«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель директора по эпидемиологии – Врио директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

_____ В. Г. Акимкин

«16» февраля 2018 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) к антиретровирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим массовым параллельным секвенированием продуктов амплификации

«АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS»

АмплиСенс®

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 5
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 6
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 7
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ 8
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 10
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА.. 15
СОСТАВ 16
ЭТАП 1. ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ 21
ЭТАП 2. РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ. I РАУНД 24
ЭТАП 3. АМПЛИФИКАЦИЯ. II РАУНД 26
ЭТАП 4. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ 27
А. Электрофоретическая детекция 27
Б. Учет результатов 29
В. Оценка концентрации ДНК в исследуемых ПЦР-фрагментах 31
Г. Выравнивание концентрации 32
Д. Подготовка ПЦР-продукта к очистке 33
ЭТАП 5. ОЧИСТКА ПЦР-ПРОДУКТА 34
ЭТАП 6. ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОБ 36
ЭТАП 7. ТАГМЕНТАЦИЯ ДНК 37
ЭТАП 8. ОЧИСТКА РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ ПОСЛЕ РЕАКЦИИ ТАГМЕНТАЦИИ 38
ЭТАП 9. АМПЛИФИКАЦИЯ И ИНДЕКСАЦИЯ ДНК-БИБЛИОТЕК 39
ЭТАП 10. НОРМАЛИЗАЦИЯ ДНК-БИБЛИОТЕК 42
ЭТАП 11. ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ В СМЕШАННОМ ОБРАЗЦЕ ПОСЛЕ НОРМАЛИЗАЦИИ С ПОМОЩЬЮ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 44
ЭТАП 12. ДЕНАТУРАЦИЯ БИБЛИОТЕК 47
ЭТАП 13. СЕКВЕНИРОВАНИЕ. ПОДГОТОВКА КАРТРИДЖА И ПРОТОЧНОЙ ЯЧЕЙКИ MiSeq К РАБОТЕ. ЗАПУСК СЕКВЕНИРОВАНИЯ 49
ЭТАП 14. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 49
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 51
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 53

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения

ВИЧ-1	- вирус иммунодефицита человека 1 типа
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК
ОТ-ПЦР	- полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПКО	- положительный контрольный образец
ПК	- положительный контроль экстракции
п.н.	- пар нуклеотидов
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	- Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты потребителей и благополучия человека
HIV	- human immunodeficiency virus (вирус иммунодефицита человека)
pro	- protease (ген протеазы)
rev	- reverse transcriptase (ген обратной транскриптазы (ревертазы))
int	- integrase (ген интегразы)
env	- envelope (ген белка оболочки)
NGS	- next-generation sequencing (секвенирование нового (следующего) поколения); синонимы – массовое параллельное секвенирование, высокопроизводительное секвенирование

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов **«АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS»** предназначен для выявления мутаций устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам в гене протеазы (*pro*), гене обратной транскриптазы (*rev*), гене интегразы (*int*), гене белка gp41 ВИЧ, а также определения тропизма ВИЧ в биологическом материале (плазма крови) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации. Выявление мутаций устойчивости ВИЧ с использованием данного набора может проводиться для ВИЧ-1 генетической группы М (субтипы A, B, G, циркулирующие рекомбинантные формы 02_AG, 03_AB).

Для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ данный набор реагентов рекомендуется использовать, если концентрация РНК ВИЧ в плазме крови более 1000 копий/мл.

Один набор рассчитан на тестирование 48 биологических образцов.

ВНИМАНИЕ! Набор реагентов **«АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS»** рекомендован для проведения исследования с использованием прибора для секвенирования

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

(секвенатора нового поколения) MiSeq (Illumina Inc., США) или аналогичного.

ВНИМАНИЕ! В соответствии с федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» ПЦР-исследование является одним из методов всестороннего обследования пациента, на основании которых лечащий врач устанавливает диагноз и выбирает мероприятия по лечению пациента.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение мутаций устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам и тропизма ВИЧ с помощью набора реагентов **«АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS»** включает следующие стадии (этапы):

Стадии экстракции РНК и получения ПЦР-продукта:

1. Экстракция РНК из биологического материала.
2. ОТ-ПЦР (первый раунд ПЦР).
3. Второй раунд ПЦР.
4. Электрофоретическая детекция. Учет результатов. Оценка концентрации в исследуемых ПЦР-фрагментах. Выравнивание концентрации. Подготовка ПЦР-продукта к очистке.

Стадии (этапы) подготовки к секвенированию:

5. Очистка ПЦР-продукта.
6. Измерение концентрации проб.
7. Тагментация ДНК.
8. Очистка реакционной смеси после реакции тагментации.
9. Амплификация и индексация ДНК-библиотек.
10. Нормализация ДНК-библиотек.
11. Оценка концентрации в смешанном образце с помощью амплификации с детекцией в режиме «реального времени».
12. Денатурация библиотек.

Стадии (этапы) секвенирование, анализ и интерпретация результатов:

13. Секвенирование нового поколения включает следующие стадии:
    а) подготовка картриджа и проточной ячейки MiSeq к работе;
    б) автоматическая детекция нуклеотидной последовательности с помощью прибора для секвенирования (секвенатора нового поколения) MiSeq (Illumina Inc., США) или аналогичного.
14. Анализ и интерпретация результатов. Обработка и клиническая интерпретация полученных результатов с помощью специального программного обеспечения.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 3 формах комплектации:

Форма комплектации	Комплект реагентов/реагент	Кол-во, шт.
Форма 1	«РИБО-золь-Е»	1
	«Комплект для стабилизации РНК»	1
	«ОТ-ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS»	1
	«ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS»	1
	«ЭФ NGS»	2
	«Комплект для подготовки библиотек»	1
	«Комплект для индексации библиотек»	1
	«Комплект для нормализации и оценки качества библиотек»	1
	«Комплект для оценки концентрации библиотек»	1
	«Комплект для массового параллельного секвенирования, v2-500»	1
	Комплект программного обеспечения «ДЕОНА NGS»	1
Форма 2	«РИБО-золь-Е»	1
	«Комплект для стабилизации РНК»	1
	«ОТ-ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS»	1
	«ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS»	1
	«ЭФ NGS»	2
	«Комплект для подготовки библиотек»	1
	«Комплект для индексации библиотек»	1
	«Комплект для нормализации и оценки качества библиотек»	1
	«Комплект для оценки концентрации библиотек»	1
	«Комплект для массового параллельного секвенирования, v3-600»	1
	Комплект программного обеспечения «ДЕОНА NGS»	1
Форма 3	«РИБО-золь-Е»	1
	«Комплект для стабилизации РНК»	1
	«ОТ-ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS»	1
	«ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS»	1
	«ЭФ NGS»	2

Формы комплектации 1 и 2 предназначены для проведения полного исследования и включают реагенты для экстракции нуклеиновых кислот из биологического материала, реакции обратной транскрипции РНК и амплификации методом ПЦР, электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле, проведения очистки продуктов амплификации, для подготовки ДНК-библиотек, постановки реакции секвенирования, биоинформационного анализа полученных данных с выдачей формализованного отчёта о наличии лекарственной устойчивости к антиретровирусной терапии.

Форма комплектации 3 предназначена для получения фрагментов ДНК, содержащих кодирующую область генома ВИЧ, и включает реагенты для экстракции

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

нуклеиновых кислот из биологического материала, реакции обратной транскрипции РНК и амплификации методом ПЦР и электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле. Для проведения полного исследования необходимо дополнительно использовать комплекты реагентов для подготовки ДНК-библиотек и постановки реакции секвенирования рекомендованный производителем используемого секвенатора.

ВНИМАНИЕ! Комплекты, рекомендованные производителем используемого секвенатора, следует использовать в соответствии с инструкциями производителя. ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора не дает рекомендаций по использованию коммерческих продуктов.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность

Таблица 1

[redacted]			
Плазма крови	1000	«РИБО-золь-Е»	1000

Данная чувствительность достигается при соблюдении правил, указанных в разделах «Взятие, транспортирование и хранение исследуемого материала» и «Подготовка исследуемого материала к экстракции РНК».

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: *HAV* (вирус гепатита А), *HBV* (вирус гепатита В), *HCV* (вирус гепатита С), *HDV* (вирус гепатита D), *CMV* (цитомегаловирус), *EBV* (вирус Эпштейн-Барра), *HSV*1, *HSV*2 (вирус простого герпеса 1 и 2 типов), *VZV* (вирус ветряной оспы), *HHV*6 (вирус герпеса 6 типа), *Parvovirus* B19, *TBEV* (вирус клещевого энцефалита), *WNV* (вирус Западного Нила), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, а также геномной ДНК человека.

При тестировании образцов ДНК/РНК вышеперечисленных организмов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 2

Результаты совместного тестирования набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS» и набора сравнения

Тип исследования	Результаты применения набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS»		Результаты применения референтного метода	
			Положительных	Отрицательных
Лекарственная устойчивость ВИЧ	Всего исследовано 52070 точек мутагенеза	**Положительных**[4]	582	0
		Отрицательных[5]	0	51488
Тропизм ВИЧ	Всего исследовано 142 образца	**Положительных**[6]	22	0
		Отрицательных[7]	0	120

Были использованы 254 образца крови от пациентов с ВИЧ-инфекцией, имеющих различный опыт приема АРВ препаратов: 1) не имеющие опыта приема АРВ препаратов (134 образца); 2) имеющие опыт приема АРВ препаратов (120 образцов). Среди пациентов, принимающих АРВ препараты, 27 имели опыт смены терапии, 93 не имели опыта смены терапии. В каждом образце были исследованы 205 точек возможного появления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ, таким образом, общее количество исследованных точек составило 52070.

Таблица 3

Диагностические характеристики набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS»

[redacted]		
Лекарственная устойчивость ВИЧ	99,6-100	99,9-100
Тропизм ВИЧ	90,1-100	98,1-100

[1] В качестве набора сравнения использовался набор реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq» (РУ № ФСР 2008/02414 от 26.06.2017)

[2] Точки мутагенеза, в которых при анализе лекарственной устойчивости были выявлены мутации, ассоциированные с возникновением лекарственной устойчивости ВИЧ, или образцы, в которых выявлен тропизм вируса к CXCR4-корецепторам.

[3] Точки мутагенеза, в которых при анализе лекарственной устойчивости не были выявлены мутации, ассоциированные с возникновением лекарственной устойчивости ВИЧ, или образцы, в которых выявлен тропизм вируса к не-CXCR4-корецепторам.

[4] Точки мутагенеза, в которых были выявлены мутации, ассоциированные с возникновением лекарственной устойчивости ВИЧ.

[5] Точки мутагенеза, в которых не были выявлены мутации, ассоциированные с возникновением лекарственной устойчивости ВИЧ.

[6] Образцы, в которых выявлен тропизм вируса к CXCR4-корецепторам.

[7] Образцы, в которых выявлен тропизм вируса к не-CXCR4-корецепторам.

[8] Относительно использованного набора сравнения.

[9] Относительно использованного набора сравнения.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ И СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции (зона 1), продолжать в Зонах Амплификации (зона 2) и Детекции (зона 3). Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, включая буфер и гели, упаковку, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! При удалении отходов после амплификации (пробирок, содержащих продукты ПЦР) недопустимо открывание пробирок и разбрызгивание содержимого, поскольку это может привести к контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром[10]. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- При работе с включенным трансиллюминатором пользоваться защитным экраном или защитной маской.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

[10] Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Взятие исследуемого материала

1. Система вакуумного забора крови (например, Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH («Грейнер Био-Уан»), Австрия, или аналогичная).
2. Центрифуга медицинская с принадлежностями (например, MPW Med.instruments Spółdzielnia Pracy («МПВ Мед.инструментс Сполдзиелния Праци»), Польша).

ЗОНА 1

Экстракция ДНК/РНК из исследуемого материала

3. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 мкл, до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
7. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
8. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
9. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g с охлаждением (например, MIKRO 220R,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Германия, или аналогичная).

10. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
11. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
12. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
13. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
14. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
15. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
16. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

ЗОНА 2

Обратная транскрипция и I раунд амплификации

17. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 0,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
18. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
19. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
20. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
21. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
22. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
23. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
24. Программируемый амплификатор (например, MaxyGene Gradient (Axygen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США и другие рекомендованные Производителем).
25. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
26. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
27. Емкость для сброса наконечников.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

II раунд амплификации (nested-ПЦР)

28. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 0,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные) для приготовления реакционной смеси.
29. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл с плоской крышкой (в зависимости от модели используемого амплификатора) (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
30. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
31. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл (в зависимости от типа используемых пробирок) (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
32. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
33. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
34. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
35. Программируемый амплификатор (например, MaxyGene Gradient (Axygen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США и другие рекомендованные Производителем).
36. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
37. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
38. Емкость для сброса наконечников.

ЗОНА 3

Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле

39. Камера для горизонтального электрофореза объёмом не более 400 мл (например, SE-2, «Хеликон», Россия).
40. Источник постоянного тока с напряжением 150 – 460 В (например, «Эльф-4», «ДНК-Технология», Россия).
41. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Россия).
42. Гель-документирующая система GelDoc-It (например, UVP, LLC. («ЮВиПи, ЛЛС»), США).
43. Система фильтрации и очистки воды качества MilliQ (например, «МИЛЛИПОР», Австрия).
44. Микроволновая печь для плавления агарозы.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

45. Колба коническая из термостойкого стекла (ГОСТ 21400-75) для плавления агарозы на 250 мл.
46. Мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770-74).
47. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (например, Axygen, Inc., («Эксиджен, Инк»), США или аналогичные).
48. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
49. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный)
50. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
51. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
52. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.
53. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
54. Емкость для сброса наконечников.

ЗОНА 3

Подготовка к секвенированию

55. Оптические 96-луночные реакционные планшеты (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
56. Оптические липкие крышки (например, например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк») США).
57. Одноразовые полипропиленовые пробирки завинчивающиеся или плотно закрывающиеся объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
58. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, 100 и 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
59. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
60. Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл диаметром 12 мм.
61. Магнитный штатив для 96-луночных планшетов (например, DynaMag™-96 Bottom, Thermo Fisher Scientific Inc., США).
62. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

63. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
64. Центрифуга с ротором для планшетов до 2 тыс g. (например, центрифуга 5804 с ротором A-2-DWP, Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).
65. Шейкер для 96-луночных планшетов, (например, мини-шейкер PSU-2T, SIA Biosan, Латвия).
66. Автоматические дозаторы переменного объема, в том числе многоканальные (на 8 каналов) (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
67. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
68. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
69. Емкость для сброса наконечников.

<u>При измерение концентрации проб</u>

70. Спектрофотометр со специализированными кюветами для работы в УФ-диапазоне или один из приборов NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., США), Picodrop (Picodrop Limited, Великобритания).
71. Флуориметр, например, Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay System или аналогичный.

<u>При тагментации и амплификации ДНК-библиотек</u>

72. Программируемый амплификатор, адаптированный для пробирок 0,2 мл и 96-луночные планшеты (например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), PalmCycler (Corbett Research, Австралия)).

<u>При оценки качества ДНК-библиотек</u>

73. Флюориметр (например, Qubit 3.0 (2.0) Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., США), NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., США)).
74. Биоанализатор (например, Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США)).
75. Программируемый амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», имеющий 2 или более независимых каналов флуоресцентной детекции (например, Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH («Киаген ГмбХ»), Германия), CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. («Био-Рад Лабораториз, Инк.»), США) и другие рекомендованные Производителем).

Проведение реакции секвенирования, автоматическая детекция нуклеотидной последовательности

76. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
77. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

78. Прибор для определения нуклеотидной последовательности методом массового параллельного секвенирования (генетический секвенатор) MiSeq (Illumina Inc. («Иллюмина, Инк»), США) или аналогичный.
79. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
80. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
81. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

Интерпретация результатов секвенирования

82. Компьютер, с установленной операционной системой Microsoft® Windows XP™(RUS) и выше, выход в сеть Internet.
83. Комплект программного обеспечения **«ДЕОНА NGS»** предназначенный для определения устойчивости ВИЧ к антиретровирусной терапии на основе секвенирования нового поколения.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Плазма крови

Взятие крови проводится утром натощак. Для получения плазмы кровь отбирают в пробирку с 3 % раствором ЭДТА из расчета 20:1 (20 частей крови на 1 часть ЭДТА). Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают. В течение 6 часов с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в чистую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g, после чего отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

Условия хранения материала:

- при температуре от 2 до 8 °С – не более 3 суток;
- при температуре не выше минус 68 °С – длительно.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СОСТАВ

Комплект реагентов «РИБО-золь-Е» – комплект реагентов для экстракции РНК из биологического материала – **включает:**

Раствор А	Прозрачная вязкая жидкость желтого цвета	30	1 флакон
Раствор В	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1 флакон
Раствор С	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор D	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор Е	Прозрачная бесцветная жидкость	1,5	2 пробирки
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	6 пробирок
тРНК 1 *мкг/мкл*	Прозрачная бесцветная жидкость	0,12	6 пробирок
Гликоген 1%	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка
Калибратор *HIV*-Q	Порошок желтого цвета	–	3 пробирки
Растворитель Q	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	3 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию РНК из 54 образцов, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3 (1 шт.).

Комплект реагентов «Комплект для стабилизации РНК» для предотвращения деградации РНК в процессе ее экстракции из биологического материала включает:

2-меркаптоэтанол	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
0,05% раствор SDS	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию РНК из 54 образцов, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3 (1 шт.).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Комплект реагентов «ОТ-ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS» для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК кодирующей области генома вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) включает:

ОТ-ПЦР-смесь-1-А ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-В ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-С ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
ОТ-ПЦР-смесь-1-D ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	3 пробирки
HI-FI Reaction Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	1,04	3 пробирки
HI-FI Enzyme Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,016	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций, включая контрольные образцы. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3 (1 шт.).

Комплект реагентов «ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS» для проведения второго раунда амплификации ДНК кодирующей области генома вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) включает:

ПЦР-смесь-1-А ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,36	3 пробирки
ПЦР-смесь-1-В ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,36	3 пробирки
ПЦР-смесь-1-С ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,36	3 пробирки
ПЦР-смесь-1-D ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,36	3 пробирки
Q5 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,4	3 пробирки
Q5 полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на проведение 60 реакций, включая контрольные образцы. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3 (1 шт.).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Комплект реагентов «ЭФ NGS» – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле включает:

Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	50 мл	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК	Порошок белого цвета	1,7 г	2 флакона
Маркер молекулярных масс	Прозрачная жидкость синего цвета	0,15	1 пробирка
Буфер для нанесения образцов	Прозрачная жидкость синего цвета	1,0	1 пробирка
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	8 пробирок
X-Pure-1	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	1,0	2 пробирки
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на электрофоретический анализ 240 образцов (из расчета 100 мл геля – 5 рядов по 24 лунки). Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3 (2 шт.).

Комплект реагентов «Комплект для подготовки библиотек» включает:

Смесь ТрМ	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	1 пробирка
Буфер ТрМ-А (5х)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,25	1 пробирка
Буфер ТрМ-В	Прозрачная бесцветная жидкость	0,05	1 пробирка
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8	1 пробирка
Q5 полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	0,014	1 пробирка
Q5 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	1 пробирка
дНТФ (1,76 mM)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,14	1 пробирка
X-Pure-1	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	1,0	3 пробирки
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на подготовку библиотек из 50 образцов. Входит в состав форм комплектации 1, 2 (1 шт.).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Комплект реагентов «Комплект для индексации библиотек» включает:

Индекс праймер №701 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №702 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №703 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №704 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №705 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №706 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №501 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №502 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №503 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №504 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №505 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №506 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №507 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка
Индекс праймер №508 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,025	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на подготовку библиотек из 50 образцов. Входит в состав форм комплектации 1, 2 (1 шт.).

Комплект реагентов «Комплект для нормализации и оценки качества библиотек» включает:

Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
X-Pure-1	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	1,0	1 пробирка
X-Pure-2	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	0,2	3 пробирки
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на подготовку библиотек из 5 образцов. Входит в состав форм комплектации 1, 2 (1 шт.).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Комплект реагентов «Комплект для оценки концентрации библиотек» включает:

ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	1 пробирка
EvaGreen (20x)	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	0,02	1 пробирка
ПЦР-смесь-FL P5 / P7	Прозрачная бесцветная жидкость	0,25	1 пробирка
K+ NGS	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	1 пробирка
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение исследования по оценки концентрации одной библиотеки. Входит в состав форм комплектации 1, 2 (1 шт.).

Комплект реагентов «Комплект для массового параллельного секвенирования, v2-500» включает:

NaOH, сухая навеска	Таблетки белого цвета	0,4 г	1 флакон
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8 мл	4 пробирки
Набор буферов для секвенирования MiSeq v2 Reagent Tray 500 cycles	Картридж, содержащий 14 лунок с прозрачной бесцветной жидкостью, 4 пустые лунки, 2 лотка с бесцветной жидкостью, 1 лоток с окрашенной жидкостью	1 шт	1 картридж
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	3,0 мл	1 флакон
Буфер PR2	Прозрачная бесцветная жидкость	500 мл	1 бутылка
Проточная ячейка PE MiSeq Flow Cell	Флакон, содержащий прозрачную бесцветную жидкость, в которую погружена проточная ячейка (пластина из стекла и пластика)	Жидкость 16 мл Пластина 48x26 мм	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение массового параллельного секвенирования 50 образцов. Входит в состав формы комплектации 1 (1 шт.).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Комплект реагентов «Комплект для массового параллельного секвенирования, v3-600» включает:

NaOH, сухая навеска	Таблетки белого цвета	0,4 г	1 флакон
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8 мл	4 пробирки
Набор буферов для секвенирования MiSeq v3 Reagent Tray 600 cycles	Картридж, содержащий 14 лунок с прозрачной бесцветной жидкостью, 4 пустые лунки, 2 лотка с бесцветной жидкостью, 1 лоток с окрашенной жидкостью	1 шт	1 картридж
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	3 мл	1 флакон
Буфер PR2	Прозрачная бесцветная жидкость	500 мл	1 бутылка
Проточная ячейка PE MiSeq Flow Cell	Флакон, содержащий прозрачную бесцветную жидкость, в которую погружена проточная ячейка (пластина из стекла и пластика)	Жидкость 16 мл Пластина 48x26 мм	1 флакон

Комплект реагентов рассчитан на проведение массового параллельного секвенирования 50 образцов. Входит в состав формы комплектации 2 (1 шт.).

Комплект программного обеспечения «ДЕОНА NGS» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), предназначенный для определения устойчивости ВИЧ к антиретровирусной терапии на основе секвенирования нового поколения, **включает:**

1. Инсталляционный носитель информации с программным обеспечением «ДЕОНА NGS» версия 1.0.0 (02/11/2015);
2. Руководство пользователя;
3. Инструкцию по установке (может быть записана на инсталляционный носитель информации).

Входит в состав форм комплектации 1 и 2 (1 шт.).

ЭТАП 1. ЭКСТРАКЦИЯ РНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

(проводится в ЗОНЕ 1 – помещении для обработки исследуемого материала)

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

free», «DNase-free».

ВНИМАНИЕ! Рекомендуется проводить этапы экстракции, ОТ-ПЦР и II раунда ПЦР одновременно для 16 исследуемых образцов и 2 контрольных образца (ПК и ОК).

Всего 18 проб на исследование.

Экстракция РНК из плазмы крови с помощью комплекта реагентов «РИБО-золь-Е» и «Комплекта для стабилизации РНК».

Объем исследуемого материала для экстракции РНК – 1 мл.

ВНИМАНИЕ! Перед началом процедуры экстракции поместить флакон с раствором для отмывки 3 в морозильную камеру с температурой от минус 24 до минус 16 °С, включить центрифугу с охлаждением и задать температуру от 2 до 8 °С.

Порядок работы

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом на 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный (ОК) и положительный контроль экстракции (ПК)). Промаркировать пробирки.
2. В пробирки для исследуемых образцов внести **по 1 мл** исследуемых образцов, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром. Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать на вортексе.
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение 1 ч при скорости центрифугирования не менее 24 тыс. g и температуре от 2 до 8 °С.
4. Во время центрифугирования образцов подготовить **калибратор *HIV*-Q** к работе (используется для приготовления положительных контролей). Для этого осадить на вортексе содержимое пробирки **калибратор *HIV*-Q**, аккуратно открыть крышку и, избегая распыления содержимого, добавить **250 мкл растворителя Q.** Плотно закрыть пробирку и оставить ее на 15 мин при комнатной температуре (от 18 до 25 °С), периодически перемешивая на вортексе. После полного растворения осадить содержимое пробирки **калибратор *HIV*-Q** на вортексе для сброса капель с крышки.
5. После окончания ультрацентрифугирования, необходимо незамедлительно удалить **800 мкл** надосадочной жидкости и далее работать с осадком (**200 мкл**).
6. В пробирку положительного контроля экстракции (ПК) внести **10 мкл растворенного калибратора *HIV*-Q** и **190 мкл ОКО**. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести **200 мкл ОКО**. Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать и затем осадить капли на вортексе. Остатки

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

растворенного калибратора *HIV*-Q не хранить!

7. Во все пробирки добавить **по 3 мкл 2-меркаптоэтанола** из «Комплекта для стабилизации РНК», используя отдельные наконечники с фильтром. Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать и затем осадить капли на вортексе.
8. Во все пробирки добавить **по 200 мкл 0,05% раствора SDS** из «Комплекта для стабилизации РНК», используя отдельные наконечники с фильтром. Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать и затем осадить капли на вортексе.
9. Во все пробирки добавить **по 400 мкл раствора D**.

ВНИМАНИЕ! После добавления **раствора D** проба может раствориться не полностью. Полное растворение происходит после добавления **раствора E** и **раствора A**.

10. Добавить в пробирки **по 40 мкл раствора E**. Плотно закрыть крышки, перемешать и затем осадить капли на вортексе.
11. Добавить в пробирки **по 400 мкл раствора A**. Плотно закрыть крышки, перемешать и затем осадить капли на вортексе.
12. Добавить в пробирки **по 130 мкл раствора B**. Плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе в течение 15-20 с (раствор должен стать молочно-белым).
13. Поставить пробирки в морозильную камеру с температурой от минус 24 до минус 16 °С **на 10 мин**.
14. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге **в течение 10 мин при 10–16 тыс. g** (если количество пробирок нечетное, уравновесить центрифугу пробиркой на 1,5 мл, содержащей примерно 1,0 мл воды). В процессе центрифугирования раствор разделится на две фазы: нижнюю - фенольную, содержащую белки и ДНК и верхнюю – водную, содержащую РНК.
15. Во время центрифугирования образцов отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая ОК и ПК). Внести в каждую пробирку по **500 мкл раствора C, 10 мкл тРНК 1 мкг/мкл** (препарата нагрузочной РНК) и **по 10 мкл гликогена 1%**.
16. Из каждой пробирки с образцами после центрифугирования аккуратно отобрать верхнюю фазу (приблизительно **700-750 мкл**), используя для каждой пробы отдельный наконечники с фильтром, и перенести в пробирки, содержащие **раствор C, тРНК 1 мкг/мкл** и **гликоген 1%**. Плотно закрыть крышки, перемешать и затем осадить капли на вортексе.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

17. Поставить пробирки в морозильную камеру с температурой от минус 24 до минус 16 °С **на 20 мин.**
18. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **10 мин при 10–16 тыс. g.** Визуально найти положение осадка РНК (если пробирка была помещена в центрифугу «хвостиком» или меткой на крышке пробирки вверх, то осадок после центрифугирования будет находиться на дне пробирки строго под «хвостиком» или меткой). Аккуратно, не задевая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра, используя вакуумный отсасыватель. Если осадок не виден, отобрать надосадочную жидкость, не касаясь стенок, оставив на дне пробирки примерно **20 мкл.**
19. Добавить в пробирки **по 800 мкл** охлажденного при температуре от минус 24 до минус 16 °С **раствора для отмывки 3,** плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе.
20. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **10 мин** при 10–16 тыс. g. Аккуратно, не задевая осадок, удалить надосадочную жидкость, используя отдельный наконечник на 1000 мкл для каждой пробы.
21. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат с температурой **56 °С** на **5-7 мин** для подсушивания осадка.
22. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера** и перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой **56 °С** на **5 мин.** Перемешать и затем осадить капли на вортексе. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Очищенная РНК может храниться при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ЭТАП 2. РЕАКЦИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ. I РАУНД (проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР)

ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.

Реакция ОТ-ПЦР I раунд проводится с помощью «ОТ-ПЦР-комплекта-ВИЧ-NGS»

Выбор пробирок для проведения ОТ-ПЦР зависит от используемого амплификатора.

Для внесения в пробирки реагентов, проб ДНК/РНК и контрольных образцов

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы РНК – 10 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл для ОТ-ПЦР исследуемых и контрольных образцов.
2. Приготовить 4 реакционные смеси. Для этого для каждой смеси (**ОТ-ПЦР-смесь-1-А ВИЧ, ОТ-ПЦР-смесь-1-В ВИЧ, ОТ-ПЦР-смесь-1-С ВИЧ, ОТ-ПЦР-смесь-1-D ВИЧ**) смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении (на примере приготовления смеси с использованием **ОТ-ПЦР-смеси-1-А ВИЧ**):
   - **2 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1-А ВИЧ,**
   - **13 мкл HI-FI Reaction Mix,**
   - **0,2 мкл HI-FI Enzyme Mix.**
3. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** подготовленной реакционной смеси.
4. Промаркировать пробирки.
5. Подготовить пробирки с экстрагированной РНК, предназначенной для проведения исследования. В случае хранения пробирок их необходимо встряхнуть и осадить на вортексе.
6. В подготовленные пробирки внести по **10 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.
7. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 4).

Таблица 4

Программа ОТ-ПЦР кодирующей области генома ВИЧ

1	50	30 мин	1
2	94	2 мин	1
3	94	15 с	30
	50	30 с	
	68	3 мин 30 с.	
4	68	7 мин	1
5	4-10	хранение	

8. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу амплификации.
9. После окончания реакции пробирки отправить в специальный бокс для проведения реакции Nested-ПЦР. Бокс должен быть снабжен отдельным комплектом лабораторной одежды, автоматических дозаторов, вспомогательных материалов

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

и оборудования.

ЭТАП 3. АМПЛИФИКАЦИЯ. II РАУНД

(проводится в ЗОНЕ 2 – помещении для проведения ПЦР)

Амплификация II раунд проводится с помощью «ПЦР-комплекта-ВИЧ-NGS»

Для внесения в пробирки реагентов, проб и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 2 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл для ПЦР исследуемых и контрольных образцов.
2. Приготовить 4 реакционные смеси. Для этого для каждой смеси (**ПЦР-смесь-1-А ВИЧ, ПЦР-смесь-1-В ВИЧ, ПЦР-смесь-1-С ВИЧ, ПЦР-смесь-1-D ВИЧ**) смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении (на примере приготовления смеси с использованием **ПЦР-смеси-1-А ВИЧ**):
   - **18 мкл ПЦР-смеси-1-А ВИЧ,**
   - **5 мкл Q5 буфера,**
   - **0,25 мкл Q5 полимеразы.**
3. Внести в каждую пробирку по **23 мкл** подготовленной реакционной смеси.
4. В подготовленные пробирки с соответствующей **ПЦР-смесью-1** внести по **2 мкл ПЦР-продукта, полученного на соответствующей ОТ-ПЦР-смеси-1 в первом раунде амплификации.**

ВНИМАНИЕ! Внесение ПЦР-продукта, полученного в первом раунде амплификации, в готовые реакционные смеси производится в специальном боксе для Nested-ПЦР во избежание контаминации лаборатории.

5. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 5).

Таблица 5

Программа II-го раунда ПЦР кодирующей области генома ВИЧ

1	98	30 с	1
2	98	10 с	30
	57	30 с	
	72	2 мин	
3	72	5 мин	1
4	4-10	хранение	

6. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

амплификации.

7. После окончания реакции пробирки отправить в помещение для детекции продуктов амплификации и проведения реакции секвенирования (**ЗОНУ 3**). Пробы после амплификации можно хранить в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1-2 мес при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

ЭТАП 4. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ

(проводится в ЗОНЕ 3 – помещении для детекции продуктов амплификации в ПЦР-боксе или в вытяжном шкафу при наличии в нем локального источника УФ-света).

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим в этот день манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

Учет результатов и оценка концентрации полученных ПЦР-фрагментов проводится методом электрофореза в агарозном геле с помощью комплекта реагентов **«ЭФ NGS»**.

А. Электрофоретическия детекция

Объем ПЦР-продукта – 5 мкл.

ВНИМАНИЕ! Для внесения реагентов и продуктов амплификации используются одноразовые наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе **маркер молекулярных масс, буфер для нанесения образцов**, осадить капли с крышек пробирок.

1. Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести **дистиллированной водой до 500 мл**, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Бромид этидия – соединение, обладающее репродуктивной и острой токсичностью, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

2. Агарозу из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С

3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры для горизонтального электрофореза. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.
4. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду (ДНК будет мигрировать к положительному электроду). Залить в камеру для горизонтального электрофореза ранее приготовленного буфера (см. п. 1) столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.
5. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 0,5 мл с учетом количества исследуемых и контрольных образцов. Промаркировать пробирки.
6. Внести на дно промаркированных пробирок **по 5 мкл буфера для нанесения образцов**.
7. В подготовленные пробирки с буфером для нанесения образцов внести **по 5 мкл ПЦР-продукта** согласно маркировке, используя для каждого образца отдельный наконечник. Тщательно перемешать и осадить на вортексе. Оставшийся объем ПЦР-продукта поместить в холодильник и хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С до следующего этапа работы (проведение реакции тагментации).
8. Аккуратно внести **5 мкл маркера молекулярных масс** в первую лунку геля. Для правильной оценки концентрации амплифицированных образцов **маркер молекулярных масс** должен быть обязательно представлен в **каждом** ряду дорожек геля. Избегать перетекания маркера в соседние лунки.
9. Аккуратно **внести весь объем подготовленной смеси ПЦР-продукта с буфером для нанесения образцов** в свободные лунки геля, используя для

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

каждого образца отдельный наконечник. Избегать перетекания образцов в соседние лунки.

10. Для каждого амплифицируемого фрагмента (A, B, C и D) должны быть обязательно представлены контрольные образцы ОК, ПК. Аналогично исследуемым образцам приготовить смесь контрольных образцов с **буфером для нанесения образцов** и внести в свободные лунки геля. Для более точного учета результатов контрольные и исследуемые образцы по каждому амплифицируемому фрагменту рекомендуется располагать на одном ряду.
11. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. Если нет нарушения контактов, то при прохождении тока от электродов должны подниматься пузырьки. Оптимальное напряжение электрического поля 10 В/см.
12. По завершении времени электрофореза (краситель ксиленцианол при этом пройдет примерно половину длины геля (~ 1,5 см)) выключить источник тока и перенести гель на трансиллюминатор. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!

13. Последовательно провести:
    а) учет результатов в контрольных и исследуемых образцах,
    б) оценку концентрации в исследуемых образцах.

Б. Учет результатов

Учет результатов проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированных фрагментов A, B, C и D ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

Длины полученных специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК в исследуемых образцах должны соответствовать длинам соответствующих фрагментов ДНК контрольных образцов.

<u>Учет результатов в контрольных образцах</u>

Провести визуальное сравнение размеров специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК в дорожках с положительными контролями с маркером молекулярных масс. Характеристика полос маркера молекулярных масс приведена в табл. 6.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 6

Характеристика маркера молекулярных масс

Положение полосы маркера на агарозном геле	Размер полосы, тыс. п.н.	Количество п. в 5 мкл маркера
Верхняя	10	42
2	8	42
3	6	50
4	5	42
5	4	33
6	3	125
7	2	48
8	1,5	36
9	1	42
10	0,5	42

Результат считается достоверным, если получены правильные результаты для положительного и отрицательного контролей экстракции, в соответствии с табл. 7. В дорожках, соответствующих отрицательным контролям этапа экстракции, не должно быть никаких полос.

Таблица 7

Оценка результатов анализа контрольных образцов

ОК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	Нет
ПК	Экстракция РНК, ОТ-ПЦР	Есть

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Для положительного контроля экстракции (ПК) не выявляется специфическая светящаяся полоса на соответствующем уровне (для любого из фрагментов А и/или В и/или С и/или D). Это может свидетельствовать об ошибках, допущенных на этапе экстракции нуклеиновых кислот и/или постановках ОТ-ПЦР и II-го раунда ПЦР. Необходимо повторить исследование для всех образцов, в которых не обнаружены специфические полосы, начиная с этапа экстракции РНК для тех фрагментов, для которых положительный контроль был отрицательным. Например, если в положительном контроле на фрагмент А отсутствует специфическая полоса, необходимо повторить исследование на фрагмент А для всех исследуемых образцов, оказавшихся отрицательными по этому фрагменту.
2. Для отрицательного контроля экстракции (ОК) выявляется светящаяся полоса. Вероятна контаминация лаборатории фрагментами амплификации или

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

контаминация реагентов, исследуемых образцов на каком-либо этапе ПЦР-исследования. Необходимо предпринять меры по выявлению и ликвидации источника контаминации и повторить исследование для всех образцов, в которых обнаружен специфический фрагмент РНК, начиная с этапа экстракции РНК.

Учет результатов в исследуемых образцах

1. Образцами, подходящими для секвенирования, считаются образцы, которые содержат специфические светящиеся полосы большей или меньшей интенсивности на уровнях, соответствующих уровням фрагментов ДНК контрольных образцов (см. табл. 8).

Таблица 8

Молекулярные массы амплифицируемых фрагментов ДНК

Фрагмент A	2343
Фрагмент B	2618
Фрагмент C	2566
Фрагмент D	2620

ВНИМАНИЕ! Наличие «шмера» и дополнительных неспецифических фрагментов амплификации над или под специфической полосой не влияет на качество сиквенса.

2. Для образцов, которые не содержат специфических светящихся полос на необходимом уровне и имеют вирусную нагрузку в пределах аналитической чувствительности набора реагентов, необходимо провести повторное исследование, начиная с первого этапа анализа (экстракция РНК). Если при повторном исследовании образцы вновь не содержат специфических светящихся полос на необходимом уровне, то по этим образцам выдается результат «не определено по причине низкой вирусной нагрузки».

В. Оценка концентрации ДНК в исследуемых ПЦР-фрагментах

Концентрация ДНК в каждом исследуемом образце определяется путем сравнения интенсивности свечения специфических полос образцов с интенсивностью свечения полос маркера молекулярных масс.

Для примера на рис. 1 представлен результат электрофореза образцов имеющих различные концентрации ДНК.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Рисунок 1 – Агарозный гель с исследуемыми образцами различных концентраций:

1. Маркер молекулярного веса, нанесено 5 мкл.
2. Исследуемый образец, нанесено более 125 нг.
3. Исследуемый образец, нанесено от 125 до 48 нг.
4. Исследуемый образец, нанесено менее 48 нг.

Г. Выравнивание концентрации

После определения примерной концентрации ДНК в каждом образце необходимо подготовить ПЦР-продукты к реакции тагментации, доведя концентрацию фрагментов с помощью **H_2O стерильной** до одинаковой для фрагментов A, B, C, D по каждому из исследуемых образцов, согласно рекомендациям, указанным в табл. 9.

ВНИМАНИЕ! В таблице приведены объемы **H_2O стерильной** для разведения **25 мкл** ПЦР-продукта. Если количество разводимого ПЦР-продукта не соответствует 25 мкл, объемы **H_2O стерильной** должны быть также пропорционально изменены.

Таблица 9

Определение количества ДНК в исследуемых образцах и разведение до необходимой концентрации.

[redacted]			
2	Больше интенсивности свечения полосы № 3 размером 3000 п.н., содержащей 125 нг	Более 125	175 (разведение в 8 раз)
3	Больше интенсивности свечения полосы размером 2000 п.н., но меньше интенсивности свечения полосы размером 3000 п.н., содержащих 48 и 125 нг соответственно	60-100	75 (разведение в 4 раза)
4	Меньше интенсивности свечения полосы размером 200 п.н., содержащей 48 нг.	40-60	40 (разведение в 2,6 раза)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ВНИМАНИЕ! В случае определения концентрации исследуемых образцов другим способом необходимо учитывать, что рекомендуемое количество ПЦР-продукта, вносимое в реакцию тагментации, составляет 40-60 нг.

Для разведения ПЦР-продукта в воде использовать плашки № 1a, № 1b (схемы 1 и 2).

Схема 1. Плашка № 1a

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 A	9 A	17 A	25 A	33 A	41 A	1 B	9 B	17 B	25 B	33 B	41 B
B	2 A	10 A	18 A	26 A	34 A	42 A	2 B	10 B	18 B	26 B	34 B	42 B
C	3 A	11 A	19 A	27 A	35 A	43 A	3 B	11 B	19 B	27 B	35 B	43 B
D	4 A	12 A	20 A	28 A	36 A	44 A	4 B	12 B	20 B	28 B	36 B	44 B
E	5 A	13 A	21 A	29 A	37 A	45 A	5 B	13 B	21 B	29 B	37 B	45 B
F	6 A	14 A	22 A	30 A	38 A	46 A	6 B	14 A	22 B	30 B	38 B	46 B
G	7 A	15 A	23 A	31 A	39 A	47 A	7 B	15 B	23 B	31 B	39 B	47 B
H	8 A	16 A	24 A	32 A	40 A	48 A	8 B	16 B	24 B	32 B	40 B	48 B

Схема 2. Плашка № 1b

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 C	9 C	17 C	25 C	33 C	41 C	1 D	9 D	17 D	25 D	33 D	41 D
B	2 C	10 C	18 C	26 C	34 C	42 C	2 D	10 D	18 D	26 D	34 D	42 D
C	3 C	11 C	19 C	27 C	35 C	43 C	3 D	11 D	19 D	27 B	35 B	43 B
D	4 C	12 C	20 C	28 C	36 C	44 C	4 D	12 D	20 D	28 D	36 D	44 D
E	5 C	13 C	21 C	29 C	37 C	45 C	5 D	13 D	21 D	29 D	37 D	45 D
F	6 C	14 C	22 C	30 C	38 C	46 C	6 D	14 D	22 D	30 D	38 D	46 D
G	7 C	15 C	23 C	31 C	39 C	47 C	7 D	15 D	23 D	31 D	39 D	47 D
H	8 C	16 C	24 C	32 C	40 C	48 C	8 D	16 D	24 D	32 D	40 D	48 D

Д. Подготовка ПЦР-продукта к очистке

1. Подготовить чистую плашку № 2. Разметить первые 48 ячеек.
2. С помощью восьмиканального дозатора внести в ячейки плашки № 2 **по 25 мкл** образцов фрагментов A, B, C, D из соответствующих лунок плашек № 1a и № 1b в соответствии со схемой плашки № 2 (схема 3). В результате объем содержимого в каждой ячейки будет **100 мкл.**

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ВНИМАНИЕ! Строго соблюдать смену наконечников при переходе от одного ряда к другому.

3. Выставить значение объема на восьмиканальной пипетке **50 мкл**.
4. Содержимое плашки № 2 необходимо аккуратно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха около 10 раз с помощью восьмиканального дозатора. Строго следить за сменой наконечников при переходе от одного ряда к другому.

Схема 3. Плашка № 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 ABCD	9 ABCD	17 ABCD	25 ABCD	33 ABCD	41 ABCD						
B	2 ABCD	10 ABCD	18 ABCD	26 ABCD	34 ABCD	42 ABCD						
C	3 ABCD	11 ABCD	19 ABCD	27 ABCD	35 ABCD	43 ABCD						
D	4 ABCD	12 ABCD	20 ABCD	28 ABCD	36 ABCD	44 ABCD						
E	5 ABCD	13 ABCD	21 ABCD	29 ABCD	37 ABCD	45 ABCD						
F	6 ABCD	14 ABCD	22 ABCD	30 ABCD	38 ABCD	46 ABCD						
G	7 ABCD	15 ABCD	23 ABCD	31 ABCD	39 ABCD	47 ABCD						
H	8 ABCD	16 ABCD	24 ABCD	32 ABCD	40 ABCD	48 ABCD						

5. Далее перейти к следующему этапу, либо закрыть Плашку № 2 адгезивной пленкой и хранить при температуре от 2 до 8 °С, не более 5 дней, а при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительное время.

ЭТАП 5. ОЧИСТКА ПЦР-ПРОДУКТА

(проводится в ЗОНЕ 3)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

1. Ресуспендировать магнитные частицы **X-Pure-1**, интенсивно перемешивая на вортексе в течение 1-2 минут до гомогенного состояния.
2. Подготовить плашку № 2. Если плашка хранились в холодильнике, то необходимо центрифугировать плашку при 280 g в течение 1 мин.
3. Аккуратно снять адгезивную пленку с поверхности плашки.
4. Подготовить чистую плашку № 3. Разметить первые 48 ячеек.
5. В первые 48 ячеек плашки № 3 внести **по 25 мкл** ресуспендированных **X-Pure-1**.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

6. Используя восьмиканальный дозатор внести в первые 48 ячеек плашки № 3 **по 25 мкл** продуктов амплификации из соответствующих лунок плашки № 2, используя одноразовые отдельные наконечники с фильтрами.

ВНИМАНИЕ! Строго соблюдать смену наконечников при переходе от одного ряда к другому.

7. Аккуратно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха около 5-10 раз.
8. Инкубировать плашку № 3 на рабочем столе **в течение 5 мин** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
9. Плашку № 2 с остатком образцов накрыть адгезивной пленкой и хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С или удалить в контейнер для сброса.
10. Поместить плашку № 3 на магнитный штатив.

ВНИМАНИЕ! Далее все процедуры до п. 19 проводятся строго на магнитном штативе!

11. Выдержать плашку № 3 на магнитном штативе **в течение 5 мин**, либо до полного осаждения частиц.
12. Отобрать супернатант из ячеек, не касаясь наконечником магнитных частиц.
13. Используя восьмиканальный дозатор добавить в каждую ячейку **по 200 мкл Раствора для отмывки 3.**
14. Инкубировать плашку № 3 на магнитном штативе **в течение 30 сек** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
15. Отобрать супернатант из ячеек, не касаясь наконечником магнитных частиц.
16. Повторить пункты 13-15.
17. Высушить магнитные частицы **в течение 5-10 мин** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
18. Снять плашку с магнитного штатива.
19. В каждую используемую **ячейку** внести **по 25 мкл H_2O стерильной**, затем аккуратно перемешать пипетированием около 5-10 раз.
20. Инкубировать плашку № 3 на рабочем столе **в течение 5 мин** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
21. Поместить плашку № 3 на магнитный штатив на **5 мин**, либо до полного осаждения частиц.
22. Подготовить плашку № 4 к работе. Разметить первые 48 ячеек.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

23. Не снимая плашку № 3 с магнитного штатива, перенести из ячеек плашки № 3 **по 21 мкл** элюата в соответствующие ячейки плашки № 4 не касаясь наконечником магнитных частиц.
24. Удалить использованную плашку № 3 в контейнер для сброса.
25. Перейти к следующему этапу, либо закрыть плашку № 4 адгезивной пленкой и хранить при температуре от 2 до 8 °С, не более 5 дней, а при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительное время.

ЭТАП 6. ИЗМЕРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОБ

(проводится в ЗОНЕ 3)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

Успешное окончание исследования во многом зависит от точности измерения количества и качества ДНК в образцах, полученных в результате проведения данного этапа работ.

Оценку измерения количества и качества ДНК в образцах, полученных в результате проведения данного этапа работ, можно осуществлять различными способами, в зависимости от возможностей лаборатории.

Оценка количества ДНК в образцах

Для количественной оценки библиотеки ДНК рекомендуется использовать флуориметрические методы, специфичные для двухцепочечной ДНК, например, Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay System или аналогичный. При этом рекомендуется использовать 2 мкл каждого образца ДНК и 198 мкл рабочего раствора Qubit.

Не рекомендуются методы, которые измеряют общее количество нуклеиновых кислот, например методы, основанные на измерении поглощения в УФ-диапазоне, такие как Nanodrop.

Оценка качества ДНК в образцах

Для оценки качества образцов рекомендуется использовать приборы, позволяющие произвести оценку отношение поглощения образца при 260 нм к поглощению при 280 нм, например Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., США) или аналогичный. Для подготовки образцов к секвенированию с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS», они должны обладать следующими характеристиками (см табл. 10).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 10

Допустимые характеристики образцов для секвенирования

Концентрация образца	2-15000 нг/мкл
Отношение поглощений А 260/280 нм	1,7 - 2,1

ЭТАП 7. ТАГМЕНТАЦИЯ ДНК

(проводится в ЗОНЕ 3)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

1. Разморозить **Буфер ТрМ-А (5х)** и **Буфер ТрМ-В** в течение **10-15 мин.**
2. Аккуратно перемешать на вортексе **Буфер ТрМ-А (5х)** и **Буфер ТрМ-В** в течение **1 мин**, осадить содержимое пробирок на вортексе.
3. Разморозить **смесь ТрМ.** Осадить содержимое пробирок на вортексе.
4. В пробирку с **смесью ТрМ** добавить **250 мкл буфера ТрМ-А (5х).**
5. Подготовить плашку № 4 к работе. Если плашка хранились в холодильнике, то необходимо центрифугировать плашку при 280 g в течение 1 мин.
6. Аккуратно снять адгезивную пленку с поверхности плашки.
7. Подготовить новую плашку № 5 к работе. Разметить первые 48 ячеек.
8. Внести в 48 ячеек плашки № 5 из соответствующих лунок плашки № 4 объем элюата, содержащий 50 нг ДНК.

ВНИМАНИЕ! Строго соблюдать смену наконечников при переходе от одного ряда к другому.

9. Довести объем элюата в каждой ячейки плашки № 5 **до 17,5 мкл H_2O стерильной.**
10. Внести в каждую из используемых ячеек плашки № 5 **по 7,5 мкл** приготовленной **смеси ТрМ с буфером ТрМ-А (5х).**
11. Выставить значение объема на восьмиканальной пипетке **25 мкл** и аккуратно перемешать пипетированием 10 раз образцы в плашке № 5.

ВНИМАНИЕ! Строго соблюдать смену наконечников при переходе от одного ряда к другому.

12. Закрыть плашку № 5 адгезивной пленкой.
13. Немедленно поместить плашку № 5 в амплификатор, запрограммированный для выполнения следующей программы (см.табл 11):

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 11

Программа реакции тагментации

1	55	5 мин	1
4	4	хранение	

14. Вынуть плашку № 5 из амплификатора. Немедленно удалить адгезивную пленку с поверхности плашки и внести в каждую ячейку плашки № 5 **по 1 мкл буфера ТрМ-В**.

ВНИМАНИЕ! Время между окончанием инкубации и внесением во все лунки **буфера ТрМ-В** не должно превышать **10 мин**.

15. Аккуратно перемешать образцы в плашке № 5 пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха около 10 раз с помощью восьмиканальной пипетки.

ВНИМАНИЕ! Строго соблюдать смену наконечников при переходе от одного ряда к другому.

16. Перейти к следующему этапу, либо закрыть Плашку № 5 адгезивной пленкой и хранить при температуре от 2 до 8 °С, не более 5 дней, а при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительное время.

ЭТАП 8. ОЧИСТКА РЕАКЦИОННОЙ СМЕСИ ПОСЛЕ РЕАКЦИИ ТАГМЕНТАЦИИ (проводится в ЗОНЕ 3)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

1. Ресуспендировать магнитные частицы **X-Pure-1**, интенсивно перемешивая на вортексе в течение 1-2 минут до гомогенного состояния.
2. В каждую используемую ячейку плашки № 5 отдельным наконечником внести **по 47 мкл X-Pure-1**, перемешать пипетированием около 5-10 раз.
3. Инкубировать плашку № 5 на рабочем столе **в течение 5 мин** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
4. Поместить плашку на магнитный штатив.

ВНИМАНИЕ! Далее все процедуры до п. 11 проводятся на магнитном штативе. Не удалять плашку со штатива!

5. Выдержать плашку № 5 на магнитном штативе **в течение 5 мин** либо до полного осаждения частиц.
6. Отобрать супернатант из ячеек, не касаясь наконечником магнитных частиц.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

7. Используя восьмиканальный дозатор добавить в каждую ячейку **по 200 мкл раствора для отмывки 3.**
8. Инкубировать плашку № 5 на магнитном штативе **в течение 30 сек** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
9. Отобрать супернатант из лунок, не касаясь наконечником магнитных частиц.
10. Повторить пункты 7-9.
11. Снять плашку с магнитного штатива.
12. Высушить магнитные частицы **в течение 5 мин.** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
13. В каждую используемую **ячейку** внести **по 14 мкл H2O стерильной**, затем аккуратно перемешать пипетированием около 5-10 раз, используя восьмиканальный дозатор.

ВНИМАНИЕ! Строго соблюдать смену наконечников при переходе от одного ряда к другому.

14. Инкубировать плашку № 5 на рабочем столе **в течение 5 мин** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
15. Поместить плашку № 5 на магнитный штатив на **5 мин**, либо до полного осаждения частиц.
16. Подготовить новую плашку № 6 к работе. Разметить первые 48 лунок.
17. Не снимая плашку № 5 с магнитного штатива, перенести из ячеек плашки № 5 **по 10 мкл** элюата в соответствующие ячейки плашки № 6 <u>не касаясь наконечником магнитных частиц.</u>
18. Удалить использованную плашку № 5 в контейнер для сброса.
19. Перейти к следующему этапу, либо закрыть плашку № 6 адгезивной пленкой и хранить при температуре от 2 до 8 °С, не более 5 дней, а при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительное время.

ЭТАП 9. АМПЛИФИКАЦИЯ И ИНДЕКСАЦИЯ ДНК-БИБЛИОТЕК

(проводится в ЗОНЕ 3)

<u>Приготовить реакционную смесь для амплификации библиотек:</u>

1. Разморозить **Q5 буфер** и **дНТФ (1,76 mM)** в течение 10-15 мин.
2. Аккуратно перемешать на вортексе **Q5 буфер** и **дНТФ (1,76 mM)** и осадить содержимое пробирок на вортексе.
3. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
   - **H_2O стерильная – 140 мкл,**

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

- **Q5 буфер – 280 мкл,**
- **дНТФ (1,76 mM) – 140 мкл,**
- **Q5 полимераза – 14 мкл.**

Подготовить индекс-праймеры из «Комплекта для индексации библиотек» к работе:

4. Разморозить индекс-праймеры в течение 10-15 мин.
5. Аккуратно перемешать на вортексе каждую пробирку **в течение 1 мин**, осадить содержимое пробирок на вортексе.
6. Подготовить плашку № 6 к работе. Если плашка хранились в холодильнике, то необходимо центрифугировать плашку при 280 *g* в течение 1 мин.
7. Аккуратно снять адгезивную пленку с поверхности плашки.
8. Внести в 48 ячеек плашки № 6 **по 10 мкл** подготовленной реакционной смеси.
9. Расположить на рабочем столе плашку № 6 и индекс-праймеры следующим образом:
   - Выставить пробирки **с индексом I701- I706** в горизонтальном порядке, так чтобы **индекс №701** соответствовал **колонке 1** плашки № 6, а **индекс №706 – колонке 6.**
   - Выставить пробирки с **индексом I501 - I508** в вертикальном порядке, так чтобы **индекс №501** соответствовал **ряду А** плашки № 6, **а индекс 508 - ряду Н** плашки № 6.
10. Зафиксировать позиции индекс-праймеров в лабораторный журнал (см. схема 4).

Схема 4. Внесение индекс праймеров

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	701 501	702 501	703 501	704 501	705 501	706 501						
B	701 502	702 502	703 502	704 502	705 502	706 502						
C	701 503	702 503	703 503	704 503	705 503	706 503						
D	701 504	702 504	703 504	704 504	705 504	706 504						
E	701 505	702 505	703 505	704 505	705 505	706 505						
F	701 506	702 506	703 506	704 506	705 506	706 506						
G	701 507	702 507	703 507	704 507	705 507	706 507						
H	701 508	702 508	703 508	704 508	705 508	706 508						

11. Снять крышки с пробирок, содержащих **индекс-праймеры №701 (5 пМ) - №706 (5 пМ).**
12. Добавить отдельными наконечниками **по 2,5 мкл индекс-праймера №701 (5 пМ)**

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

в каждую ячейку **колонки 1** плашки № 6, затем отдельными наконечниками **по 2,5 мкл индекс-праймера №702 (5 пМ)** в каждую ячейку **колонки 2** плашки № 6 и т.д. до **индекс-праймера №706 (5 пМ)** включительно.

13. Выбросить использованные крышки и пробирки из-под индекс-праймеров №701 (5 пМ) - №706 (5 пМ).
14. Снять крышки с пробирок, содержащих **индекс-праймеры №501 (5 пМ) - №508 (5 пМ).**
15. Добавить отдельными наконечниками **по 2,5 мкл индекс-праймера №501 (5 пМ)** в каждую ячейку **ряда А** плашки № 6, затем отдельными наконечниками **по 2,5 мкл индекс-праймера №502 (5 пМ)** в каждую ячейку **ряда В** плашки № 6 и т.д. до **индекс-праймера №508 (5 пМ)** включительно.
16. Выбросить использованные крышки и пробирки из-под **индекс-праймеров №501 (5 пМ) - №508 (5 пМ).**
17. Используя восьмиканальный дозатор и одноразовые наконечники для каждой пробы, аккуратно перемешать реакционную смесь пипетированием около 3-5 раз. Закрыть плашку № 6 адгезивной пленкой.
18. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 12).
19. Поместить плашку № 6 в амплификатор и запустить программу амплификации.

Таблица 12

Программа проведения реакции амплификации библиотек

[redacted]	[redacted]	[redacted]
30	1 мин	1
37	1 мин	1
72	1 мин	1
95	5 мин	1
95	20 с	9
65	20 с	
72	60 с	
4	хранение	

20. Сразу после извлечения плашки из амплификатора перейти к следующему этапу, либо закрыть Плашку № 6 адгезивной пленкой и хранить при температуре от 2 до 8 °С, не более 5 дней, а при температуре от минус 24 до минус 16 °С – длительное время.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ЭТАП 10. НОРМАЛИЗАЦИЯ ДНК-БИБЛИОТЕК

(проводится в ЗОНЕ 3)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

1. Ресуспендировать магнитные частицы **X-Pure-1,** интенсивно перемешивая на вортексе в течение 1-2 минут до гомогенного состояния.
2. Подготовить плашку № 7 к работе. Разметить первые 48 лунок.
3. Внести в первые 48 ячеек плашки № 7 **по 45 мкл H_2O стерильной**, затем внести **по 20 мкл** ресуспендированных магнитных частиц **X-Pure-1** используя отдельные одноразовые наконечники с фильтрами.
4. Подготовить плашку № 6 к работе. Если плашка хранились в холодильнике, то необходимо центрифугировать плашку при 280 g в течение 1 мин.
5. Аккуратно снять адгезивную пленку с поверхности плашки.
6. Внести в первые 48 ячеек плашки № 7 **по 5 мкл** реакционной смеси из соответствующих ячеек плашки № 6, используя одноразовые отдельные наконечники с фильтрами и восьмиканальный дозатор.
7. Выставить значение объема на восьмиканальном дозаторе равным **70 мкл**, и, используя одноразовые наконечники, аккуратно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха около 10-15 раз.
8. Плашку № 6 с остатком образцов накрыть адгезивной пленкой, убрать в холодильную камеру и хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С или удалить в контейнер для сброса.
9. Инкубировать плашку № 7 на рабочем столе **в течение 5 мин**, при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
10. Поместить плашку № 7 на магнитный штатив.

ВНИМАНИЕ! Далее все процедуры до п. 14 проводятся строго на магнитном штативе!

11. Выдержать плашку № 7 на магнитном штативе в течение **5 мин**, либо до полного осаждения частиц.
12. Подготовить плашку № 8 к работе. Разметить первые 48 ячеек.
13. Внести в первые 48 ячеек плашки № 8 **по 60 мкл** надосадочной жидкости из соответствующих ячеек плашки № 7, не снимая плашку № 7 с магнитного штатива и используя отдельные одноразовые наконечники с фильтрами.
14. Удалить использованную плашку № 7 в контейнер для сброса.
15. Подготовить плашку № 9. Разметить первые 48 ячеек.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

16. Ресуспендировать магнитные частицы **X-Pure-2,** интенсивно перемешивая на вортексе в течение 1-2 минут до гомогенного состояния.
17. В первые 48 ячеек плашки № 9 внести **по 12 мкл** ресуспендированных **X-Pure-2.**
18. Внести в первые 48 ячеек плашки № 9 **по 28 мкл** надосадочной жидкости из соответствующих ячеек плашки № 8, используя одноразовые отдельные наконечники с фильтрами.
19. Выставить значение объема на восьмиканальном дозаторе равным **40 мкл**, и, используя одноразовые наконечники, аккуратно перемешать пипетированием, не допуская появления пузырьков воздуха около 10-15 раз.
20. Плашку № 8 с остатком образцов накрыть адгезивной пленкой, убрать в холодильную камеру и хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С или удалить в контейнер для сброса.
21. Инкубировать плашку № 9 на рабочем столе **в течение 10 мин**, при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) перемешивая пипетированием через каждые **2 минуты**, при помощи восьмиканального дозатора.
22. Подготовить 2 отдельные одноразовые пробирки объемом 1,5 мл.
23. Объединить первые 24 образца из плашки № 9 в первую пробирку, отобрав по **40 мкл** каждого из исследуемых образцов, затем аккуратно объединить во второй пробирке по **40 мкл** каждого из оставшихся 24 образцов.
24. Поместить пробирки на магнитный штатив.

ВНИМАНИЕ! Далее все процедуры до п. 31 проводятся на магнитном штативе. Не удалять пробирки со штатива!

25. Выдержать пробирки на магнитном штативе в течение **10 мин**, либо до полного осаждения частиц с открытыми крышками.
26. Отобрать супернатант из каждой пробирки, не касаясь наконечником магнитных частиц, и удалить в контейнер для сброса.
27. Добавить в каждую пробирку **по 1200 мкл раствора для отмывки 3.**
28. Инкубировать содержимое пробирок на магнитном штативе в течение **1 мин.**
29. Отобрать супернатант из каждой пробирки, не касаясь наконечником магнитных частиц, и удалить в контейнер для сброса.
30. Повторить пункты **27-29.**
31. Снять пробирки с магнитного штатива.
32. Высушить магнитные частицы **в течение 5 мин** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

33. В каждую пробирку внести **по 20 мкл H_2O стерильной** и аккуратно перемешать содержимое пробирки пипетированием около 10-15 раз.
34. Инкубировать содержимое пробирок **в течение 5 мин** при комнатной температуре (от 18 до 25 °С).
35. Поместить пробирки на магнитный штатив.
36. Выдержать пробирки на магнитном штативе **в течение 5 мин**, либо до полного осаждения частиц с открытыми крышками.
37. Перенести в одну новую одноразовую пробирку объемом 1,5 мл **по 18 мкл** надосадочной жидкости из каждой пробирки, находящейся на магнитном штативе.

Хранить полученную библиотеку от минус 24 до минус 16 °С. Данная смесь может храниться в течение 3 недель при температуре от минус 20 до минус 15 °С.

ЭТАП 11. ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ В СМЕШАННОМ ОБРАЗЦЕ ПОСЛЕ НОРМАЛИЗАЦИИ С ПОМОЩЬЮ АМПЛИФИКАЦИИ С ДЕТЕКЦИЕЙ В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

(проводится в ЗОНЕ 3)

1. Произвести количественную оценку концентрации полученной библиотеки.

   Для проведения количественной оценки рекомендуется использовать флуориметрические методы, специфичные для двухцепочечной ДНК, например, Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay System. При этом рекомендуется использовать 2 мкл каждого образца ДНК и 198 мкл рабочего раствора Qubit.
2. Произвести оценку средней длины фрагментов полученной библиотеки.

   Для проведения оценки качества полученной библиотеки рекомендуется использовать автоматическую станцию, основанную на методе гель-электрофореза (например, Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США).
3. Произвести расчет молярной концентрации библиотеки с помощью специализированных программ либо по формуле:

   $$Q[nM] = m[ng] \times 10^3 / Mw\ [kDa] \times 649$$

   Где Mw – средняя длина библиотеки [kDa]
4. Довести концентрацию полученной библиотеки до 4 нМ с помощью **H_2O стерильной**.
5. Приготовить разведение полученной библиотеки с концентрацией 40 пМ. Для этого в новую пробирку объемом 1,5 мл добавить **2 мкл** полученной библиотеки и **198 мкл H_2O стерильной**.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

6. Приготовить разведение полученной библиотеки с концентрацией 4 пМ. Для этого в новую пробирку объемом 1,5 мл добавить **10 мкл** полученного разведения **библиотеки 40 пМ** и **90 мкл H_2O стерильной.**
7. Разморозить **К+ NGS** в течение **5-10 мин.**
8. Приготовить разведения **К+ NGS**:
   - **К+ NGS 100 пМ**. Для этого в новую пробирку объемом 1,5 мл добавить **2 мкл К+ NGS** и **198 мкл H_2O стерильной.** Аккуратно перемешать пипетированием около 10-15 раз.
   - **К+ NGS 10 пМ**. Для этого в новую пробирку объемом 1,5 мл добавить **10 мкл** полученного разведения **К+ NGS 100 пМ** и **90 мкл H_2O стерильной.** Аккуратно перемешать пипетированием около 10-15 раз.
   - **К+ NGS 1 пМ**. Для этого в новую пробирку объемом 1,5 мл добавить **10 мкл** полученного разведения **К+ NGS 10 пМ** и **90 мкл H_2O стерильной.** Аккуратно перемешать пипетированием около 10-15 раз.
9. Разморозить **ПЦР-смесь-FL-P5 / P7, ПЦР-смесь-2-FRT, EvaGreen (20x)** в течение 5-10 мин.
10. В отдельной пробирке объемом 1,5 мл смешать последовательно реагенты:
    - **ПЦР-смесь-2-FRT** **100 мкл**
    - **Полимераза (TaqF)** **10 мкл**
    - **EvaGreen (20x)** **18 мкл**
    - **ПЦР-смесь-FL P5 / P7** **200 мкл**
11. Отобрать 18 пробирок (объёмом 0,2 мл) для амплификации исследуемых и контрольных образцов в соответствии со схемой 5.

Схема 5

Обозначение	Вносимый образец	Количество пробирок
1	К-	3
2	К+ NGS 100 пМ	3
3	К+ NGS 100 пМ	3
4	К+ NGS1 пМ	3
5	Образец 40 пМ	3
6	Образец 4 пМ	3

12. Внести в каждую пробирку по **15 мкл** приготовленной реакционной смеси.
13. В подготовленные пробирки с соответствующими обозначениями внести:
    - в три пробирки с надписью 1 (К-) внести **10 мкл H_2O стерильной,**
    - в три пробирки с надписью 2 внести **10 мкл К+ NGS 100 пМ,**
    - в три пробирки с надписью 3 внести **10 мкл К+ NGS 10 пМ,**

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

– в три пробирки с надписью 4 внести **10 мкл К+ NGS 1 пМ,**

– в три пробирки с надписью 5 внести **10 мкл образца 40 пМ,**

– в три пробирки с надписью 6 внести **10 мкл образца 4 пМ.**

14. Запрограммировать амплификатор с функцией детекции в режиме реального времени для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 13).

15. Поместить пробирки в прибор и запустить программу амплификации.

Таблица 13

Программа проведения реакции амплификации библиотек

1	95	15 мин	–	1
2	95	10 с	–	25
	59	20 с	–	
3	72	30 с	**FAM**	
4	4	хранение		

16. Рассчитать значения концентраций в образцах библиотеки: **образец 40 пМ** и **образец 4 пМ.**

Расчет значений концентраций в образцах библиотеки проводится на основании анализа данных флуоресценции с помощью построения калибровочной кривой зависимости порогового цикла (*Ct*) от логарифма концентрации стандарта. В качестве стандартов используются разведения **К+ NGS (100 пМ); К+ NGS (10 пМ); К+ NGS (1 пМ)**, заданные значения стандартов приведены в таблице 14. Использование интеркалирующего красителя EvaGreen приводит к формированию репортерного флуорецентного сигнала, величина которого прямо пропорциональна количеству продукта ПЦР.

Для стандартов **К+ NGS (100 пМ); К+ NGS (10 пМ); К+ NGS (1 пМ)** разница *Ct* должна составлять ~ 3,32 цикла.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Таблица 14

Заданные значения стандартов

[illegible]	[illegible]	[illegible]
K+ NGS (100 пМ)	Standart	100
K+ NGS (10 пМ)	Standart	10
K+ NGS (1 пМ)	Standart	1
K-	Negative control	-
Образец 40 пМ	Unknown	-
Образец 4 пМ	Unknown	-

Расчет значений концентрации для образца 40 пМ и 4 пМ производится на основании рассчитанной калибровочной кривой с помощью специализированного программного обеспечения, прилагаемого к используемому амплификатору с функцией детекции в режиме реального времени.

Расчет концентрации библиотеки производится по формуле:

$$Q_{lib}[pM] = (Q_{40}[pM]x10^2 + Q_4[pM]x10^3) / 2$$

где Q_{40} – усредненное значение, рассчитанное на основании данных измерения трех повторов молярной концентрации образца Q_{40}.

Q_4 – усредненное значение молярной концентрации образца Q_4, рассчитанное на основании данных измерения трех повторов молярной концентрации образца Q_4.

Q_{lib} – молярная концентрация библиотеки.

17. Довести концентрацию полученной библиотеки до 2 нМ с помощью **H_2O стерильной**. Данная смесь может храниться в течение 3 недель при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

ЭТАП 12. ДЕНАТУРАЦИЯ БИБЛИОТЕК.

(проводится в ЗОНЕ 3)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

1. Разморозить **буфер HT1**. После размораживания хранить **буфер HT1** при температуре 2-8 °С не более 36 часов.
2. Приготовить **0,2 М раствор NaOH**.
   - Для этого вынуть флакон с сухой навеской NaOH (0,4 г) из морозильной камеры. Аккуратно добавить во флакон **5 мл H_2O стерильной**, плотно закрутить крышку флакона и перевернуть флакон 5-10 раз. Подождать до полного растворения кристаллов. Полученный раствор содержит

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2,0 М раствора NaOH.

- Подготовить пробирку 1,5 мл. Перенести **100 мкл 2,0 М раствора NaOH** в подготовленную пробирку на 1,5 мл и добавить **900 мкл H_2O стерильной**. Перевернуть пробирку несколько раз для полного смешивания компонентов раствора. Полученный раствор содержит **0,2 М раствора NaOH**.

0,2 М раствор NaOH может храниться в течение 36 часов при температуре от 2 до 8 °С.

Разведение и денатурация контрольной библиотеки К+ NGS.

3. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
   - **H2O стерильная – 3 мкл,**
   - **К+ NGS** (исходная концентрация реагента 10 нМ) – **2 мкл**.
4. Перемешать полученную смесь на вортексе. Центрифугировать пробирку в течение **30 сек при 2400 об/мин**. Смесь содержит **4 нМ раствор контрольной библиотеки К+ NGS**.
5. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
   - **0,2 М раствор NaOH – 5 мкл,**
   - **4 нМ раствор контрольной библиотеки К+ NGS – 5 мкл**.
6. Перемешать полученную смесь на вортексе. Центрифугировать пробирку в течение **1 мин** при 2400 об/мин.
7. Инкубировать пробирку со смесью при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) строго **в течение 5 мин**.
8. Добавить в пробирку с полученной смесью **990 мкл буфера HT1**.
9. Перемешать полученную смесь на вортексе. Центрифугировать пробирку в течение **1 мин** при 2400 об/мин.
10. Подготовленную смесь хранить в течение 3 нед при температуре от минус 24 до минус 16 °С либо сразу перейти к следующей стадии. Полученная смесь содержит **20 пМ денатурированной контрольной библиотеки К+ NGS** в 1 мМ растворе NaOH.
11. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
    - **20 пМ денатурированной контрольной библиотеки К+ NGS – 375 мкл,**
    - **буфера HT1 – 225 мкл**.
12. Перевернуть пробирку несколько раз для полного смешивания компонентов раствора.
13. Подготовленную смесь хранить в течение 3 нед при температуре от минус 24 до минус 16 °С либо сразу перейти к следующей стадии. Полученная смесь

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

содержит **12,5 пМ разведенной и денатурированной контрольной библиотеки К+ NGS.**

Разведение и денатурация исследуемой библиотеки.

14. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
   - **0,2 М раствора NaOH – 5 мкл,**
   - **2 нМ раствора исследуемой библиотеки – 5 мкл (полученной на ЭТАПЕ 11).**
15. Перемешать полученную смесь на вортексе. Центрифугировать пробирку в течение **1 мин** при 2400 об/мин.
16. Инкубировать пробирку со смесью при комнатной температуре (от 18 до 25 °С) строго **в течение 5 мин.**
17. Добавить в пробирку с полученной смесью **990 мкл буфера НТ1.**
18. Перемешать полученную смесь на вортексе. Центрифугировать пробирку в течение **1 мин** при 2400 об/мин. Подготовленную смесь не хранить! Смесь содержит **разведенную и денатурированную исследуемую библиотеку.**
19. Смешать в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:
   - разведенную и денатурированную контрольную библиотеку К+ NGS – **30 мкл,**
   - разведенную и денатурированную исследуемую библиотеку – **570 мкл.**

ВНИМАНИЕ! Полученная смесь не хранится, необходимо сразу же перейти к следующему этапу.

ЭТАП 13. СЕКВЕНИРОВАНИЕ. ПОДГОТОВКА КАРТРИДЖА И ПРОТОЧНОЙ ЯЧЕЙКИ MISeq К РАБОТЕ. ЗАПУСК СЕКВЕНИРОВАНИЯ

(проводится в ЗОНЕ 3)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зоне 1 и зоне 2.

Подготовку и запуск прибора проводят следуя рекомендациям производителя генетического секвенатора MiSeq (Illumina Inc., США) с использованием **Набора буферов для секвенирования MiSeq (v2 Reagent Tray 500 cycles или v3 Reagent Tray 600 cycles), буфера PR2 и Проточной ячейки PE MiSeq Flow Cell из «Комплекта для массового параллельного секвенирования».**

ЭТАП 14. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обработка и клиническая интерпретация полученных результатов с помощью специального ПО «ДЕОНА NGS» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Россия). Для этого, файлы прочтений, полученные по завершении работы секвенатора, переносятся на сервер, где установлено «Программное обеспечение для определения устойчивости ВИЧ к антиретровирусной терапии на основе секвенирования нового поколения».

Проведение анализа и интерпретации результатов исследования лекарственной устойчивости ВИЧ к ингибиторам протеазы, обратной транскриптазы, интегразы и вирусного тропизма.

1. Открыть веб-интерфейс «Программного обеспечения для определения устойчивости ВИЧ к антиретровирусной терапии на основе секвенирования нового поколения».
2. На вкладке «Запуски» нажать клавишу «Создать».
3. Заполнить необходимую (отмечена знаком «*») информацию о запуске и нажать клавишу «Сохранить».
4. На вкладке «Запуски» напротив созданного запуска нажать клавишу «Действия» и в открывшемся подменю выбрать пункт «Создать образец» для ручного ввода информации по образцам или «Импорт Образцов» для массовой загрузки информации из файла с описанием образцов.
5. На вкладке «Образцы» отметить образцы, для которых необходимо провести анализ и нажать клавишу «Создать анализы». После этого начнется процесс анализа образцов, о прогрессе которого можно узнать на вкладке «Анализы». По завершении работы алгоритма, статус образца на вкладке «Анализы» будет изменен на «Выполнен».

Получение данных об анализе и интерпретации результатов исследования лекарственной устойчивости ВИЧ к ингибиторам протеазы, обратной транскриптазы и интегразы и вирусного тропизма.

1. Нажать на интересующий образец во вкладке «Анализы».
2. Нажать клавишу «Файл отчета». Будет загружен отчет с данными устойчивости исследуемого вируса к АРВ-препаратам различных классов, вирусном тропизме, а также с данными качества исследуемой последовательности.
3. В случае необходимости сохранить файл нажать «Файл отчета (pdf) правой кнопкой мыши и выбрать пункт «Сохранить как...» и сохранить файл на локальном диске.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, всеми видами крытых транспортных средств. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-золь-Е», «Комплект для стабилизации РНК», «Комплект для нормализации и оценки качества библиотек», хранить при температуре от 2 до 8 °С. Калибратор *HIV*-Q, растворитель Q и тРНК 1 мкг/мкл (из комплекта реагентов «РИБО-золь-Е») хранить температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Комплекты реагентов «ОТ-ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS», «ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS», «Комплект для подготовки библиотек», «Комплект для индексации библиотек», «Комплект для оценки концентрации библиотек» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. X-Pure-1, раствор для отмывки 3 (из комплекта реагентов «Комплект для подготовки библиотек») хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Комплекты реагентов «Комплект для массового параллельного секвенирования, v2-500», «Комплект для массового параллельного секвенирования, v3-600» хранить при температуре от 2 до 8 °С. «Набор буферов для секвенирования MiSeq v2 Reagent Tray 500 cycles», «Набор буферов для секвенирования MiSeq v3 Reagent Tray 600 cycles» и «Буфер HT1» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Комплект реагентов «ЭФ NGS», а также с инсталляционный носитель информации с ПО «ДЕОНА NGS» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте. Маркер молекулярных масс, буфер для нанесения образцов, H2O стерильная (из комплекта реагентов «ЭФ NGS») хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Реагенты X-Pure-1 и раствор для отмывки 3 (из комплекта реагентов «ЭФ NGS»), хранить при температуре от 2 до 8 °С.

ВНИМАНИЕ! Не допускается замораживание/оттаивание реагентов из «Комплекта для подготовки библиотек», «Комплекта для массового параллельного секвенирования, v2-500», «Комплект для массового параллельного секвенирования, v3-600».

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик набора реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS» направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: cs@pcr.ru[11].

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации набора реагентов, рекомендуется направить сообщение по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ Е.Н. Родионова

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

Главный врач ФГБУЗ ГЦГ и Э ФМБА России С.А. Богдан

[11] Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

REF	Номер по каталогу
LOT	Код партии
IVD	Медицинское изделие для диагностики *in vitro*
VER	Дата изменения
	Температурный диапазон
	Изготовитель
	Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению
Σ	Содержимого достаточно для проведения n-количества тестов
	Использовать до
	Обратитесь к инструкции по применению
	Не допускать воздействия солнечного света
	Дата изготовления

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 53 лист

Заместитель директора по эпидемиологии - Врио
директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.Г. Акимкин

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ФБУН «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

111123, Москва, ул. Новогиреевская 3а тел. (495) 974-96-46, факс : (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов для выявления мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) к антиретровирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим массовым параллельным секвенированием продуктов амплификации
«АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS»

Форма 1	LOT **10.11.16**	**10.11.16** **10.11.17**

ТУ 9398-240-01897593-2015.
Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Образцы контрольной панели «РНК вируса иммунодефицита человека типа 1» с концентрацией порядка 10^5, 10^4, 10^3 копий/мл	Наличие специфических светящихся полос, соответствующих амплифицированным фрагментам A, B, C и D ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) на уровне фрагментов ДНК маркера молекулярных масс (фрагмент A – 2343 п.н., фрагмент B – 2618 п.н., фрагмент C – 2566 п.н., фрагмент D – 2620 п.н.)	соответствует
Образцы контрольной панели «РНК вируса иммунодефицита человека типа 1» с концентрацией порядка 10^5, 10^4, 10^3 копий/мл Для форм комплектации 1 и 2	Определена нуклеотидная последовательность, удовлетворяющая условиям валидности, описанные в инструкции к набору реагентов	соответствует
Положительный контроль экстракции (ПК) - Калибратор *HIV*-Q	Наличие специфических светящихся полос, соответствующих размеров: фрагмент A – 2343 п.н., фрагмент B – 2618 п.н., фрагмент C – 2566 п.н., фрагмент D – 2620 п.н. при электрофоретической детекции	соответствует
Отрицательный контроль экстракции (ОК) - ОКО	Отсутствие специфических светящихся полос при электрофоретической детекции	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации		
Раствор A	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор B	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор C	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор D	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор E	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
тРНК 1 мкг/мкл	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Гликоген 1%	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Калибратор *HIV*-Q	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Растворитель Q	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор A	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
2-меркаптоэтанол	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
0,05% раствор SDS	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ОТ-ПЦР-смесь-1-A ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ОТ-ПЦР-смесь-1-B ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ОТ-ПЦР-смесь-1-C ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3

Форма 1: REF NG-V0-F-1-S; **Форма 2:** REF NG-V0-F-2-S; **Форма 3:** REF NG-V0-F-3-S

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации		
ОТ-ПЦР-смесь-1-D ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
HI-FI Reaction Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
HI-FI Enzyme Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ПЦР-смесь-1-A ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ПЦР-смесь-1-B ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ПЦР-смесь-1-C ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ПЦР-смесь-1-D ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Q5 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Q5 полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	соответствует	1	2	3
Агароза для электрофореза ДНК	Порошок белого цвета	соответствует	1	2	3
Маркер молекулярных масс	Прозрачная жидкость синего цвета	соответствует	1	2	3
Буфер для нанесения образцов	Прозрачная жидкость синего цвета	соответствует	1	2	3
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
X-Pure-1	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	соответствует	1	2	3
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Смесь TpM	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Буфер TpM-A (5x)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Буфер TpM-B	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Q5 полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Q5 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
дНТФ (1,76 mM)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
X-Pure-1	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	соответствует	1	2	
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №701 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №702 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №703 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №704 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №705 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №706 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №501 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №502 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №503 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №504 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №505 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №506 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №507 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №508 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
X-Pure-1	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	соответствует	1	2	
X-Pure-2	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	соответствует	1	2	
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	

Форма 1: REF NG-V0-F-1-S; **Форма 2:** REF NG-V0-F-2-S; **Форма 3:** REF NG-V0-F-3-S

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации		
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
EvaGreen (20x)	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	соответствует	1	2	
ПЦР-смесь-FL P5 / P7	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
K+ NGS	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
NaOH, сухая навеска	Таблетки белого цвета	соответствует	1	2	
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Набор буферов для секвенирования MiSeq v2 Reagent Tray 500 cycles	Картридж, содержащий 14 лунок с прозрачной бесцветной жидкостью, 4 пустые лунки, 2 лотка с бесцветной жидкостью, 1 лоток с окрашенной жидкостью	соответствует	1		
Набор буферов для секвенирования MiSeq v3 Reagent Tray 600 cycles	Картридж, содержащий 14 лунок с прозрачной бесцветной жидкостью, 4 пустые лунки, 2 лотка с бесцветной жидкостью, 1 лоток с окрашенной жидкостью	соответствует		2	
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Буфер PR2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Проточная ячейка PE MiSeq Flow Cell	Флакон, содержащий прозрачную бесцветную жидкость, в которую погружена проточная ячейка (пластина из стекла и пластика)	соответствует	1	2	

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Комплекты реагентов «РИБО-золь-Е», «Комплект для стабилизации РНК», «Комплект для нормализации и оценки качества библиотек», хранить при температуре от 2 до 8 °С. Калибратор *HIV*-Q, растворитель Q и тРНК 1 мкг/мкл (из комплекта реагентов «РИБО-золь-Е») хранить температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Комплекты реагентов «ОТ-ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS», «ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS», «Комплект для подготовки библиотек», «Комплект для индексации библиотек», «Комплект для оценки концентрации библиотек» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. X-Pure-1, раствор для отмывки 3 (из комплекта реагентов «Комплект для подготовки библиотек») хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Комплекты реагентов «Комплект для массового параллельного секвенирования, v2-500», «Комплект для массового параллельного секвенирования, v3-600» хранить при температуре от 2 до 8 °С. «Набор буферов для секвенирования MiSeq v2 Reagent Tray 500 cycles», «Набор буферов для секвенирования MiSeq v3 Reagent Tray 600 cycles» и «Буфер HT1» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Комплект реагентов «ЭФ NGS», а также с инсталляционный носитель информации с ПО «ДЕОНА NGS» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте. Маркер молекулярных масс, буфер для нанесения образцов, H2O стерильная (из комплекта реагентов «ЭФ NGS») хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Реагенты X-Pure-1 и раствор для отмывки 3 (из комплекта реагентов «ЭФ NGS»), хранить при температуре от 2 до 8 °С.

ВНИМАНИЕ! Не допускается замораживание/оттаивание реагентов из «Комплекта для подготовки библиотек», «Комплекта для массового параллельного секвенирования, v2-500», «Комплект для массового параллельного секвенирования, v3-600».

Дата выдачи **10.11.16**

ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ГРУППА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Руководитель ГКК (подпись) (Наумкина Е.М.)
(Ф.И.О.)

Форма 1: REF NG-V0-F-1-S; **Форма 2:** REF NG-V0-F-2-S; **Форма 3:** REF NG-V0-F-3-S

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 3 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.Малеев

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ФБУН «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

111123, Москва, ул. Новогиреевская 3а тел. (495) 974-96-46, факс : (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов для выявления мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) к антиретровирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим массовым параллельным секвенированием продуктов амплификации
«АмплиСенс® *HIV*-Resist-NGS»

Форма 2	LOT **11.11.16**	**11.11.16** **11.11.17**

ТУ 9398-240-01897593-2015.
Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Образцы контрольной панели «РНК вируса иммунодефицита человека типа 1» с концентрацией порядка 10^5, 10^4, 10^3 копий/мл	Наличие специфических светящихся полос, соответствующих амплифицированным фрагментам A, B, C и D ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) на уровне фрагментов ДНК маркера молекулярных масс (фрагмент A – 2343 п.н., фрагмент B – 2618 п.н., фрагмент C – 2566 п.н., фрагмент D – 2620 п.н.)	соответствует
Образцы контрольной панели «РНК вируса иммунодефицита человека типа 1» с концентрацией порядка 10^5, 10^4, 10^3 копий/мл Для форм комплектации 1 и 2	Определена нуклеотидная последовательность, удовлетворяющая условиям валидности, описанные в инструкции к набору реагентов	соответствует
Положительный контроль экстракции (ПК) - Калибратор *HIV*-Q	Наличие специфических светящихся полос, соответствующих размеров: фрагмент A – 2343 п.н., фрагмент B – 2618 п.н., фрагмент C – 2566 п.н., фрагмент D – 2620 п.н. при электрофоретической детекции	соответствует
Отрицательный контроль экстракции (ОК) - ОКО	Отсутствие специфических светящихся полос при электрофоретической детекции	соответствует

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации		
Раствор A	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор B	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор C	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор D	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор E	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
тРНК 1 мкг/мкл	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Гликоген 1%	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Калибратор *HIV*-Q	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Растворитель Q	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Раствор A	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
2-меркаптоэтанол	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
0,05% раствор SDS	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ОТ-ПЦР-смесь-1-A ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ОТ-ПЦР-смесь-1-B ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ОТ-ПЦР-смесь-1-C ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3

Форма 1: REF NG-V0-F-1-S; **Форма 2:** REF NG-V0-F-2-S; **Форма 3:** REF NG-V0-F-3-S

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации		
ОТ-ПЦР-смесь-1-D ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
HI-FI Reaction Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
HI-FI Enzyme Mix	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ПЦР-смесь-1-A ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ПЦР-смесь-1-B ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ПЦР-смесь-1-C ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
ПЦР-смесь-1-D ВИЧ	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Q5 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Q5 полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	соответствует	1	2	3
Агароза для электрофореза ДНК	Порошок белого цвета	соответствует	1	2	3
Маркер молекулярных масс	Прозрачная жидкость синего цвета	соответствует	1	2	3
Буфер для нанесения образцов	Прозрачная жидкость синего цвета	соответствует	1	2	3
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
X-Pure-1	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	соответствует	1	2	3
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3
Смесь TpM	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Буфер TpM-A (5x)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Буфер TpM-B	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Q5 полимераза	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Q5 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
дНТФ (1,76 mM)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
X-Pure-1	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	соответствует	1	2	
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №701 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №702 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №703 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №704 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №705 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №706 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №501 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №502 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №503 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №504 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №505 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №506 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №507 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Индекс праймер №508 (5 пМ)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
X-Pure-1	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	соответствует	1	2	
X-Pure-2	Прозрачная бесцветная жидкость, содержащая мелкодисперсные частицы бурого цвета	соответствует	1	2	
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
ПЦР-смесь-2-FRT	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	

Форма 1: REF NG-V0-F-1-S; **Форма 2:** REF NG-V0-F-2-S; **Форма 3:** REF NG-V0-F-3-S

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации		
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
EvaGreen (20x)	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	соответствует	1	2	
ПЦР-смесь-FL P5 / P7	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
K+ NGS	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
NaOH, сухая навеска	Таблетки белого цвета	соответствует	1	2	
H2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Набор буферов для секвенирования MiSeq v2 Reagent Tray 500 cycles	Картридж, содержащий 14 лунок с прозрачной бесцветной жидкостью, 4 пустые лунки, 2 лотка с бесцветной жидкостью, 1 лоток с окрашенной жидкостью	соответствует	1		
Набор буферов для секвенирования MiSeq v3 Reagent Tray 600 cycles	Картридж, содержащий 14 лунок с прозрачной бесцветной жидкостью, 4 пустые лунки, 2 лотка с бесцветной жидкостью, 1 лоток с окрашенной жидкостью	соответствует		2	
Буфер HT1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Буфер PR2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	
Проточная ячейка PE MiSeq Flow Cell	Флакон, содержащий прозрачную бесцветную жидкость, в которую погружена проточная ячейка (пластина из стекла и пластика)	соответствует	1	2	

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение.

Комплекты реагентов «РИБО-золь-Е», «Комплект для стабилизации РНК», «Комплект для нормализации и оценки качества библиотек», хранить при температуре от 2 до 8 °С. Калибратор *HIV*-Q, растворитель Q и тРНК 1 мкг/мкл (из комплекта реагентов «РИБО-золь-Е») хранить температуре от минус 24 до минус 16 °С. Комплекты реагентов «ОТ-ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS», «ПЦР-комплект-ВИЧ-NGS», «Комплект для подготовки библиотек», «Комплект для индексации библиотек», «Комплект для оценки концентрации библиотек» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. X-Pure-1, раствор для отмывки 3 (из комплекта реагентов «Комплект для подготовки библиотек») хранить при температуре от 2 до 8 °С.

Комплекты реагентов «Комплект для массового параллельного секвенирования, v2-500», «Комплект для массового параллельного секвенирования, v3-600» хранить при температуре от 2 до 8 °С. «Набор буферов для секвенирования MiSeq v2 Reagent Tray 500 cycles», «Набор буферов для секвенирования MiSeq v3 Reagent Tray 600 cycles» и «Буфер HT1» хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

Комплект реагентов «ЭФ NGS», а также с инсталляционный носитель информации с ПО «ДЕОНА NGS» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте. Маркер молекулярных масс, буфер для нанесения образцов, H2O стерильная (из комплекта реагентов «ЭФ NGS») хранить при температуре от минус 24 до минус 16 °С. Реагенты X-Pure-1 и раствор для отмывки 3 (из комплекта реагентов «ЭФ NGS»), хранить при температуре от 2 до 8 °С.

ВНИМАНИЕ! Не допускается замораживание/оттаивание реагентов из «Комплекта для подготовки библиотек», «Комплекта для массового параллельного секвенирования, v2-500», «Комплект для массового параллельного секвенирования, v3-600».

Дата выдачи **11.11.16**

ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ГРУППА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Руководитель ГКК (подпись) (Наумкина Е.М.)
(Ф.И.О.)

Форма 1: REF NG-V0-F-1-S; **Форма 2:** REF NG-V0-F-2-S; **Форма 3:** REF NG-V0-F-3-S

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено печатью _____ лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

_____ В.Малеев

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ФБУН «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭПИДЕМИОЛОГИИ»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

111123, Москва, ул. Новогиреевская 3А тел. (495)-974-96-42, факс (495)-305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru

ПАСПОРТ КАЧЕСТВА

Набора реагентов для определения тропизма и выявления мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) к антиретровирусным препаратам в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации «АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq»

Форма 4	LOT **25.12.16**	**2016-12-25** **2017-12-25**

ТУ 9398-013-01897593-2011
Комплектность, упаковка и маркировка набора указанной серии соответствуют требованиям ТУ.

1. Технические характеристики:

Наименование показателя	Норма	Результаты контроля
Образцы контрольной панели производства ВИЧ с концентрациями РНК ВИЧ-1 порядка 10^5, 10^4, 10^3 копий/мл	Появление специфических светящихся полос на электрофореграмме*	соответствует
Разведение образца контрольной панели производства ВИЧ с концентрацией РНК ВИЧ-1 порядка 10^3 копий/мл до концентрации 500 копий/мл (при экстракции из 200 мкл) или до концентрации 100 копий/мл (при экстракции из 1000 мкл)	Появление специфических светящихся полос на электрофореграмме*. Результат может быть получен для трех повторов из четырех	соответствует
Лейкоциты крови от ВИЧ-инфицированных доноров (при тестировании форм комплектации 3, 4, 7 и 8)	Появление специфической светящейся полосы на электрофореграмме, соответствующей фрагменту гена белка оболочки (*env*) на уровне 799 п.н.	соответствует
Лейкоциты крови от ВИЧ-негативных доноров с добавлением СОП ПКО ДНК ВИЧ-1 в концентрации 500 ГЭ/мл (при тестировании форм комплектации 3, 4, 7 и 8)	Появление специфической светящейся полосы на электрофореграмме, соответствующей фрагменту гена белка оболочки (*env*) на уровне 799 п.н.	соответствует
Высококонцентрированный положительный контроль (ВПК)	Появление специфических светящихся полос на электрофореграмме*	соответствует
Низкоконцентрированный положительный контроль (НПК)	Появление специфических светящихся полос на электрофореграмме*	соответствует
Отрицательный контроль экстракции (ОК)	Отсутствие специфических полос	соответствует

* соответствующих фрагментам генов протеазы (*pro*) (на уровне 570 п.н.), интегразы (*int*) (на уровне 1085 п.н.), обратной транскриптазы (*rev*) (на уровне 765 п.н.) и белка оболочки (*env*) (на уровне 424 п.н.)

Допускается появление неспецифических продуктов амплификации в виде шмеров или дополнительных полос, если при этом целевой ампликон хорошо отличим, и интенсивность (яркость) шмеров и дополнительных полос не превышает интенсивность целевого ампликона.

2. Состав, внешний вид:

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации							
Раствор А	Прозрачная вязкая жидкость желтого цвета	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Раствор В	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Раствор С	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Раствор D	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Раствор Е	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
тРНК 1 мкг/мкл	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Гликоген 1%	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8

Форма 1: REF TM-V0-50-F-1-S, **Форма 2**: REF TM-V0-50-F-2-S, **Форма 3**: REF TM-V0-50-F-3-S,
Форма 4: REF TM-V0-50-F-4-S, **Форма 5**: REF TM-V0-50-F-5, **Форма 6**: REF TM-V0-50-F-6,
Форма 7: REF TM-V0-50-F-7, **Форма 8**: REF TM-V0-50-F-8

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Наименование реагента / комплекта реагентов	Характеристика и нормы	Результаты контроля	В составе формы комплектации							
Калибратор *HIV*-Q	Порошок желтого цвета	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Растворитель Q	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета	соответствует			3	4			7	8
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует			3	4			7	8
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует			3	4			7	8
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует			3	4			7	8
ПКО ДНК ВИЧ-1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует			3	4			7	8
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует			3	4			7	8
ОТ-ПЦР-смесь-1 Pro/Rev	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2		4	5	6		8
ОТ-ПЦР-смесь-2-SO4	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
ПЦР-смесь-1 Pro	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2		4	5	6		8
ПЦР-смесь-1 Rev	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2		4	5	6		8
ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
ОТ-ПЦР-смесь-1 Int	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2		4		6		8
ПЦР-смесь-1 Int	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2		4		6		8
ОТ-ПЦР-смесь-1 Env	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует			3	4			7	8
ПЦР-смесь-1 Env	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует			3	4			7	8
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Сорбент	Суспензия белого цвета	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
H_2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Агароза для электрофореза ДНК	Порошок белого цвета	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Праймер Pro-1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2		4	5	6		8
Праймер Pro-2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2		4	5	6		8
Праймер Rev-1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2		4	5	6		8
Праймер Rev-2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2		4	5	6		8
Праймер Rev-3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2		4	5	6		8
Праймер Rev-4	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2		4	5	6		8
Маркер молекулярных масс	Прозрачная жидкость синего цвета	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Буфер для нанесения образцов	Прозрачная жидкость синего цвета	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Раствор F	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Раствор для денатурации	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4	5	6	7	8
Праймер Int-1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2		4		6		8
Праймер Int-2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2		4		6		8
Праймер Int-3	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2		4		6		8
Праймер Int-4	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует		2		4		6		8
Праймер Env-1	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует			3	4			7	8
Праймер Env-2	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует			3	4			7	8
Смесь Seq	Прозрачная жидкость розового цвета	соответствует	1	2	3	4				
5x буфер Seq	Прозрачная бесцветная жидкость	соответствует	1	2	3	4				

Форма 1: REF TM-V0-50-F-1-S, **Форма 2**: REF TM-V0-50-F-2-S, **Форма 3**: REF TM-V0-50-F-3-S, **Форма 4**: REF TM-V0-50-F-4-S, **Форма 5**: REF TM-V0-50-F-5, **Форма 6**: REF TM-V0-50-F-6, **Форма 7**: REF TM-V0-50-F-7, **Форма 8**: REF TM-V0-50-F-8

3. Условия транспортирования и хранения:

Транспортирование. Набор реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «РИБО-золь-Е», «РИБО-преп» и «Ампли-сорб», а также реагенты ГЕМОЛИТИК, раствор для лизиса, раствор для преципитации, ПКО ДНК ВИЧ-1 и ОКО хранить при температуре от 2 до 8 °С. тРНК 1 мкг/мкл, калибратор *HIV*-Q и растворитель Q (из комплекта реагентов «РИБО-золь-Е») хранить температуре температуре не выше минус 16 °С.

Комплекты реагентов «ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev», «ОТ-ПЦР-комплект-Int», «ОТ-ПЦР-комплект-Env», «ПЦР-комплект-Pro/Rev», «ПЦР-комплект-Int», «ПЦР-комплект-Env», «Комплект для подготовки к секвенированию Pro/Rev», «Комплект для подготовки к секвенированию Int», «Комплект для подготовки к секвенированию Env», «Комплект для секвенирования» хранить при температуре не выше минус 16 °С.

«Комплект для секвенирования» хранить в защищенном от света месте.

Комплект реагентов «ЭФ» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

ВНИМАНИЕ! Не допускается замораживание/оттаивание реагентов из «Комплекта для секвенирования» и раствора для денатурации из «Комплекта для подготовки к секвенированию» более двух раз.

Дата выдачи **25.12.16**

ФБУН ЦНИИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА
ГРУППА КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА

Руководитель ГКК (подпись) (Наумкина Е.М.)
(Ф.И.О.)

Форма 1: REF TM-V0-50-F-1-S, **Форма 2**: REF TM-V0-50-F-2-S, **Форма 3**: REF TM-V0-50-F-3-S, **Форма 4**: REF TM-V0-50-F-4-S, **Форма 5**: REF TM-V0-50-F-5, **Форма 6**: REF TM-V0-50-F-6, **Форма 7**: REF TM-V0-50-F-7, **Форма 8**: REF TM-V0-50-F-8

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 3 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

В.В.Матеев

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

«УТВЕРЖДАЮ»
Зам. директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.В. Малеев
«09» октября 2017 г.

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ К АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Руководство пользователя

«ДЕОНА NGS»

Версия 1.0.0 (02/11/2015)

2017

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

АННОТАЦИЯ

В данном программном документе приведена инструкция по работе с интерфейсом программы «Программное обеспечение для определения устойчивости ВИЧ к антиретровирусной терапии на основе секвенирования нового поколения» версия 1.0.0 (02/11/2015) (далее ПО «ДЕОНА NGS», программа).

СОДЕРЖАНИЕ

АННОТАЦИЯ....2
СОДЕРЖАНИЕ....3
ТЕРМИНЫ И СОКРАЩЕНИЯ....4
1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПРОГРАММЕ....5
2. ВХОД В ПРОГРАММУ....6
3. ИНТЕРФЕЙС ПРОГРАММЫ....6
3.1. Вкладка «Запуски»....6
3.2. Создание и редактирование запусков....7
3.3. Создание и импорт образцов....8
3.4. Создание анализов....11
3.5. Просмотр результатов анализов....12
3.6. Создание и редактирование адаптеров, праймеров и референсных генотипов...14

ТЕРМИНЫ И СОКРАЩЕНИЯ

Сокращение/Понятие	Расшифровка/Определение
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ИИ	Ингибиторы интегразы
ИП	Ингибиторы протеазы
НИОТ	Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ННИОТ	Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ПО	Программное обеспечение
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РНК	Рибонуклеиновая кислота

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПРОГРАММЕ

Пациентам, инфицированным ВИЧ и получающим высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ), в случае ее неэффективности необходимо проводить исследование (тест) на устойчивость вируса к лекарственным препаратам. Этот тест помогает врачу контролировать и своевременно менять схему ВААРТ.

Основным подходом для тестирования чувствительности ВИЧ к лекарственным препаратам является анализ РНК вируса на наличие мутаций, приводящих к появлению устойчивости (резистентности). Метод массового параллельного секвенирования (одновременное параллельное секвенирование, высокопроизводительное секвенирование, секвенирование нового поколения – сокр. СНП или NGS, next generation sequencing) позволяет проводить полногеномное тестирование и выявлять мутации, присутствующие с низкой частотой (~1%) в популяции вируса, в большом количестве биологических образцов одновременно.

Назначением ПО «ДЕОНА NGS» является автоматизация всех этапов процесса обработки данных, полученных с помощью секвенаторов, работающих по технологии Illumina/Solexa (SBS – sequencing by synthesis), включая сборку последовательности генома, выявление мутаций и предсказание уровня устойчивости к антиретровирусным препаратам.

Класс безопасности ПО – Класс А (невозможны никакие травмы и ущерб здоровью).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2. ВХОД В ПРОГРАММУ

Для входа в программу необходимо ввести логин и пароль в соответствующей форме для авторизации:

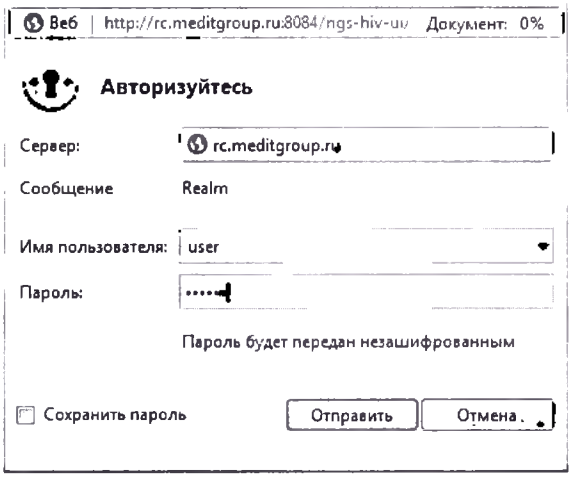

Рис.1. Поле для авторизации в программе

3. ИНТЕРФЕЙС ПРОГРАММЫ

3.1. Вкладка «Запуски»

При успешной авторизации на экране отобразится интерфейс программы, а именно вкладка «Запуски»:

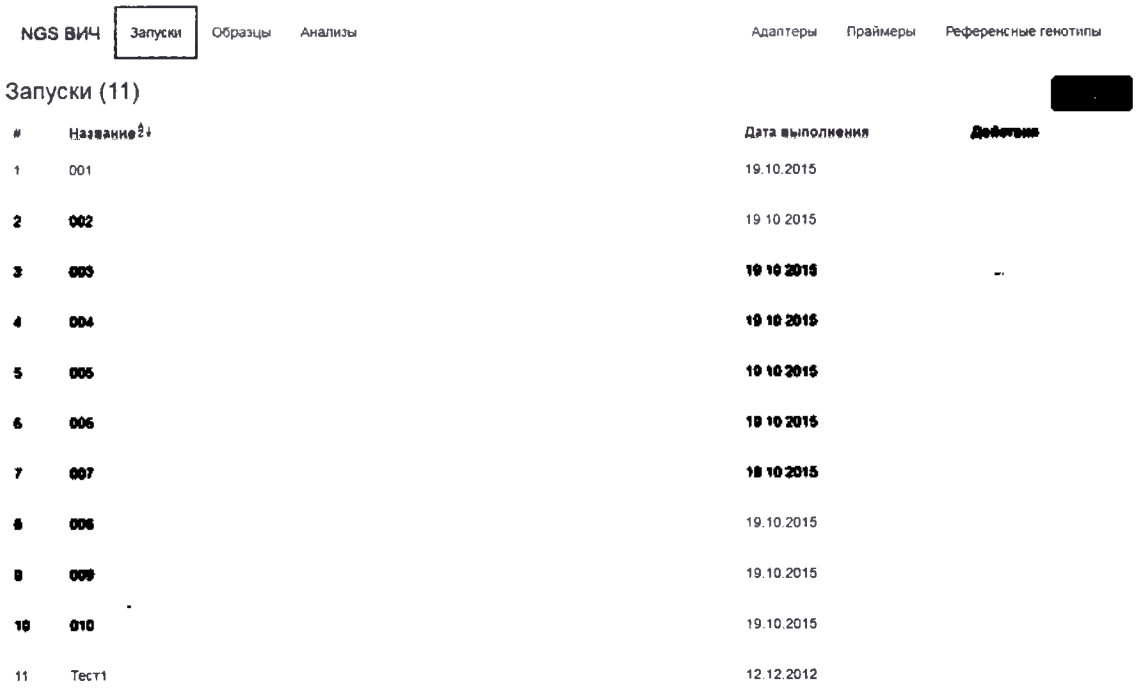

Рис.2. Интерфейс программы

На странице отображается список существующих запусков. Имеется функция сортировки списка по столбцам «Назначение» и «Дата выполнения». Для сортировки необходимо кликнуть мышью по названию столбца.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3.2. Создание и редактирование запусков

Для создания нового запуска необходимо кликнуть мышью по кнопке «Создать» на странице «Запуски». Для редактирования уже созданного запуска необходимо выбрать его из списка и кликнуть по нему мышью. В обоих случаях отобразится страница создания\ редактирования запуска:

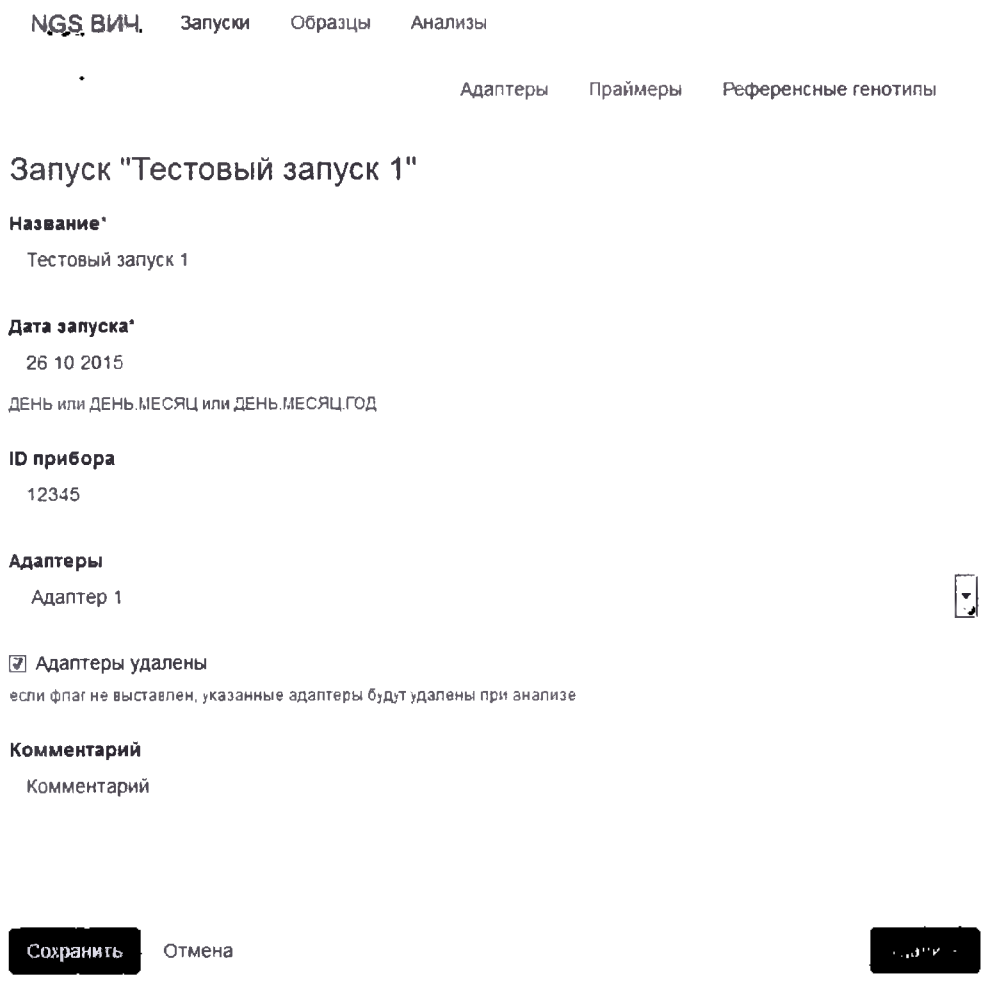

Рис.3 Редактирование запуска

Обязательные поля для заполнения:

- Название.
- Дата запуска.

Внесенные изменения можно сохранить или отменить, нажав на соответствующие кнопки в нижней части страницы. Также можно удалить уже созданный ранее и редактируемый в данный момент запуск (кнопка «Удалить»).

Ограничения полей:

1. Поле «Дата запуска» - при вводе некорректной даты или отличных от цифр символов под полем отображается информационное сообщение:
   «Указана некорректная дата (должно быть с 01.01.1900 по 19.10.2015)».

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2. Чекбокс «Адаптеры удалены» становится активным только при выбранном адаптере из выпадающего списка поля «Адаптеры».

После заполнения нужных полей нажать «Сохранить». На странице «Запуски» добавится созданный вами новый запуск.

3.3. Создание и импорт образцов

В столбце «Действия» напротив каждого запуска находится кнопка, при нажатии на которую отобразится выпадающий список действий над запуском:

Рис.4 Действия над запуском

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3.3.1. Создание нового образца

Для создания нового образца необходимо в списке действий над нужным запуском выбрать пункт «Создать образец». Откроется страница создания образца:

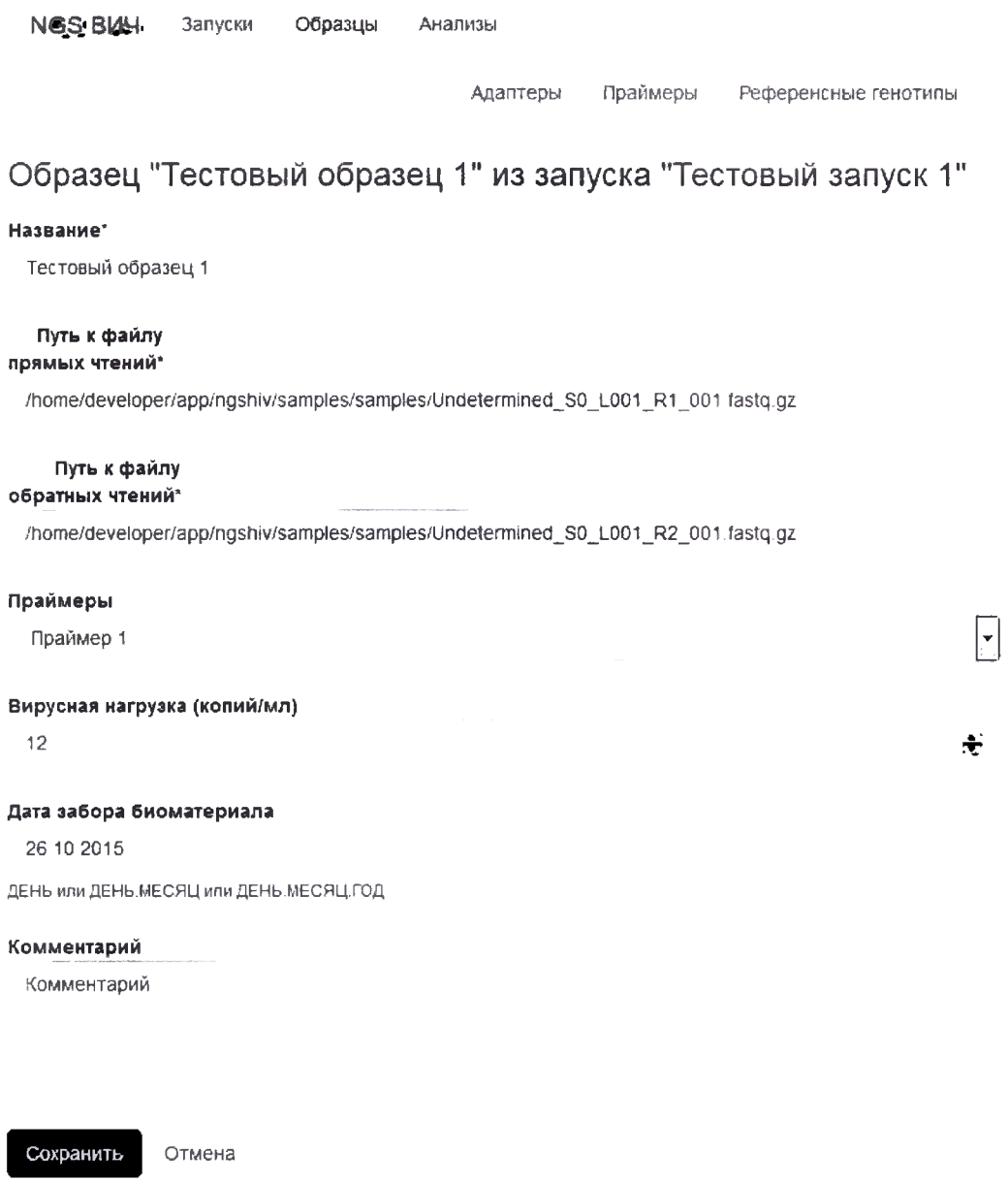

Рис.5 Страница создания нового образца

Поля, обязательные для заполнения:

- Название.
- Путь к файлу прямых чтений.
- Путь к файлу обратных чтений.

Ограничение поля "Вирусная нагрузка (копий/мл)":

"Необходимо указать число от 1 до 100 000 000" - отображается в виде подсказки под полем при некорректном вводе данных.

После заполнения полей необходимо нажать на кнопку «Сохранить».

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3.3.2. Импорт образцов

Для импорта образцов необходимо в списке действий над нужным запуском выбрать пункт «Импорт образцов». Откроется соответствующая страница:

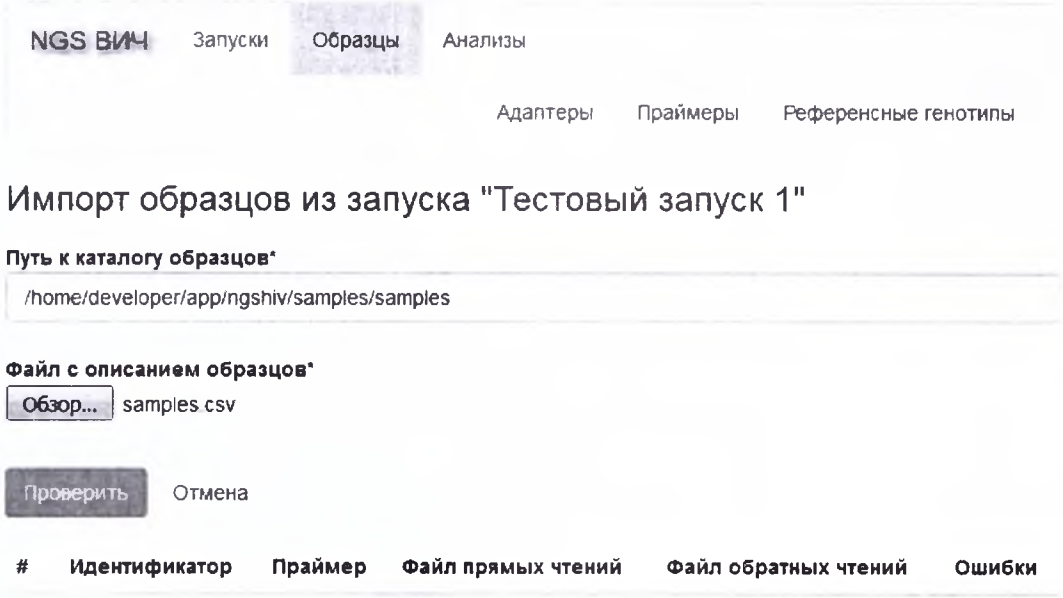

Рис.6 Страница импорта образцов

Обязательные поля для заполнения:

- Путь к каталогу образцов.
- Файл с описанием образцов (сам файл должен располагаться локально).

Для проверки соответствия данных между каталогом образцов и файлом с описанием образцов необходимо нажать кнопку «Проверить». Отобразится таблица со списком образцов:

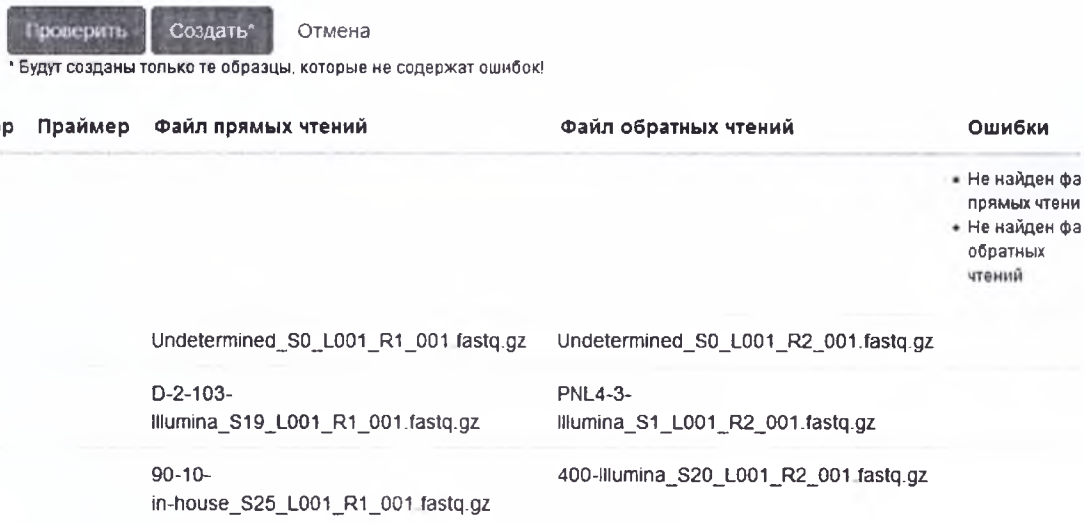

Рис.7 Таблица с результатами проверки образцов

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

В крайнем правом столбце отображается информация об ошибках, обнаруженных системой в процессе сравнения. Для создания образцов необходимо нажать кнопку «Создать». Ограничение: будут созданы только те образцы, которые не содержат ошибок.

Созданные образцы отображаются в соответствующей вкладке «Образцы». Для их редактирования достаточно кликнуть мышью по нужному из списка, отобразится страница, аналогичная странице создания нового образца. После внесения необходимых изменений нужно нажать кнопку «Сохранить».

3.4. Создание анализов

Для создания анализов необходимо перейти во вкладку «Образцы». На странице отображается список образцов, который можно отфильтровать по запуску (все запуски или один конкретный), а также отсортировать по идентификатору, названию запуска или дате запуска:

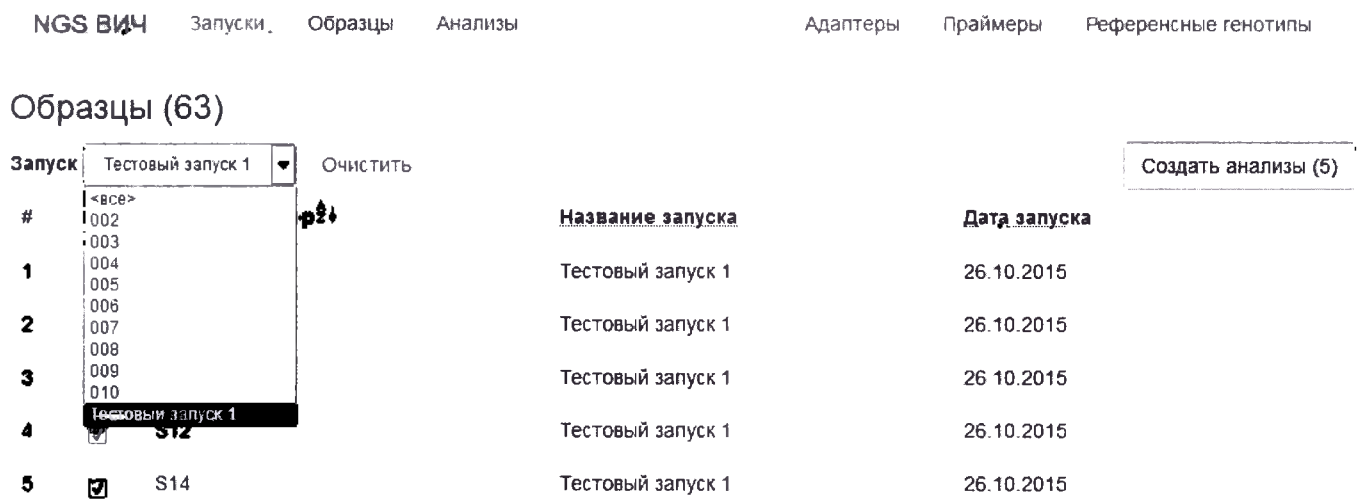

Рис.8 Вкладка «Образцы»

Выбрав нужные образцы, для которых необходимо создать анализы, нажимаем кнопку «Создать анализы». Выбрать нужные образцы можно как поштучно, так и по 50 штук сразу, поставив галочку в чекбоксе над списком образцов:

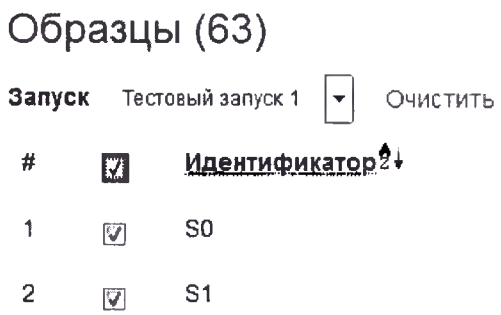

Рис.9 Чекбокс для выбора всех образцов на странице

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

После нажатия на кнопку «Создать анализы» отображаются дополнительные поля:

- Префикс названия анализа
- Суффикс названия анализа
- Референсные генотипы (обязательно для заполнения)
- Уровень значимости (число от 0,001 до 0,999)
- Мин. значение Phred Q (целое число от -5 до 41)
- Мин. частота мутаций (порог 1 и порог 2, числа от 0,0 до 1,0)
- Уровень значимости (один из предложенных вариантов)
- Мин. частота мутаций (число от 0,0 до 1,0)
- Мин. значение Phred Q (целое число от -5 до 41)
- Мин. глубина покрытия (целое число от 1 до 1000000)

Заполнив необходимые поля, нажимаем кнопку «Создать». Теперь анализы созданы и начали выполняться.

3.5. Просмотр результатов анализов

Для просмотра результатов анализов необходимо перейти на соответствующую вкладку «Анализы»:

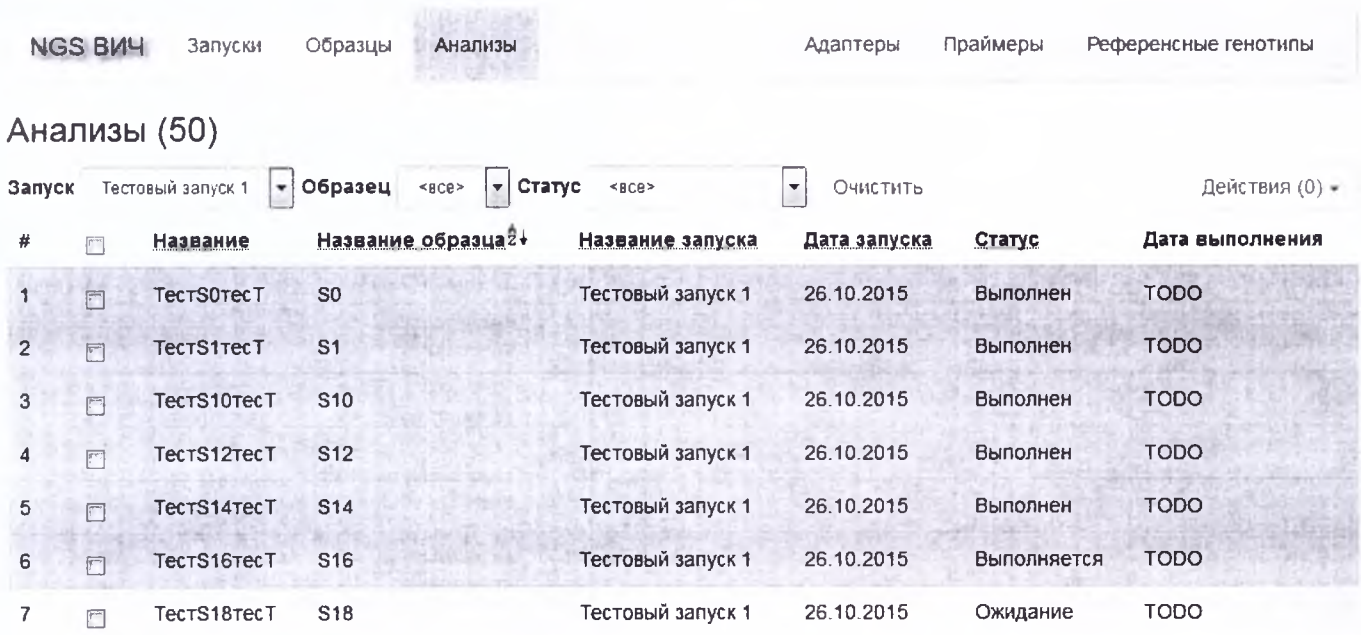

Рис.10 Вкладка «Анализы»

Список анализов можно отфильтровать по названиям запуска и образца, по статусу, а также отсортировать по всем полям кроме даты выполнения. Статусы готовности заказа: ожидание, выполняется, выполнен, ожидание отмены, отмена, ошибка. Обновление статусов анализов отображается по нажатию F5. Цветовая дифференциация анализов в списке отображается в соответствии с их статусом. Кликнув по нужному анализу в списке,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

попадем на страницу с информацией по данному анализу. В зависимости от степени готовности отобразятся следующие информационные поля:

- Название
- Вирусная нагрузка (копий/мл)
- Референсный генотип
- Поиск вариантов
- Предсказание лекарственной устойчивости
- Предсказание тропизма
- Покрытие
- Контроль качества
- Статус выполнения
- Дата выполнения
- Рабочие файлы программы анализа (3 файла, открывающиеся в новых вкладках)
- Результаты работы программы анализа (11 файлов, скачивающихся по ссылке)
- Отчеты программы анализа (2 отчета, в форматах HTML и PDF открываются в новых вкладках)
- Также на данной странице имеется кнопка удаления анализа.

Перед выводом отчета в формате PDF программа предложит **заполнить** дополнительные информационные поля (не являются обязательными):

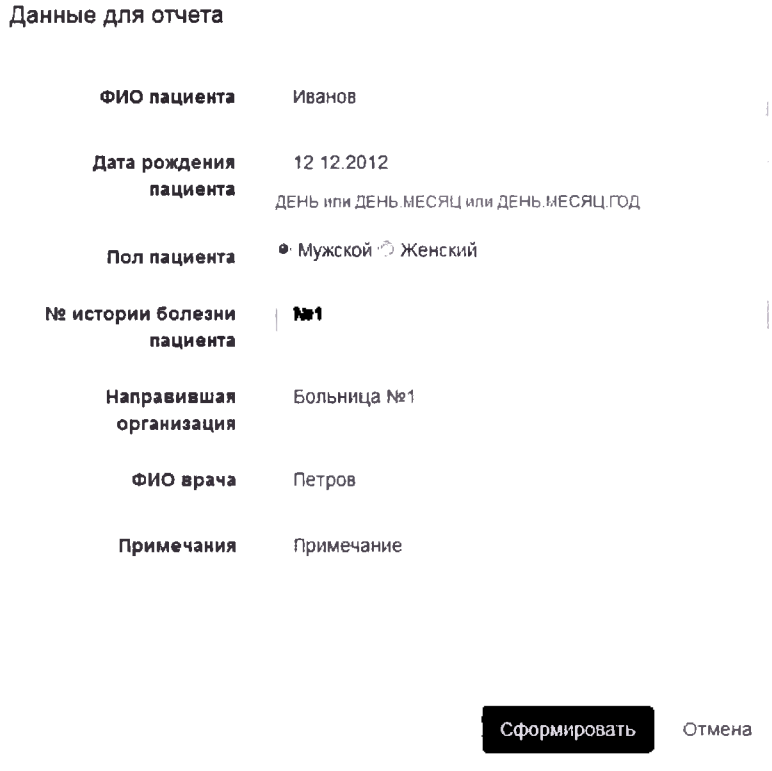

Рис.11 Информационные поля для отчета

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

После нажатия на кнопку «Оформить» отобразится требуемый отчет.

3.6. Создание и редактирование адаптеров, праймеров и референсных генотипов

Для создания нового адаптера, праймера или референсного генотипа необходимо открыть соответствующую вкладку и нажать кнопку «Создать». Отобразятся поля для заполнения данных. Рассмотрим на примере создания нового адаптера:

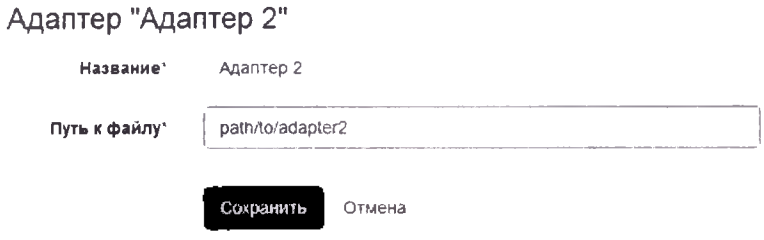

Рис.12 Страница создания нового адаптера

Заполнив оба обязательных поля, нажимаем кнопку «Сохранить. Также можно отменить внесенные изменения.

Для редактирования уже созданного адаптера необходимо кликнуть мышью по нужному адаптеру из списка. Откроется форма для редактирования:

Рис.13 Страница редактирования адаптера

После внесения изменений нажмите кнопку «Сохранить». Если же нужно удалить адаптер, жмем на кнопку «Удалить».

Аналогичным образом создаются и редактируются праймеры и референсные генотипы, принципы и набор полей для внесения данных идентичны.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 14 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора

_____ В.В.Малеев

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

«УТВЕРЖДАЮ»
Зам. директора Федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
_____ В.В. Малеев
«09» октября 2017 г.

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ВИЧ К АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Инструкция по установке

«ДЕОНА NGS»

Версия 1.0.0 (02/11/2015)

2017

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

АННОТАЦИЯ

В данном программном документе приведена инструкция по установке, настройке и использованию программы «Программное обеспечение для определения устойчивости ВИЧ к антиретровирусной терапии на основе секвенирования нового поколения» (далее ПО «ДЕОНА NGS», программа).

В данном программном документе, в разделе «Общие сведения о программе» указаны назначение и функции программы и сведения о технических и программных средствах, обеспечивающих выполнение данной программы.

В разделе «Структура программы» приведены сведения о структуре программы, ее составных частях, о связях между составными частями и о связях с другими программами.

В разделе «Установка программы» приведено описание действий по установке программы у конкретного пользователя.

В разделе «Проверка программы» приведено описание способов проверки, позволяющих дать общее заключение о работоспособности.

В разделе «Сообщения системному программисту» указаны тексты сообщений, выдаваемых в ходе выполнения настройки, проверки программы, а также в ходе выполнения программы, описание их содержания и действий, которые необходимо предпринять по этим сообщениям.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

СОДЕРЖАНИЕ

АННОТАЦИЯ....2
СОДЕРЖАНИЕ....3
ТЕРМИНЫ И СОКРАЩЕНИЯ....4
1.1. Назначение программы....5
1.2. Класс безопасности ПО....5
1.3. Функции программы....6
1.4. Минимальный состав технических средств....6
1.5. Минимальный состав программных средств....6
3. УСТАНОВКА ПРОГРАММЫ....9
4. ПРОВЕРКА ПРОГРАММЫ....10
5. СООБЩЕНИЯ СИСТЕМНОМУ ПРОГРАММИСТУ....11

ТЕРМИНЫ И СОКРАЩЕНИЯ

Сокращение/Понятие	Расшифровка/Определение
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
ИИ	Ингибиторы интегразы
ИП	Ингибиторы протеазы
НИОТ	Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ННИОТ	Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы
ПО	Программное обеспечение
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РНК	Рибонуклеиновая кислота

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ПРОГРАММЕ

1.1. Назначение программы

Пациентам, инфицированным ВИЧ и получающим высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ), в случае ее неэффективности необходимо проводить исследование (тест) на устойчивость вируса к лекарственным препаратам. Этот тест помогает врачу контролировать и своевременно менять схему ВААРТ.

Основным подходом для тестирования чувствительности ВИЧ к лекарственным препаратам является анализ РНК вируса на наличие мутаций, приводящих к появлению устойчивости (резистентности). Метод массового параллельного секвенирования (одновременное параллельное секвенирование, высокопроизводительное секвенирование, секвенирование нового поколения – сокр. СНП или NGS, next generation sequencing) позволяет проводить полногеномное тестирование и выявлять мутации, присутствующие с низкой частотой (~1%) в популяции вируса, в большом количестве биологических образцов одновременно.

Назначением ПО «ДЕОНА NGS» является автоматизация всех этапов процесса обработки данных, полученных с помощью секвенаторов, работающих по технологии Illumina/Solexa (SBS – sequencing by synthesis), включая сборку последовательности генома, выявление мутаций и предсказание уровня устойчивости к антиретровирусным препаратам.

1.2. Класс безопасности ПО

Класс А (невозможны никакие травмы и ущерб здоровью).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

1.3. Функции программы

Программа выполняет следующие функции:

- сборка консенсусной последовательности анализируемых участков генома ВИЧ;
- выявление присутствующих в популяции ВИЧ вариантов последовательности (однонуклеотидных замен, делеций и инсерций) и определение их популяционной частоты;
- идентификация мутаций, значимых для определения лекарственной устойчивости ВИЧ, и предсказание устойчивости к лекарственным препаратам всех существующих классов (НИОТ, ННИОТ, ИП, ИИ, антагонисты CCR5, ингибиторы фузии) с использованием внешних сервисов HIVdb[1], HIV-GRADE[2] и geno2pheno[3];
- контроль качества проведенного анализа;
- генерация отчета о результатах исследования;
- автоматическая выгрузка результатов анализа в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам[4].

1.4. Минимальный состав технических средств

Для работы ПО «ДЕОНА NGS» необходим IBM-совместимый персональный компьютер (ПЭВМ), удовлетворяющий следующим требованиям:

- процессор Intel Core i7 с тактовой частотой не менее 2,1 ГГц;
- не менее 16 ГБ оперативной памяти;
- не менее 1 ТБ свободного места на жестком диске;
- подключение к сети Интернет.

1.5. Минимальный состав программных средств

Программа рассчитана на работу в операционной системе на основе Linux/Unix. Дополнительно должно быть установлено следующее программное обеспечение:

- Java SE Runtime Environment версии 7 или выше;
- Интерпретатор языка Perl версии 5.18 или выше;
- Дополнительные модули Perl: Carp::Assert, Log::Log4perl, XML::LibXML, Mojo::DOM, LWP::UserAgent, HTML::Form, JSON, List::BinarySearch, Data::Types, SOAP::Lite, BioPerl;
- Интерпретатор языка R.

---

[1] http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra
[2] http://www.hiv-grade.de/
[3] http://www.genafor.org/services.php
[4] http://www.hivresist.ru/

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

2. СТРУКТУРА ПРОГРАММЫ

Структура дистрибутива ПО «ДЕОНА NGS» представлена на рис. 1.

```
ngshiv-1.0/
├── bin/
│   ├── lofreq
│   ├── myLap
│   └── samtools
├── data/
│   ├── adapters/
│   ├── consensus/
│   ├── aminoAcidCodes.txt
│   ├── BLOSUM62.mat
│   ├── config.xml
│   ├── countsAdjacent10000_1.5.csv
│   └── HXB2.fas
├── lib/
│   ├── jdom-2.0.5.jar
│   ├── picard-1.108.jar
│   ├── refAsm.jar
│   ├── sam-1.108.jar
│   ├── trimmomatic.jar
│   └── trove-3.0.3.jar
├── modules/
├── src/
├── test/
│   ├── project.json
│   ├── sample01_R1.fq.gz
│   ├── sample01_R2.fq.gz
│   ├── sample02_R1.fq.gz
│   └── sample02_R2.fq.gz
├── config.json
├── logger.conf
└── ngshiv
```

Рис. 1. Структура дистрибутива ПО «ДЕОНА NGS»

В таблице 1 описано назначение отдельных компонентов программы.

Таблица 1

Состав ПО «ДЕОНА NGS»

Имя файла/каталога	Назначение
lib/trimmomatic.jar	Предварительная обработка чтений, получаемых с секвенатора, включая удаление последовательностей адаптеров и праймеров ПЦР.
lib/refAsm.jar	Геномный сборщик. Строит множественное выравнивание чтений и собирает их в контиги на основе референсного генома.
bin/lofreq	Определение вариантов нуклеотидной последовательности (однонуклеотидных замен, делеций и инсерций).
bin/samtools	Чтение файлов в формате BAM.
bin/myLap	Парное выравнивание нуклеотидной и аминокислотной последовательностей алгоритмом Смита-Ватермана.
modules/	В этом каталоге содержатся модули приложения, отвечающие за взаимодействие с сервисами HIVdb, HIV-GRADE и geno2pheno, анализ качества, генерацию отчета, отправку результатов в Российскую базу данных устойчивости ВИЧ.
ngshiv	Исполняемый файл, запускаемый пользователем. Вызывает другие модули для осуществления различных этапов анализа данных.
config.json, logger.conf	Конфигурационные файлы приложения.
data/adapters/	В этом каталоге содержатся последовательности стандартных адаптеров, используемых секвенаторами Illumina.
src/	Исходный код компилируемых модулей приложения.
test/	Тестовый пример проекта, состоящего из двух образцов, sample01 и sample02. В качестве референсного генотипа в проекте используется файл data/HXB2.fas

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

3. УСТАНОВКА ПРОГРАММЫ

Установка ПО «ДЕОНА NGS» осуществляется путем копирования архива дистрибутива с инсталляционного носителя на жесткий диск компьютера. Затем производится распаковка архива дистрибутива в любом каталоге, например:

tar xzf ngshiv-1.0.tar.gz

ngshiv-1.0/ngshiv

Для запуска программы необходимо вводить имя исполняемого файла с добавлением пути к корневому каталогу дистрибутива в переменную окружения PATH.

4. ПРОВЕРКА ПРОГРАММЫ

Для проверки работоспособности программы можно выполнить прогон на тестовом примере, входящем в состав дистрибутива.

1) Перейдите в каталог test дистрибутива. Убедитесь, что он не содержит никаких подкаталогов; при необходимости, удалите их.
2) Запустите программу без параметров:

   ../ngshiv

Ожидаемые результаты:

- сообщения в консоли соответствуют нормальному сценарию работы программы (рис. 2);
- в каталоге test были созданы два подкаталога, sample01 и sample02, каждый из которых содержит файлы coverage.svg и report.html.

При получении сообщений об ошибках следует обратиться к разделу 5 данного документа.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

5. СООБЩЕНИЯ СИСТЕМНОМУ ПРОГРАММИСТУ

При нормальной работе программы на консоль оператора выдаются сообщения, отображающие текущий статус (рис. 2).

```
NGS HIV: HIV drug resistance prediction from next-generation sequencing data
[ngshiv] INFO: Analysing sample 'sample01'.
[ngshiv] INFO: Preparing reads...
[ngshiv] INFO: Assembling reads...
[ngshiv] INFO: Calculating coverage...
[ngshiv] INFO: Collecting AA variants...
[ngshiv] INFO: Calling variants...
[ngshiv] INFO: Predicting drug resistance at 0.010 threshold...
[ngshiv] INFO: Predicting drug resistance at 0.200 threshold...
[ngshiv] INFO: Predicting tropism...
[ngshiv] INFO: Finished 'sample01' analysis.
[ngshiv] INFO: Analysing sample 'sample02'.
[ngshiv] INFO: Assembling reads...
[ngshiv] INFO: Calculating coverage...
[ngshiv] INFO: Collecting AA variants...
[ngshiv] INFO: Calling variants...
[ngshiv] INFO: Predicting drug resistance at 0.010 threshold...
[ngshiv] INFO: Predicting drug resistance at 0.200 threshold...
[ngshiv] INFO: Predicting tropism...
[ngshiv] INFO: Finished 'sample02' analysis.
[ngshiv] INFO: Finished processing all samples.
```

Рис.2. Пример вывода программы «ДЕОНА NGS» на консоль

Кроме того, на консоль могут выдаваться сообщения об ошибках (табл. 2).

Таблица 2

Сообщения об ошибках

Сообщение об ошибке	Описание ошибки и возможные действия
can't open file 'xxx' for reading	Не удается открыть входной файл с именем xxx для чтения. Возможно, файл с таким именем не существует или у процесса нет прав на его чтение.
can't open file 'xxx' for writing	Не удается открыть выходной файл с именем xxx для записи. Возможно, имя файла недопустимо, или у процесса нет прав на его создание.
Failed loading project from 'xxx'	Ошибка при попытке загрузить файл проекта. Проверьте, что файл project.json находится в корневом каталоге проекта и имеет правильный формат.
failed to assemble reads	Не удалось произвести сборку чтений. Причинами могут быть ошибки при подготовке или секвенировании образца, контаминация.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Сообщение об ошибке	Описание ошибки и возможные действия
Service description can't be loaded	Ошибка при попытке установить соединение с соответствующим сервером. Проверьте подключение к сети Интернет. Возможно, сервис временно недоступен.
error connecting to geno2pheno server	
error connecting to HIV-GRADE server	
error connecting to hivresist server	
failed to login into hivresist database	Ошибка аутентификации в Российской базе данных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам. Проверьте, что указанные в проекте логин и пароль пользователя верны.
Failed processing sample 'xxx'	Ошибка при обработке образца xxx. В большинстве случаев после устранения причины ошибки достаточно повторно запустить приложение, чтобы анализ образца возобновился с того этапа, где он был прерван.

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено печатью 12 лист

Зам. директора ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора

_____ В.В.Малеев

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

NIH AIDS Reagent Program
20301 Century Boulevard
Building 6, Suite 200
Germantown, MD 20874
USA

Phone: 240 686 4740
Fax: 301 515 4015
aidsreagent.org

DATA SHEET

Reagent:	pNL4-3
Catalog Number:	114
Lot Number:	110199
Release Category:	C
Provided:	10µg purified plasmid DNA (1.0 µg/µl).
Cloning Vector:	pUC18
Cloning Site:	The 5´*Sma*I-*Eco*RI fragment of proviral NY5 (5´ *Sma*I in flanking sequences to 3´ *Eco*RI) and the 3´ fragment of proviral LAV (5´ *Eco*RI to 3´ *Nru*I in flanking sequences) were blunt-end cloned into pUC18 at the *Pvu*II site after removal of polylinker sites.
Gene Bank:	AF324493
Host Strain:	HB101
Description:	Full-length, replication and infection competent chimeric DNA.
Special Characteristics:	Upon transfection this clone directed the production of infectious virus particles in a wide variety of cells. The progeny, infectious virions, were synthesized in mouse, mink, monkey, and several non-T cell lines, indicating the absence of any intracellular obstacle to viral RNA or protein production or assembly. Source of Pro Virus: NY5 (5´) and LAV (3´) cloned directly from genomic DNA.

References:
Sequence File***Updated 14May10**
Plasmid Map
Organization and Restriction Sites

QC data

ALL RECIPIENTS OF THIS MATERIAL MUST COMPLY WITH ALL APPLICABLE BIOLOGICAL, CHEMICAL, AND/OR RADIOCHEMICAL SAFETY STANDARDS INCLUDING SPECIAL PRACTICES, EQUIPMENT, FACILITIES, AND REGULATIONS. NOT FOR USE IN HUMANS.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ecommended torage:	-70°C
ontributor:	Dr. Malcolm Martin.
eferences:	Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* **59**:284-291, 1986.
IOTE:	Acknowledgment for publications should read "The following reagent was obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4-3 from Dr. Malcolm Martin." Also include the reference cited above in any publications. **Scientists at for-profit institutions or who intend commercial use of this reagent must contact Dr. Sally Hu at the NIH Office of Technology Transfer, Email: hus@mail.nih.gov, Phone: 301-435-5606, before the reagent can be released. Please specify the name and a description of the intended use of the reagent.**
ast Updated:	November 12, 2013

ALL RECIPIENTS OF THIS MATERIAL MUST COMPLY WITH ALL APPLICABLE BIOLOGICAL, CHEMICAL, AND/OR RADIOCHEMICAL SAFETY STANDARDS INCLUDING SPECIAL PRACTICES, EQUIPMENT, FACILITIES, AND REGULATIONS. NOT FOR USE IN HUMANS.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Программа предоставления ВИЧ препаратов
Национальным институтом здоровья США
20301 Сенчури Бульвар
дом 6, пом. 200
Джермантаун, Мэриленд 20874
США

Тел. 240 686 4740
Факс 301 515 4015
aidsreagent.org

ТЕХНИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИКАЦИЯ

Реагент: pNL4-3

Каталожный номер: 114

Серия: 110199

Класс выпуска: C

Содержит: 10мкг очищенной плазмидной ДНК (1,0 мг/мкл).

Клонирующий вектор: pUC18

Сайт встраивания:
5'*Sma*I-*Eco*RI фрагмент провирусной NY5 (5´ *Sma*I во фланкирующих последовательностях к 3´*Eco*RI) и 3´ фрагмент провирусной LAV (5´ *Eco*RI к 3´ *Nru*I во фланкирующих последовательностях) были клонированы «тупыми концами» в pUC18 на *Pvu*II сайте после удаления полилинкерных сайтов.

Номер доступа в Gen Bank: AF324493

Штамм-хозяин: HB101

Описание: Полноразмерная, репликационно и инфекционно-компетентная химерная ДНК.

Особые характеристики:
После трансфекции этот клон нацелен на производство патогенных вирусных частиц в большом разнообразии клеток. Потомство, инфекционные вирионы, были синтезированы в клетках мыши, норки, обезьяны и нескольких не Т-клеточных линиях, что указывает на отсутствие какого-либо внутриклеточного препятствия размножению вирусной РНК или образованию или сборке белка. Источник провирусов: NY5 (5') и LAV (3') клонирован непосредственно из геномной ДНК.

Ссылки:
Файл сиквенса***Обновлен 14 мая 2010**
Карта плазмиды
Структура и сайты рестрикции

ОС данные

ВСЕ ПОЛУЧАТЕЛИ ДАННОГО МАТЕРИАЛА ДОЛЖНЫ СОБЛЮДАТЬ ВСЕ ДЕЙСТВУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ, ХИМИЧЕСКОЙ И / ИЛИ РАДИОХИМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ, В ТОМ ЧИСЛЕ В ЧАСТИ МЕТОДОВ РАБОТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И ПРИНАДЛЕЖНОСТЕЙ, А ТАКЖЕ ПРЕДУСОМТРЕННЫЕ ЗАКОНОМ ТРЕБОВАНИЯ.
НЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ НА ЛЮДЯХ

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Рекомендуемое Хранение: -70°C

Исследователь: Доктор Мальком Мартин.

Ссылки:

Адачи А, Гендельман ХЕ, Кениг С, Фолкс Т, Уилли Р, Рабсон А, Мартин МА. Создание ассоциированных с синдромом приобретенного иммунодефицита ретровирусов в клетках человека и животных, трансфектированных с помощью патогенного молекулярного клона. Дж Вирол 59: 284-291, 1986.

Примечание: Если вы признательны за публикации, укажите что "Следующий реагент был получен по программе NIH AIDS, отдел СПИДа, NIAID, NIH: pNL4-3 от доктора Малкольма Мартина". Также дайте ссылку вверху в любых публикациях. **Ученые некоммерческих институтов или те, кто намерен использовать этот реагент в коммерческих целях должны связаться с доктором Салли Ху в NIH Управлении по трансферу технологий, по E-mail: hus@mail.nih.gov или телефону: 301-435-5606, до выпуска реагента. Пожалуйста, укажите название реагента и назначение реагента.**

Последнее обновление: 12 Ноября 2013

ВСЕ ПОЛУЧАТЕЛИ ДАННОГО МАТЕРИАЛА ДОЛЖНЫ СОБЛЮДАТЬ ВСЕ ДЕЙСТВУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ, ХИМИЧЕСКОЙ И / ИЛИ РАДИОХИМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ, В ТОМ ЧИСЛЕ В ЧАСТИ МЕТОДОВ РАБОТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И ПРИНАДЛЕЖНОСТЕЙ, А ТАКЖЕ ПРЕДУСОМТРЕННЫЕ ЗАКОНОМ ТРЕБОВАНИЯ.
НЕ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ НА ЛЮДЯХ.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

Текст данного документа перевел с русского языка на английский язык переводчик Лагутеева Ирина Станиславовна

Город Москва.

Третьего марта две тысячи шестнадцатого года.

Я, Жлобо Игорь Геннадьевич, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи, сделанной переводчиком Лагутеевой Ириной Станиславовной в моем присутствии. Личность ее установлена.

Зарегистрировано в реестре за № 14-144

Взыскано по тарифу 100 рублей

Нотариус Жлобо И.Г.

НОТАРИУС ГОРОДА МОСКВЫ ЖЛОБО И.Г.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU