрузка	Высокая вирусная нагрузка	PACTG 377
Успех ПЦР	50/50 (100%)	50/50 (100%)	192/196 (98%)
Успех секвенирования	49/50 (98%)	50/50 (100%)	192/192 (100%)

Результаты этого анализа показывают, что система генотипирования ViroSeq HIV-1 способна успешно генотипировать >98% протестированных клинических проб с вирусной нагрузкой в пределах от 1084 до 750 000 копий/мл.

Детекция смеси в пробах пациентов

Система ViroSeq способна безошибочно определять специфические мутации лекарственной устойчивости в клинических пробах плазмы, взятых на ЭДТА в диапазоне низкой вирусной нагрузки (1800-10 500 копий/мл) и при пределе вирусной смеси (≥40% мутантных форм).

Это заявление подтверждается исследованием клинической валидности, в котором сравнивался процент мутаций, найденных в каждой пробе при клонировании ПЦР продукта против мутаций, детектированных путем секвенирования популяции при использовании системы ViroSeq. Это исследование показывает, что мутации, представляющие 40% и более от квазивидов в пробах с низкой вирусной нагрузкой (1800-10500 копий/мл) могут быть определены в трех клинических лабораториях воспроизводимо с уровнем конкордантности >98% у нижнего предела доверительного интервала 95%.

Таблица 16. Мутации, детектируемые в данном исследовании, включали:

В обратной транскриптазе							
M41L	E44D	A62V	K65R	D67N	S68G	T69D	K70R
L74V	V75I	F77L	L100I	K101E	K103N	V108I	Y115F
F116Y	V118I	Q151M	Y181C	Y181I	M184V	G190A	G190S
L210W	T215Y	T215F	K219Q	K219E			
В протеазе							
L10I	L10F	L10V	K20M	K20R	D30N	V32I	L33F
M36I	M46I	M46L	I47V	G48V	F53L	I54V	L63P
A71I	A71T	A71V	G73S	V77I	V82A	V82T	I84V
N88D	L90M						

Для этого исследования пробы с низкой вирусной нагрузкой были выбраны случайным образом согласно возрасту (более 18), полу, истории болезни и схеме лечения. Пробы были собраны проспективно от ВИЧ-1 инфицированных пациентов из разных географических зон популяции-мишени. Определенные мутации и их частота считаются репрезентативными для ВИЧ-инфицированной популяции-мишени. В пределах данной популяции, способность системы ViroSeq определять избранный список мутаций лекарственной устойчивости равным образом был высок для всех определенных мутаций. В некоторых случаях анализ был способен выявить мутации, присутствующие в количестве ниже предела в 40%, хотя это не было единообразно по всем местам определения или для всех мутаций.

Контроль качества данных для данного исследования клинической валидности состоял из филогенетического анализа 300 проб (50 образцов x по 6 повторов каждый). Филогенетическое древо, которое было построено, показало отсутствие наличия остаточной контаминации ампликонами ПЦР. Это исследование показывает, что AmpErase® урацил – N – гликозилаза и рекомендуемая процедура герметизации эффективно контролируют контаминацию ПЦР.

Данные были также проанализированы для точности определения оснований. Таблица 17 ниже перечисляет ID образца, точность определения оснований, число клонов,

использованных для генерации референс-последовательности и мутации, определяемые клонированием, которые составляют $\geq 40\%$ всей популяции.

Таблица 17. Детекция мутаций

ID пациента	Точность определения оснований	Число секвенированных клонов	Мутации ОТ в пробе	Мутации протеазы в пробе
023	99.97	41	M41L D67N K101E K103N Y118I Y181C M184V G190A L210W T215Y	L10I M36I M46L F53L L63P A71V V82A
028	99.97	45	M41L M184V L210W T215Y	L10I M46L I54V L63P V82A
029	99.92	50	M41L D67N K70R L74V L100I Y181I G190S T215F K219Q	L10I G48I I54V L63P A71I V82A L90M
031	99.97	45	M184V	D30N L63P
037	99.97	42	Her	L63P
038	100	38	Her	L10I A71T
039	100	32	A62V V75I F77L Y115F F116Y Q151M Y181C M184V	L10I K20M M36I F53L I54V L63P A71T V82A
056	99.92	47	Her	Her
057	99.98	43	L74V L100I K103N M184V	Her
059	100	50	Her	L63P V77I
075	99.97	40	K103N M184V	M36I L63P A71T

082	99.98	39	D67N K103N	K20R D30N M36I A71V V77I N88D
086	99.93	40	M41L L74V Y181C T215Y	L10I M36I M46I L63P A71T I84V L90M
089	99.96	40	K103N M184V	Her
093	100	36	Her	A71T V77I
098	99.92	40	Her	L63P
099	99.97	42	Her	L63P
100	99.92	41	Her	L63P
102	99.96	30	Her	M36I
105	99.97	44	Her	L10V
112	99.93	48	M184V	L10V L63P
114	99.98	41	M184V	L10I M63I L63P A71V G73S L90M
124	99.98	43	M41L M184V T215Y	V32I L33F M46I I47V L63P A71V V77I L90M
125	99.89	42	Her	L10V L63P
132	99.73	46	S68G K70R Y181C T215Y K219E	L10I I54V L63P A71V V82T L90M
134	100	42	K65R S68G K70R V75I F77L F116Y Q151M M184V	L10I K20R M36I G48V L90M
139	99.97	38	M41L S68G M184V T215Y	M36I L63P A71T

208	100	34	M41L E44D A62V D67N L100I M184V T215Y	M36I L63P L90M
218	99.97	41	M41L V75I K103N V108I L210W T215Y	L10I M36I L63P A71V G73S L90M
220	99.98	40	M41L E44D D67N V118I M184V L210W T215Y	L10F L33F L63P A71T I84V L90M
221	100	40	M41L E44D D67N K70R K103N V108I V118I Q151M Y181C L210W T215Y K219E	L10I K20R L33F M36I M46L I54V L63P A71V V82A L90M
222	99.84	43	A62V V75I Y115F F116Y Q151M	M36I L63P A71T L90M
223	99.97	40	Her	V77I
225	100	40	M41L S68G K103N V108I V118I M184V L210W T215Y K219E	L63P
22535	99.92	36	Her	M36I L63P A71V V77I
22541	99.96	40	D67N K70R M184V K219Q	M36I

22579	99.98	47	S68G K103N M184V L210W T215Y	L63P
22580	99.94	44	M41L D67N K70R K103N V118I M184V T215Y K219E	L10I K20R M36I M46L G48V I54T V82A
22586	100	43	M41L E44D D67N T69D K103N Y181C L210W T215F/Y	L10I M46I L63P A71V V77I I84V L90M
22594	99.98	40	K70R V108I Y181C M184V K219Q	Her
22605	100	43	Her	Her
22606	99.9	43	T69D	L63P V77I
22613	99.98	37	M184V	L63P A71V V77I L90M
22615	99.97	40	Her	Her
241	99.98	45	M41L M184V T215Y	L10V D30N M36I L63P A71T V77I N88D
250	99.97	41	M41L M184V T215Y	L10F D30N L63P V77I N88D
252	98.76	41	M184V	V77I
317	99.97	41	M184V	M46I V77I I84V L90M
323	99.82	42	M41L L74V K103N V118I G190A T215F	L10I M46I L63P A71V V77I V82T L90M

Общая средняя конкордантность этих результатов была 97-99% по трем сайтам для протеазного гена и 99% для всех сайтов гена обратной транскриптазы. Точность определения оснований для клинических проб была более 98.5%.

Исследование клинической пригодности

Программное обеспечение системы ViroSeq использует мутации лекарственной устойчивости для создания оценок лекарственной устойчивости с доказанной клинической пригодностью.

Это заявление поддерживается пробами ресеквенирования из исследования GART при использовании системы ViroSeq. В исследовании GART предварительно уже была продемонстрирована клиническая польза нескольких мутаций в ОТ и протеазе, перечисленных в таблице 18 ([12]). Дополнительные мутации были включены в основанный на правилах интерпретационный алгоритм исходя из последних литературных данных.

Таблица 18. Дополнительные мутации, определенные в исследовании GART, но не в списке проанализированных мутаций первоначального исследования

В обратной транскриптазе							
M41L	A62V	K65R	D67N	T69D	K70R	L74V	V75I
V75T	F77L	K103N	V106A	F116Y	Q151M	Y181C	Y181I
M184V	Y188C	L210W	T215Y	T215F	K219Q	K219E	
В протеазе							
L10I	L10R	L10V	K20M	K20R	L24I	D30N	M36I
M36L	M46I	M46L	G48V	I54V	L63P	A71T	A71V
V77I	V82A	V82F	V82T	I84V	N88D	L90M	

Исследование по тестированию антиретровирусной устойчивости генотипированием (Genotyping Antiretroviral Resistance Testing, GART) было одним из основных испытаний клинической пригодности. Оно доказало, что если врачи имели доступ к данным генотипирования до перемещения в терапии, они выносили лучшие решения по лечению и улучшали краткосрочный ответ пациента на терапию ([16]). В этом исследовании было два направления – одно (GART) давало врачам доступ к данным генотипирования и панели экспертных рекомендаций по лечению, основанной на тех результатах, тогда как другое (не GART) не давало доступа к этой информации до лечения. Эти два направления были сравнены в отношении среднего снижения вирусной нагрузки на 4, 8 и 12 неделях. Направление GART показало значительное снижение вирусной нагрузки по сравнению с другим направлением, особенно когда лечащие врачи строго придерживались экспертных советов по лечению. Благодаря данному протоколу и другим, подобным ему, тестирование устойчивости стало стандартом в медицинской практике при создании терапевтической стратегии для пациентов с неудачной терапией. Для того чтобы продемонстрировать то, что наш анализ определяет те же самые мутации устойчивости, что и замороженный анализ, использованный в исследовании GART, мы получили все оригинальные пробы 154 пациентов из исследования GART вместе с оригинальными результатами по секвенированию исследования GART. Таблица 19 показывает, что сравнение данных генотипирования демонстрирует высокую конкордантность.

Таблица 19. Статистика проб на копкордантность с GART по гену

	Ген	
	OT	Протеаза
Среднее	0.969	0.954
Медiana	1.000	1.000
Стандартное отклонение	0.066	0.086
Стандартная ошибка среднего	0.005	0.007
Минимум	0.652	0.538
Максимум	1.000	1.000

Конкордантность между доморощенным анализом GART и системой генотипирования ViroSeq HIV-1 вполне хорошая (> 95%), достигая уровня, необходимого для требований клинической пригодности системы ViroSeq. К тому же, большинство проб было успешно проанализировано (149/153, или 97%), что позволяет применить оригинальные заключения, выведенные из анализа клинической пригодности, без повторного анализа.

Следовательно, исследование, приведенное выше, подтверждает заявление Селеры о том, что клиническая пригодность доказана для мутаций, определенных и включенных в анализ исследования GART, при детекции системой генотипирования ViroSeq HIV-1.

Эксплуатационные качества программного обеспечения

Только обученные операторы допускаются к работе с программным обеспечением ViroSeq.

! WARNING В редких случаях вставки могут приводить к неточному отчету по устойчивости к препаратам.

1. Программное обеспечение ViroSeq не предназначено для разрешения ситуаций когда присутствуют два доминантных вида вируса и один не имеет вставок, тогда как другой имеет. Эта ситуация легко выявляется при использовании программного обеспечения ViroSeq и описывается на стр.3-15 руководства по программному обеспечению (ViroSeq Software Manual)
2. Использование секвенирования гена при генотипировании вирусов со вставками может дать неединственные решения для локализаций вставок и существования мутаций в непосредственной близости от вставки. Это ограничение проиллюстрировано и обсуждено в разделе «Мутации вставки» на стр. 3-15 руководства по программному обеспечению (ViroSeq Software Manual)

Программное обеспечение системы ViroSeq способно определять все мутации лекарственной устойчивости (предварительно перечисленные), если они присутствуют в индивидуальной пробе пациента.

Исследования валидации программного обеспечения документируют способность программного обеспечения читать последовательность с электрофореграммы, узнавать мутации, которые дают устойчивость и сообщать о них в виде электронных файлов и Отчета по Антиретровирусной Лекарственной Устойчивости.

Программное обеспечение системы ViroSeq использует мутации лекарственной устойчивости для создания оценок лекарственной устойчивости с доказанной клинической пользой (пригодностью).

Это подкреплено исследованием GART ([12]), которое доказывает клиническую пригодность для мутаций, определенных в этом исследовании (утверждено Эпплайед Байосистемз/Селерой после сравнительного исследования GART: Эпплайед Байосистемз/Селера, которое показало высокую конкордантность результатов), также как основанная на литературных данных оправданность клинической пригодности для дополнительных мутаций, используемых в основанном на правилах алгоритме.

Программное обеспечение системы ViroSeq генерирует конечный Отчет по Антиретровирусной Лекарственной Устойчивости, который точно следует основанному на правилах интерпретационному алгоритму. Отчет может быть использован врачом как оговорено в разделе «Предназначение».

Точность 100 отчетов была проверена путем ручной инспекции для подтверждения того, что мутации, перечисленные в отчете, генерируют правильную категорию устойчивости при использовании правил, определенных для алгоритма. Эти правила были разработаны основываясь на отчетах, опубликованных в литературе, и на консультациях с экспертами в этой области.

Библиография

Цитируемые ссылки:

1. Barre-Sinoussi, F., et al. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
2. Popovic, M., et al. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500.
3. Hammer, S.M., et al. 1997. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *N Engl J Med* 337: 725-733.
4. Palella, F.J., Jr., et al. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 338: 853-860.
5. Furtado, M.R., et al. 1999. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 340: 1614-1622.
6. Zhang, L., et al. 1999. Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 340: 1605-1613.
7. Condra, J.H., et al. 1995. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 374: 569-571.
8. Shafer, R.W., et al. 1998. Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations and multidrug resistance of HIV-1 isolates from heavily treated patients. *Ann Intern Med* 128: 906-911.
9. Descamps, D., et al. 2000. Mechanisms of virologic failure in previously untreated HIV-infected patients from a trial of induction-maintenance therapy. *Jama* 283: 205-211.
10. Havlir, D.V., et al. 2000. Drug susceptibility in HIV infection after viral rebound in patients receiving indinavir-containing regimens. *Jama* 283: 229-234.
11. Hirsch, M.S., et al. 2000. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Jama* 283: 2417-2426.
12. Baxter, J.D., et al. 2000. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. *Aids* 14: F83-93.
13. Durant, J., et al. 1999. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomized controlled trial. *Lancet* 353: 2195-2199.
14. Zolopa, A.R., et al. 1999. HIV-1 genotypic resistance patterns predict response to saquinavir-ritonavir therapy in patients in whom previous protease inhibitor therapy had failed. *Ann Intern Med* 131: 813-821.
15. Mukaide, M., et al. 2000. Evaluation of Viroseq-HIV version 2 for HIV drug resistance. *Jpn J Infect Dis* 53: 203-205.
16. Cunningham, S., et al. 2001. Performance of the applied biosystems viroseq human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) genotyping system for sequence-based analysis of hiv-1 in pediatric plasma samples. *J Clin Microbiol* 39: 1254-1257.
17. Longo, M.C., et al. 1990. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93:125-128.
18. Watson, J.D., et al. 1987. *Molecular Biology of the Gene*, 4th ed., Benjamin-Cummings. Menlo Park, CA.
19. Sanger, F., et al. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 74:5463-5467.
20. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Stock no. 017-040-00547-4. U.S. Department of Health and Human Services.
21. Protection of Laboratory Workers from Infections Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue, specifically dealing with all aspects of this issue. NCCLS, M29-T.
22. Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens; Final Rule. 29 CFR 1910.1030.

23. International Air Transportation Association Dangerous Goods Regulations, 33rd Edition, 1992, p 313.
24. Folks, T.M., et al. 1986. Biological and biochemical characterization of a cloned Leu-3-cell surviving infection with the acquired immune deficiency syndrome retrovirus. *J Exp Med* 164(1):280-290.
25. Larder, B.A., et al. 1995. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* 269:696-699.
26. DeGruttola, V., et al. 2000. The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. *Antivir Ther* 5(1):41-48
27. Demeter, L., and Haubrich, R. 2001. International perspectives on antiretroviral resistance. Phenotypic and genotypic resistance assays: Methodology, reliability, and interpretations. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26, suppl 1:S3-9.
28. Deeks et al. 2001. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* 344:472-480.
29. Harrigan, P.R., and Cote, H.C. 2000. Clinical utility of testing human immunodeficiency virus for drug resistance. *Clin Infect Dis* 30, Suppl 2:S117-122.
30. Pellegrin, I., et al. 1999. Emergence of zidovudine and multidrug-resistance mutations in the HIV-1 reverse Transcriptase gene in therapy-naïve patients receiving stavudine plus didanosine combination therapy. SRADI Group. *Aids* 13:1705-1709.
31. Winters, M.A., et al. 1998. A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest* 102:1769-1775.
32. Lukashov, V., et al. July 2000. Selection by AZT and rapid replacement in the absence of drugs of HIV-1 resistant to multiple nucleoside analogs. TuOrA351. Abstract, XII International AIDS conference.
33. Richman, D.D. 1998. How drug resistance arises. *Scientific American*, July:88-89.
34. Moyle, G.I. 1997. Viral resistance patterns selected by antiretroviral drugs and their potential to guide treatment choice. *Exp Opin Invest Drugs* 6(8):943-965.
35. Guidance for Industry, Premarket Notifications [510(k)s for In Vitro HIV Drug Resistance Genotype Assays: Special Controls. Draft Guidance, CBER, August 2001.