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

_____ В.Г. Акимкин

«20» августа 2021 г.

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ «АмплиСенс® Resist»

версия 01, дата выпуска 06.03.2020

Руководство оператора

RU.01897593.000001-01 34 01-1

АмплиСенс®

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

IVD

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

72967
12.10.2021

АННОТАЦИЯ

В данном программном документе описан порядок работы оператора с программным обеспечением «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020, входящим в состав медицинского изделия «Набор 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» по ТУ 9398-013-01897593-2011», РУ № ФСР 2008/02414 (далее – ПО).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72661
12.10.2021

СОДЕРЖАНИЕ

1 НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ 5
1.1 Функциональное назначение 5
1.2 Эксплуатационное назначение 5
1.3 Обозначение ПО 5
1.4 Дата выпуска ПО 5
1.5 Класс безопасности ПО 5
1.6 Принцип работы ПО 5
1.7 Краткое описание функциональных возможностей ПО 6
2 УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ 6
2.1 Требования к техническим средствам оператора 6
2.2 Требования к входным данным 7
3 ВХОД В ПО 7
3.1 Общие сведения о входе 7
3.2 Регистрация (первый вход) 7
3.3 Авторизация (повторный вход) 7
4 ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ 8
4.1 Создание нового проекта и загрузка файлов с прочтениями 8
4.2 Загрузка ранее сохраненного проекта 8
4.3 Работа с проектом 9
4.3.1 Описание рабочей области проекта 9
4.3.1.1 Команды управления проектом 9
4.3.1.2 Вкладка *Хроматограмма* 10
4.3.1.3 Вкладка *Контроль качества* 11
4.3.1.4 Вкладка *Мутации* 13
4.3.1.5 Окно хроматограмм и нуклеотидных последовательностей 13
4.3.1.6 Клавиши для редактирования нуклеотидной последовательности 15
4.3.2 Работа с нуклеотидной последовательностью 16
4.3.2.1 Контроль качества исследования 16
4.3.2.2 Скрытие участков 17
4.3.2.3 Редактирование нуклеотидной последовательности 17
4.3.2.4 Выравнивание последовательностей 21
4.3.2.5 Сохранение консенсуса в буфер обмена 22
4.3.3 Отчет с результатами исследования лекарственной устойчивости и определения тропизма 22
4.3.3.1 Формирование отчета 22
4.3.3.2 Описание лекарственной устойчивости/тропизма, выявленных мутаций и контроля качества исследования в отчете о результатах исследования 23
5 СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ 25
6 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА 26

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

ТЕРМИНЫ И СОКРАЩЕНИЯ

Сокращение	Расшифровка
БД	База данных
ВИЧ	Вирус иммунодефицита человека
Выравнивание	Способ сравнения двух и более нуклеотидных последовательностей относительно друг друга. Действие является необратимым
Вырожденная позиция	Позиция, в которой детектируется более одного нуклеотида
Консенсусная последовательность	Итоговая нуклеотидная последовательность исследуемого образца
Контроль качества исследования	Определение качества сборки, сформированной консенсусной последовательности с помощью следующих показателей: - Покрытие участка нуклеотидной последовательности - Наличие проблемных участков (стоп-кодоны, нетипичные мутации)
Клавиатура IUPAC	Виртуальная клавиатура с буквенными обозначениями нуклеотидов и их комбинаций в соответствии с номенклатурой Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC)
Некачественные секции	Секции, среднее качество сигнала которых не превышает значение 30 по данным параметра «pcon» файла Abif
Основной пик	Пик максимальной высоты в данной позиции на хроматограмме
Повторы	Несколько прочтений РНК/ДНК одного и того же клинического образца
Прочтение	Нуклеотидная последовательность, полученная в результате секвенирования
Проект	Сборка прочтений и проведение анализа для одного клинического образца
Профиль	Анализ нуклеотидной последовательности определенного фрагмента генома определенного возбудителя
Референсная последовательность	Нуклеотидная последовательность, относительно которой идет сборка и анализ хроматограмм исследуемого образца
Рамка считывания	Последовательность нуклеотидов, способная кодировать аминокислоту
Реверс-комплемент	Комплементарный перевод в обратном направлении имеющейся нуклеотидной последовательности
Сервер	Выделенный компьютер или его мощности (в том числе виртуальные) под управлением ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора для работы с ПО
Стоп-кодон	Последовательность нуклеотидов, кодирующая прекращение синтеза полипептидной цепи
СУБД	Система управления базами данных
Сильный подпик	Пик в одной позиции с основным пиком и имеющий высоту более 1/3 высоты этого пика
Слабый подпик	Пик в одной позиции с основным пиком и имеющий высоту менее 1/3 высоты этого пика
Трансляция	Перевод нуклеотидной последовательности в аминокислотную
gap	Отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в анализируемой последовательности относительно референсной последовательности
FPR	False positive rate (порог ложноположительного результата)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
ГОСТ 12.10.2021

1 НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ

1.1 Функциональное назначение

ПО предназначено для анализа и обработки нуклеотидных последовательностей для выявления лекарственной устойчивости возбудителей и/или определения тропизма.

1.2 Эксплуатационное назначение

Пользователями (операторами) ПО являются медицинские работники и научные сотрудники, владеющие молекулярно-генетическими методами работы, в том числе методами анализа и обработки нуклеотидных последовательностей с целью определения мутаций лекарственной устойчивости и тропизма различных возбудителей.

ПО функционирует в режиме «онлайн» и доступно операторам через интернет по адресу resist.amplisens.ru. Отчет о результатах исследования сохраняется на компьютере оператора в формате PDF.

1.3 Обозначение ПО

RU.89492021.00001-01, где две последние цифры обозначают номер издания (версии) ПО.

1.4 Дата выпуска ПО

06.03.2020

1.5 Класс безопасности ПО

Класс А (невозможны никакие травмы и ущерб здоровью).

1.6 Принцип работы ПО

ПО анализирует информацию, полученную с помощью генетического анализатора (секвенатора), которая содержит:

- координаты вершин, соответствующих позициям нуклеотидов,
- координаты сигналов нуклеотидов,
- нуклеотидные последовательности,
- показатели качества сигналов.

В автоматическом режиме происходит построение консенсусной последовательности, сравнение с референсными последовательностями, определение мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью. При анализе учитываются данные транслированной аминокислотной последовательности. Результат анализа выдается в виде отчета, содержащего

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

информацию о лекарственной устойчивости, о тропизме возбудителя или в виде консенсусной последовательности, которая может быть проанализирована внешними сервисами. Данный этап является заключительным этапом исследования в лаборатории.

Для проведения анализа оператор в ручном режиме осуществляет выбор профиля, создание нового проекта, загрузку результатов секвенирования, оценку результата контроля качества исследования, редактирование нуклеотидных последовательностей (прочтений), внесение данных об исследуемом образце.

В целях конфиденциальности ПО обрабатывает и хранит информацию в обезличенном виде (деперсонализировано).

1.7 Краткое описание функциональных возможностей ПО

- Сборка и визуализация консенсусной последовательности анализируемых участков генома возбудителя.
- Идентификация мутаций, значимых для определения лекарственной устойчивости возбудителя.
- Контроль качества исследования.
- Определение чувствительности к лекарственным препаратам и/или тропизма.
- Формирование отчета с результатами исследования или формирование консенсусной последовательности, с помощью которой можно получить результат анализа через внешние сервисы, рекомендуемые ВОЗ.

ПО соответствует требованиям ГОСТ Р ИСО/МЭК 9126, ГОСТ 28195, ГОСТ Р 51188, п. 4.3 ГОСТ Р МЭК 62304.

Руководство оператора и интерфейс программного обеспечения разработан на русском языке и может быть переведен на английский и другие языки без внесения изменений в программный код ПО.

2 УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОГРАММЫ

ВНИМАНИЕ! Работа с ПО возможна только после регистрации/авторизации оператора. Регистрация проводится при первом входе в ПО.

2.1 Требования к техническим средствам оператора

Для работы оператора необходим персональный компьютер с выходом в сеть «интернет» и предустановленным браузером «Google Chrome» или «Яндекс.Браузер».

Общие требования указаны в таблице 1.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Таблица 1

Характеристика	Минимальное значение
Оперативная память	2 ГБ
Свободное место на жестком диске	50 МБ
Операционная система	Microsoft® Windows 7 или выше
Канал связи выхода в интернет	500 кбит/сек
Процессор	Intel Pentium/Celeron 1800 МГц и выше
Браузеры	Google Chrome (Версия 38 и выше) или Яндекс.Браузер (Версия 18.3 и выше)
Дисплей	SVGA-дисплей
Разрешение экрана	Не менее 1280x800

2.2 Требования к входным данным

ПО может загружать и обрабатывать только файлы прочтений клинического образца, полученные в формате «Abif» с расширением «*.ab1».

ВНИМАНИЕ! Следует загружать файлы строго в соответствии с профилем исследования.

ВНИМАНИЕ! Не допускается загружать в один проект файлы прочтений разных образцов и разных пациентов.

3 ВХОД В ПО

3.1 Общие сведения о входе

Для входа в программу необходимо в браузере «Google Chrome» или «Яндекс.Браузер» открыть адрес resist.amlisens.ru.

3.2 Регистрация (первый вход)

В окне авторизации программы нажать на кнопку ***Регистрация***.

В появившимся окне заполнить данные для получения доступа к программе:

- E-mail.
- Пароль.
- Название организации.
- ФИО пользователя.
- Контактный телефон.

В случае успешной регистрации откроется окно авторизации.

3.3 Авторизация (повторный вход)

Для повторного входа в программу ввести логин и пароль, указанные при регистрации.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Если установлена галочка ***Запомнить меня***, авторизация при очередном входе в ПО будет осуществляться с данного компьютера без повторного ввода логина и пароля.

Возврат к окну авторизации осуществляется с помощью кнопки ***Выход*** в правом верхнем углу ПО.

4 ВЫПОЛНЕНИЕ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

4.1 Создание нового проекта и загрузка файлов с прочтениями

Для создания нового проекта:

- авторизоваться в системе (если ранее не авторизованы),
- выбрать профиль под заголовком ***Создать проект***,
- нажать кнопку загрузки файлов.

Откроется окно для загрузки файлов прочтений клинического образца.

Выбрать (с помощью кнопки ***Выбрать***) из каталога компьютера файлы формата «Abif» с расширением «*.ab1». В окне появится список названий выбранных файлов для загрузки.

ВНИМАНИЕ! Убедитесь, что файлы прочтений относятся к одному пациенту и к одному профилю исследования.

Проекту автоматически присваивается название, соответствующее названиям загружаемых файлов (их общим частям в названии). В случае необходимости, можно отредактировать название проекта вручную.

Нажать кнопку ***Создать проект***.

Система произведет автоматическую обработку файлов, в результате которой будет сформирована консенсусная последовательность (с учетом транслированной аминокислотной последовательности), отображены вырожденные позиции, обрезаны некачественные секции и выведены результаты контроля качества исследования.

В открывшейся рабочей области проекта оператору необходимо провести оценку результата контроля качества исследования и, при необходимости, отредактировать нуклеотидные последовательности (см. п. 4.3).

4.2 Загрузка ранее сохраненного проекта

Выбрать в разделе ***История проектов*** ранее сохраненный проект. Щелкнуть на название нужного проекта, откроется рабочая область проекта (см. п.4.3).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Примечание – Добавление в существующий проект файлов прочтений не предусмотрено.

Полная история сохраненных проектов с возможностью фильтрации по ним доступна по кнопке ***Все проекты***. В полной истории отображается таблица со следующей информацией:

- № проекта (присваивается автоматически после создания проекта).
- Дата создания проекта.
- Количество загруженных прочтений клинического образца в проект.
- Название проекта.
- Дата последнего редактирования проекта.

Список проектов по умолчанию сортируется по дате создания.

Для изменения порядка сортировки необходимо щелкнуть на заголовок колонки и выбрать вариант сортировки (табл. 2):

Таблица 2

Кнопка	Порядок сортировки дат	Порядок сортировки текста
↑	Более новые даты вверху списка. Более старые даты внизу списка	Обратный по алфавиту
↓	Более старые даты вверху списка. Более новые даты внизу списка	Прямой по алфавиту

Для каждой колонки доступна возможность поиска по содержимому (под заголовком).

Для сброса всех фильтров нажать на кнопку ***Сбросить фильтры***.

4.3 Работа с проектом

4.3.1 Описание рабочей области проекта

4.3.1.1 Команды управления проектом

В верхней части экрана представлены кнопки команд управления проектом. Назначение кнопок указано в таблице 3.

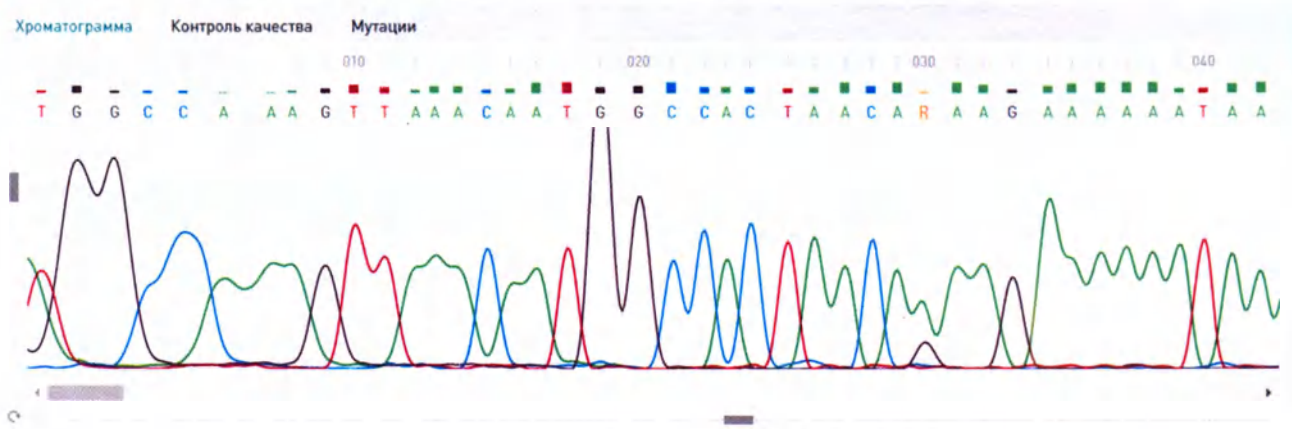
ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72987
12.10.2021

Таблица 3

Кнопка	Назначение
Отменить	Отмена последнего действия
Повторить	Повтор отмененного действия
Скрыть слева	Исключение из вычисления консенсуса участка слева от выбранной позиции
Скрыть выделенное	Исключение из вычисления консенсуса участков выбранных позиций
Скрыть справа	Исключение из вычисления консенсуса участка справа от выбранной позиции
Выравнивание	Сборка консенсусной последовательности с учетом внесенных изменений оператором
Копировать консенсус	Сохранение консенсусной последовательности в буфер обмена
Сформировать отчет	Формирование отчета по лекарственной устойчивости
IUPAC	Включение или отключение визуальной клавиатуры с символами IUPAC

4.3.1.2 Вкладка *Хроматограмма*

Во вкладке отображается выбранное прочтение.

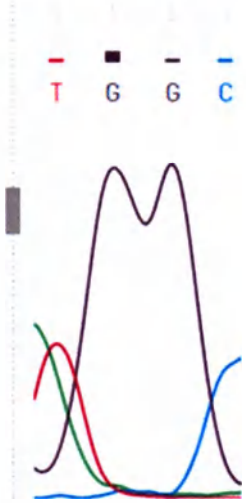


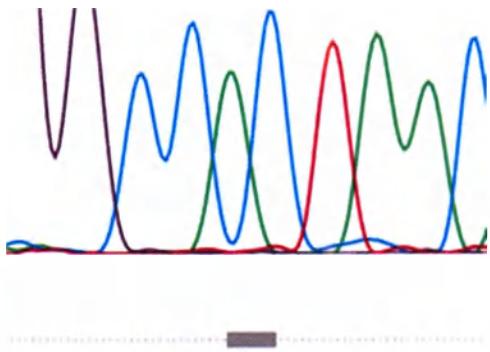
ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12307
12.10.2021

Для управления масштабом хроматограмм используют ползунки:

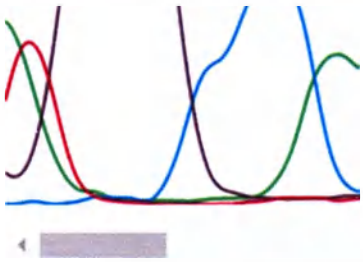
Ползунок слева (вверх - увеличение масштаба по вертикали, вниз - уменьшение масштаба по вертикали).

Ползунок снизу (вправо - увеличение масштаба по горизонтали, влево - уменьшение масштаба по горизонтали)





Для перемещения по хроматограмме используют клавиши «влево» или «вправо» на клавиатуре или ползунок, расположенный снизу хроматограммы.

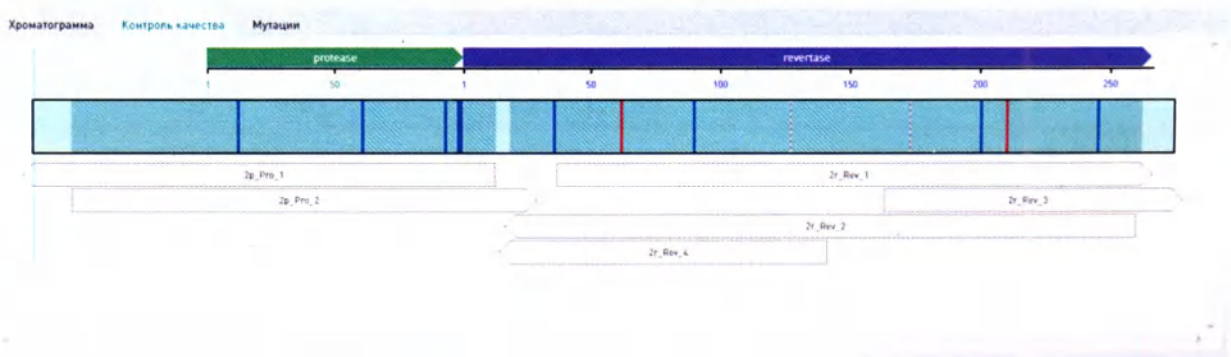


4.3.1.3 Вкладка *Контроль качества*

Вкладка позволяет оценить качество сборки, сформированной консенсусной последовательности по показателям:

- Покрытие участка нуклеотидной последовательности.
- Наличие проблемных участков (стоп-кодоны, нетипичные мутации).

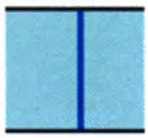
Пример диаграммы контроля качества представлен ниже:



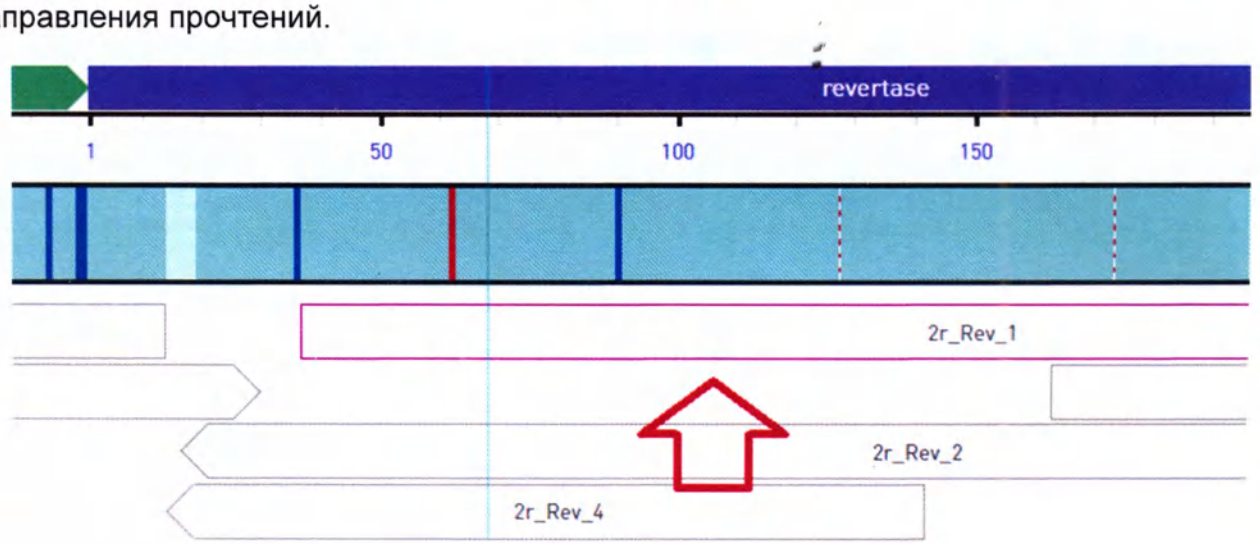
ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12307
12.10.2021

Обозначения диаграмм контроля качества указаны в таблице 4.

Таблица 4

Обозначение	Описание
	Указанный участок не содержит покрытия
	Указанный участок покрыт единственным прочтением
	Указанный участок покрыт двумя или более прочтениями
	В указанной позиции имеется отличие от референсной последовательности с возможностью образования разных аминокислот
	В указанной позиции имеется критически значимая замена (мутация, влияющая на устойчивость к лекарственному препарату)
	В указанной позиции имеется сбой рамки считывания или стоп-кодон
	Указанная позиция требует проверки оператором

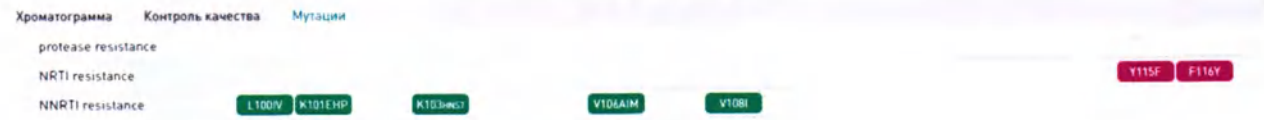
Скрытый участок обозначается серым цветом на линиях, указывающих направления прочтений.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12367
12.10.2021

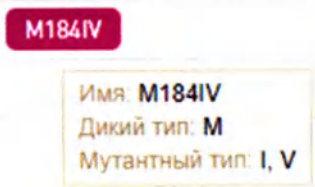
4.3.1.4 Вкладка *Мутации*

Во вкладке отображается список мутаций данного профиля, влияющих на лекарственную устойчивость (при наличии таковых).



Примечание – Если для выбранного профиля не задан список мутаций, то отобразится соответствующее сообщение.

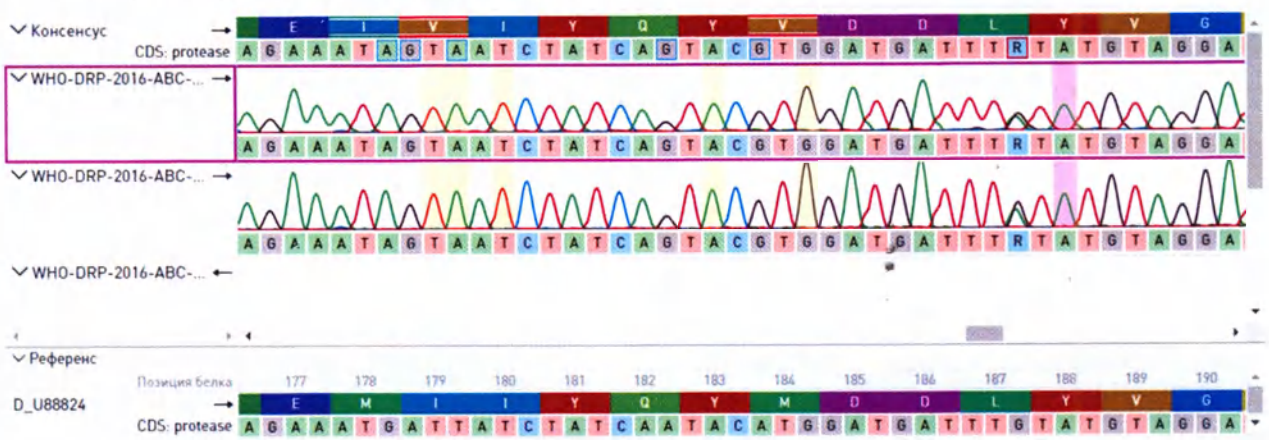
При наведении курсора на обозначение мутации отображается подсказка.



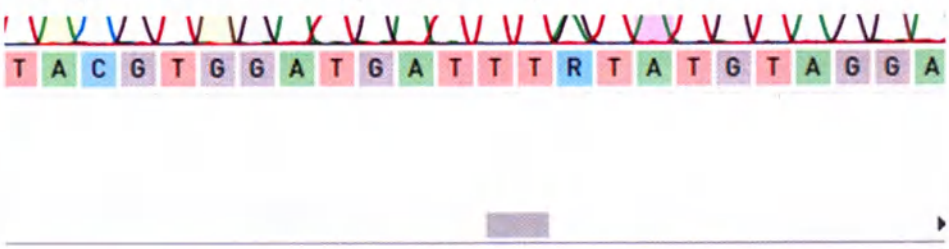
4.3.1.5 Окно хроматограмм и нуклеотидных последовательностей

Окно содержит:

- Консенсусную последовательность.
- Нуклеотидные последовательности загруженных прочтений и их хроматограммы.
- Референсную последовательность.



Для навигации (вправо-влево) по последовательностям используют клавиши «влево» или «вправо» на клавиатуре или ползунок под хроматограммами.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72567
12.10.2021

Цветные обозначения нуклеотидов приведены в таблице 5:

Таблица 5

Обозначение	Цвет фона	Описание
A	Зеленый	Аденин
C	Голубой	Цитозин
G	Серый	Гуанин
T	Красный	Тимин
K M R S W Y B D H V N	Уникальный фон для каждой вырожденной позиции	Вырожденные позиции (K, M, R, S, W, Y, B, D, H, V, N)

Цветные обозначения замен и делеций в консенсусной последовательности приведены в таблице 6:

Таблица 6

Обозначение	Цвет рамки	Описание
	Красный	Вырожденная позиция в консенсусной последовательности
–	Красный	Делеция нуклеотида в консенсусной последовательности
	Синий	Отличие нуклеотида в консенсусной последовательности от нуклеотида референстной последовательности

Цветные обозначения отличий в аминокислотной последовательности приведены в таблице 7:

Таблица 7

Обозначение	Цвет рамки	Описание
	Бирюзовая	Аминокислота, отличная от референсной, не связанная с возникновением лекарственной устойчивости
	Синяя	Несколько вариантов аминокислот в одной позиции, не связанных с возникновением лекарственной устойчивости
	Красная	Аминокислоты, связанные с возникновением лекарственной устойчивости

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Цветные обозначения навигационных элементов приведены в таблице 8:

Таблица 8

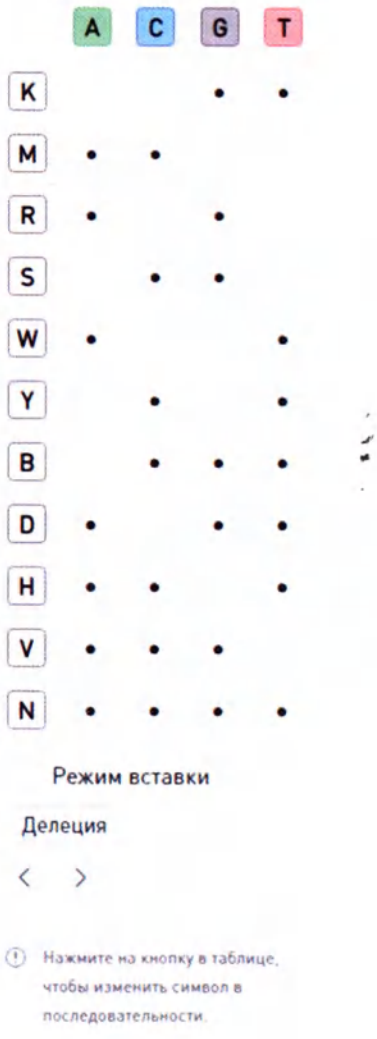
Обозначение	Описание
Голубой фон	Показывает активную позицию курсора. Автоматическая прокрутка графиков (центрирование) происходит по выделению
WHO...A_2016-02-29 → Малиновая рамка	Указывает активную последовательность. При редактировании изменения затрагивают позиции данной последовательности. Во вкладке ***Хроматограмма*** отображается график данной последовательности

4.3.1.6 Клавиши для редактирования нуклеотидной последовательности

Редактировать нуклеотидную последовательность можно следующими способами:

Способ №1: с помощью виртуальной клавиатуры IUPAC.

Нажмите кнопку включения IUPAC клавиатуры и в правой части экрана появится вспомогательное окно.



ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

- Выделите нужный участок нуклеотидной последовательности и нажмите на символ IUPAC клавиатуры, произойдет замена исходного нуклеотида на выбранный.
- Активируйте режим вставки, поставив галочку в ячейке ***Режим вставки***, выделите нужный участок нуклеотидной последовательности и нажмите на символ IUPAC клавиатуры, произойдет вставка нуклеотида после выделенного участка.

Способ №2: с помощью клавиш клавиатуры компьютера. Команды клавиатуры для редактирования последовательности приведены в таблице 9:

Таблица 9

Назначение	Горячая клавиша на клавиатуре	Применение
Замена нуклеотидов с помощью IUPAC символов	A, C, G, T, R, Y, M, K, S, W, H, B, V, D, N. «-» (делеция)	Выбрать (щелкнуть на нужную позицию) нужный нуклеотид и нажать соответствующую клавишу
Вставка нуклеотидов	Зажатая клавиша shift + один из символов: A, C, G, T, R, Y, M, K, S, W, H, B, V, D, N.	Выбрать (щелкнуть на нужную позицию) нужный нуклеотид и нажать соответствующую комбинацию клавиш

4.3.2 Работа с нуклеотидной последовательностью

Задачей оператора является редактирование ложных полиморфизмов, возникающих при ошибках определения нуклеотидов в соответствии с пиками хроматограмм при их низком качестве.

4.3.2.1 Контроль качества исследования

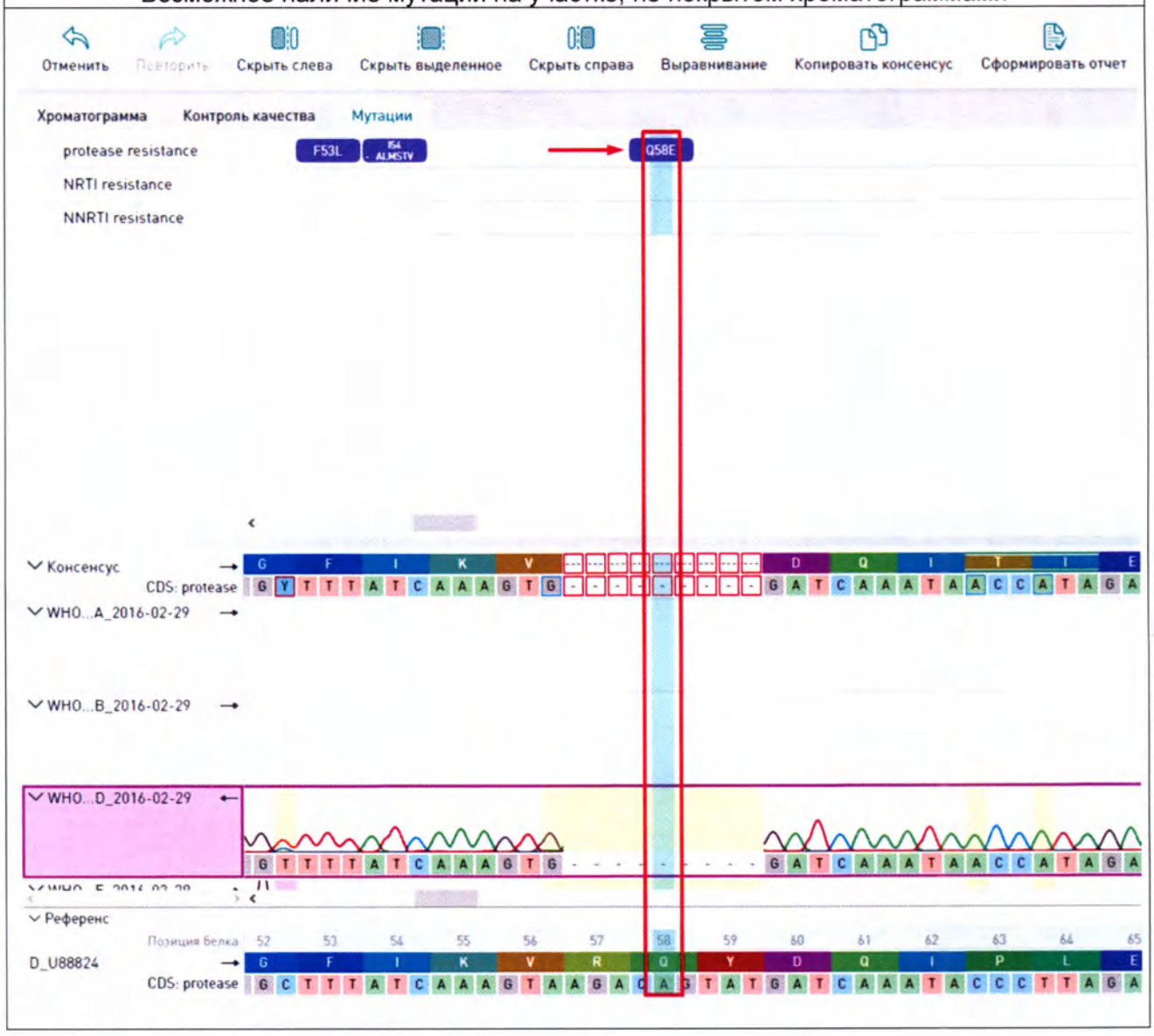
С помощью окна контроля качества необходимо определить участки, которые не покрыты или недостаточно покрыты хроматограммами (минимальное покрытие участка хроматограммами определяется в соответствии с инструкцией к набору).

Если на таком участке могут быть мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью, то необходимо провести повторное секвенирование или создать новый проект с загрузкой недостающих прочтений (см. примеры ниже).

Участки, не покрытые хроматограммами

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72507
12.10.2021

Возможное наличие мутации на участке, не покрытом хроматограммами



4.3.2.2 Скрытие участков

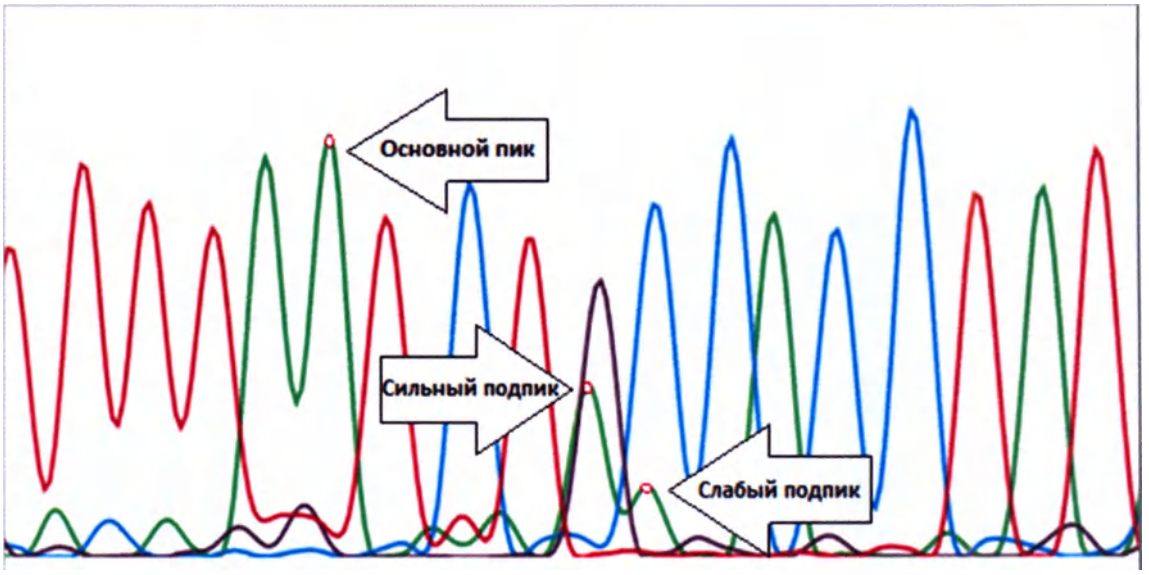
При вычислении консенсусной последовательности скрытие участков в прочтении производится для исключения участка низкого качества (например, с пиками малой амплитуды, «грязными» хроматограммами, хроматограммами, содержащими смесь различных последовательностей).

4.3.2.3 Редактирование нуклеотидной последовательности

Обнаружение вырожденных позиций осуществляется в окне отображения прочтений.

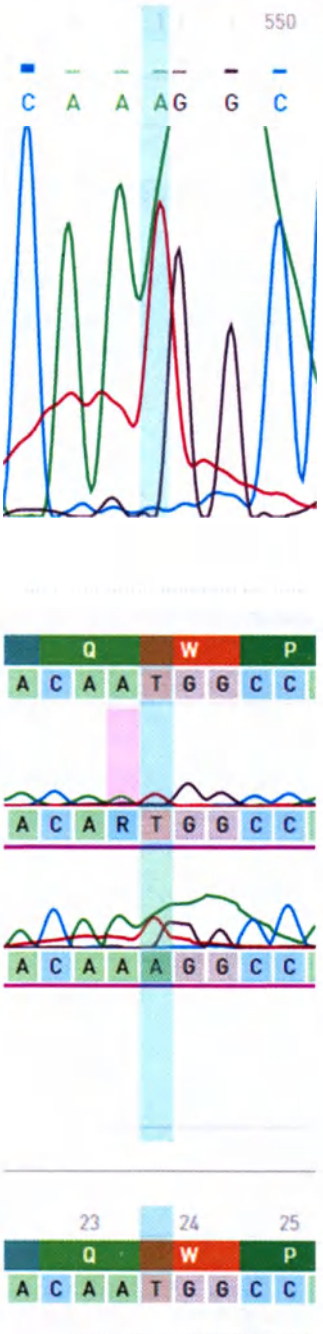
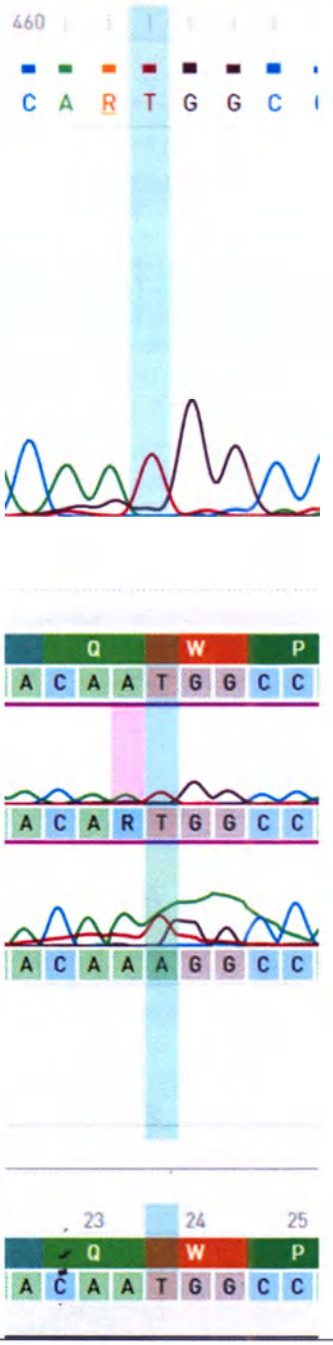
В случае обнаружения вырожденных позиций определите на хроматограмме характер подпика(ов) (сильный или слабый) по отношению к основному пику и действуйте согласно следующим правилам:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021



- Если на одной из хроматограмм присутствует только основной пик, а на другой наряду с основным пиком присутствует сильный подпик, то в консенсусной последовательности оставьте полиморфизм.
- Если на одной из хроматограмм присутствует только основной пик, а на другой наряду с основным пиком присутствует слабый подпик, то в консенсусной последовательности вместо полиморфизма поставьте нуклеотид, соответствующий основному пику.
- Если в двух хроматограммах для позиции наряду с основными пиками присутствуют подпики одинаковой величины, оставьте в данной позиции полиморфизм.
- Если на одной из хроматограмм наряду с основным пиком присутствует слабый подпик, а на другой хроматограмме наряду с основным пиком присутствует сильный подпик, то в консенсусной последовательности оставьте полиморфизм согласно второй хроматограмме.
- Если на одной из хроматограмм присутствует эффект смещения (соседние пики накладываются друг на друга), то в консенсусной последовательности вместо полиморфизма поставьте нуклеотиды, присутствующие на второй хроматограмме.

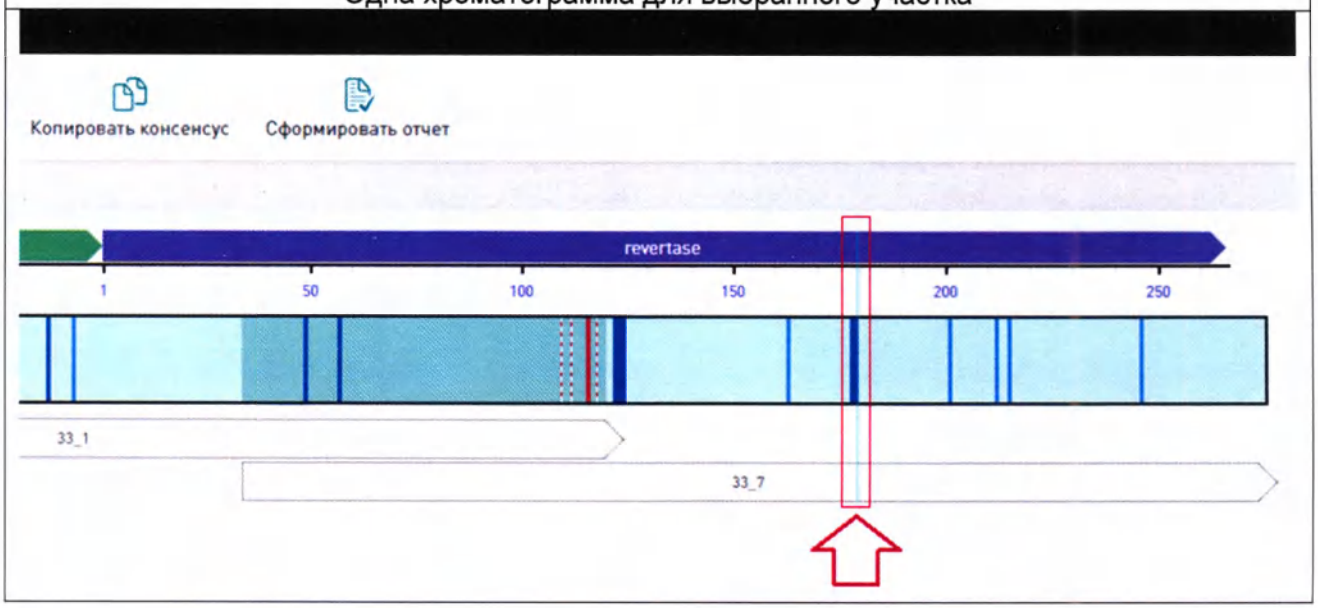
ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Эффект смещения на первой хроматограмме	Нуклеотид «Т» на второй хроматограмме
	

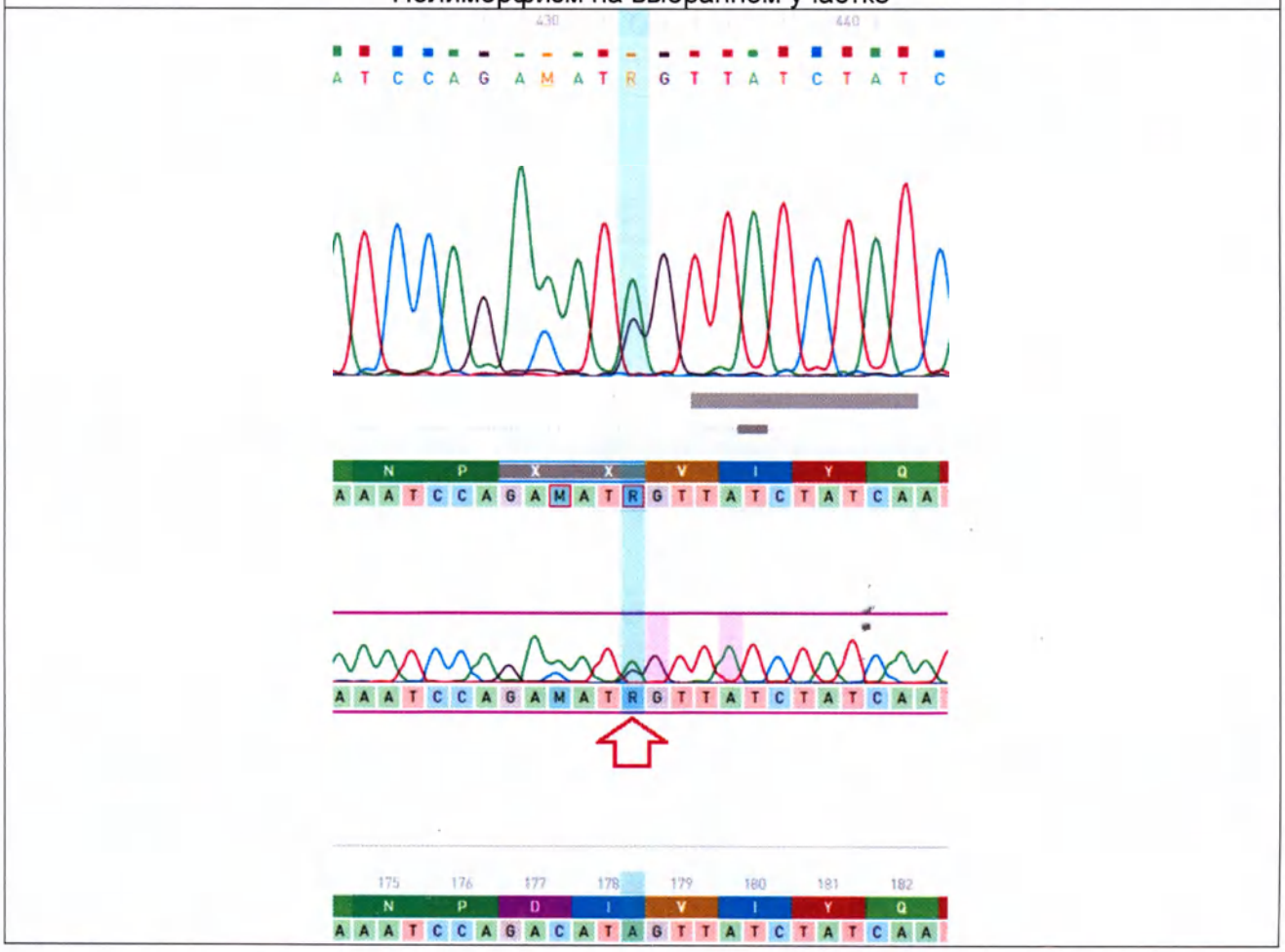
- Если для участка получена только одна хроматограмма, и в анализируемой позиции которой наряду с основным пиком присутствует сильный подпик, то в консенсусной последовательности оставьте полиморфизм.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Одна хроматограмма для выбранного участка



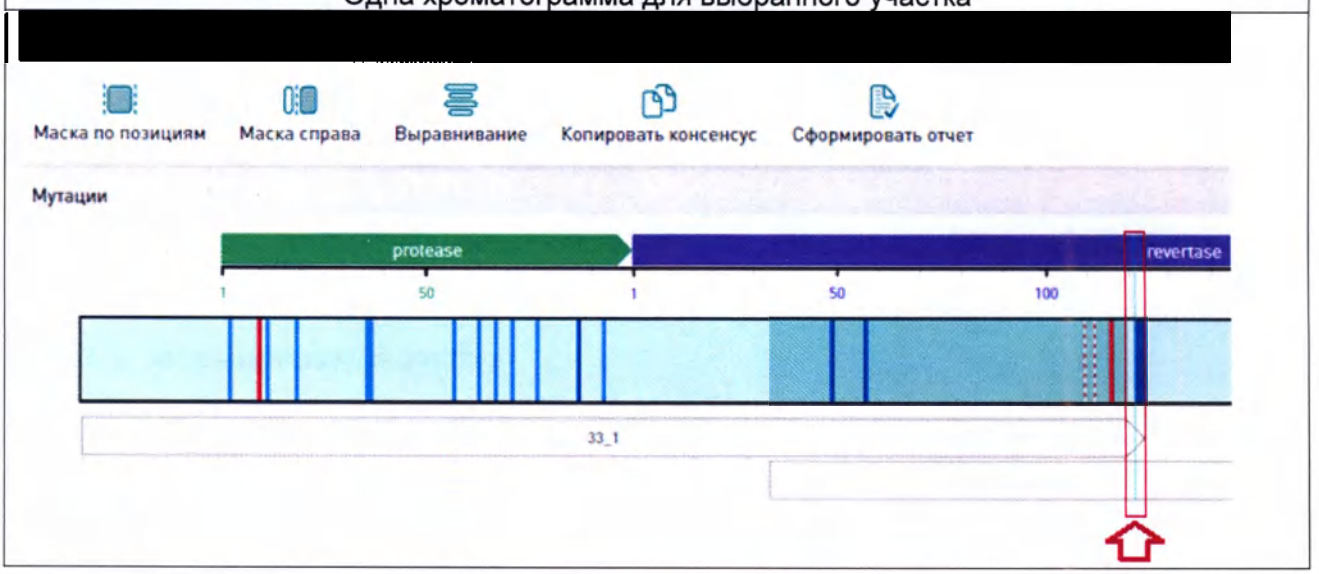
Полиморфизм на выбранном участке



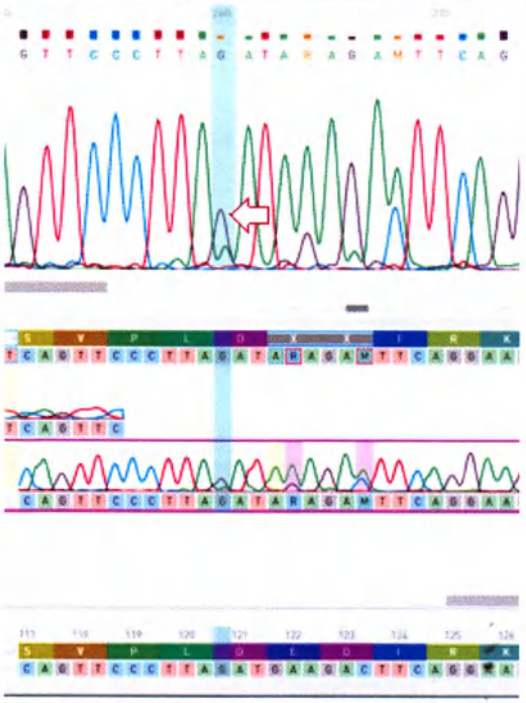
- Если для участка получена только одна хроматограмма, и в анализируемой позиции которой наряду с основным пиком присутствует слабый подпик, то в консенсусной последовательности вместо вырожденной позиции поставьте нуклеотид, соответствующий основному пику.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Одна хроматограмма для выбранного участка



Четкий пик наряду со слабым подпиком



4.3.2.4 Выравнивание последовательностей

Если в процессе редактирования возникает необходимость в использовании инсерций или делеций, рекомендуется выполнить выравнивание последовательностей относительно референсной последовательности (команда ***Выравнивание***). После выравнивания история операций очищается (кнопки ***Отменить*** и ***Повторить*** становятся неактивными).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

4.3.2.5 Сохранение консенсуса в буфер обмена

При необходимости копировать отредактированную консенсусную последовательность (например, для анализа при помощи внешних сервисов) нажмите кнопку ***Копировать консенсус*** на верхней панели.

4.3.3 Отчет с результатами исследования лекарственной устойчивости и определения тропизма

4.3.3.1 Формирование отчета

ВНИМАНИЕ! Если для профиля интерпретация результата осуществляется с помощью внешних сервисов, то при нажатии на кнопку ***Сформировать отчет*** будет выдано сообщение с рекомендациями какой внешний сервис необходимо использовать для интерпретации результата.

Для формирования отчета с результатами исследования нажать на кнопку ***Сформировать отчет*** в проекте. В появившемся окне откроется отчет с результатами.

Отчет может быть сформирован в трех вариантах:

- ***Краткий отчет*** - содержит описание выявленной лекарственной устойчивости возбудителя, либо информацию о тропизме вируса.
- ***Стандартный отчет*** - содержит либо описание выявленной лекарственной устойчивости возбудителя + список мутаций. Не доступен при определении тропизма.
- ***Полный отчет*** - содержит либо описание выявленной лекарственной устойчивости возбудителя + список мутаций + контроль качества исследования, либо информацию о тропизме вируса + контроль качества исследования.
- ***Отчет по нескольким повторам*** - содержит информацию о тропизме возбудителя, учитывающую значения показателя FPR повторов. Доступен только при определении тропизма.

Для переключения вариантов необходимо выбрать в верхней части отчета нужную вкладку, соответствующую виду отчета.

В верхней части экрана представлены кнопки управления отчетом. Назначение кнопок указано в таблице 10.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Таблица 10

Кнопка	Назначение
Печатать отчет	Отправляет отчет на печать
Сохранить PDF	Сохранение отчета на компьютер оператора в формате PDF
Вернуться в проект	Вернуться в проект для работы с нуклеотидной последовательностью

Отчет о результатах исследования сохраняется в формате PDF на компьютере оператора. Перед сохранением отчета необходимо заполнить данные пациента, врача, направляющей организации, сотрудника, проводившего анализ, в предназначенных для этого полях. При печати незаполненные поля останутся пустыми.

ВНИМАНИЕ! Проверьте правильность заполнения данных пациента!

4.3.3.2 Описание лекарственной устойчивости/тропизма, выявленных мутаций и контроля качества исследования в отчете о результатах исследования

В начале отчета выводится наименование и валидность исследования в соответствии с профилем.

Валидность исследования ПО определяет автоматически в соответствии с критериями, указанными в инструкции к набору реагентов. Если результат исследования невалидный, то разделы отчета с описанием лекарственной устойчивости/тропизме и выявленных мутаций не заполняются значениями (т.е. таблицы остаются пустыми).

При определении лекарственной устойчивости к препаратам результат выводится в следующем формате (см. табл. 11).

Таблица 11

Тип препарата	Название препарата	Уровень устойчивости
Выводится в случае наличие типа препарата		Возможные значения: – Чувствителен – Возможно низкий уровень устойчивости – Низкий уровень устойчивости – Средний уровень устойчивости – Высокий уровень устойчивости

При определении тропизма результат выводится в следующем формате.

В вариантах отчета ***Краткий отчет*** и ***Полный отчет*** выводятся поля:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

- ***Результат***, в котором выводится тропность возбудителя.
- ***FPR***, в котором выводится значение FPR.

В варианте отчета ***Отчет по нескольким повторам*** выводятся дополнительные поля:

- ***Значения FPR для повторов***, где оператору необходимо указать значение результата FPR для каждого повтора в виде % от 0 до 100. Количество повторов не может превышать трех для одного клинического образца. Значения FPR для заполнения указанных полей оператор получает из результатов отчета (краткий или полный отчет) для каждого из повтора.
- Количество повторов, где автоматически выводится количество повторов, для которых оператором задано значение FPR.

Информация о порядке анализа повторов указана в инструкции к набору реагентов.

По каждому анализируемому участку выводится информация о видах обнаруженных мутаций (см. табл. 12):

Таблица 12

Анализируемый участок	
Основные мутации	Перечень обнаруженных мутаций, через «,» или «не обнаружено»
Дополнительные мутации	Перечень обнаруженных мутаций, через «,» или «не обнаружено»
Другие мутации (мутации полиморфизма)	Перечень обнаруженных мутаций, через «,» или «не обнаружено»

Для отдельных профилей может выводиться информация о генотипе возбудителя.

По каждому анализируемому участку выводится информация о результатах контроля качества исследования (см. табл. 13):

Таблица 13

Анализируемый участок	
Наименование проблем в качестве консенсуса	**Номер кодона**
Стоп-кодоны	Указываются номера позиций аминокислот, в которых обнаружены стоп-кодоны
Множественные вырождения	Указываются номера позиций аминокислот, в которых обнаружены вырожденные позиции V, B, D, H, N
Нетипичные основания	Указываются номера позиций, в которых определены аминокислоты, которые отсутствуют в перечне типичных мутаций

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Анализируемый участок	
Количество хроматограмм, которые покрывают участок последовательности	**Номер кодона**
0	Указываются номера позиций аминокислот, которые не покрыты хроматограммами
1	Указываются номера позиций аминокислот, которые покрыты 1 хроматограммой
2 и более	Указываются номера позиций аминокислот, которые покрыты 2 и более хроматограммами

Внешний вид отчета может быть изменен (цветовая схема, порядок следования полей, размер полей, состав вспомогательных полей, добавлены графические или другие текстовые элементы в отчет) без дополнительного уведомления. Данные изменения не меняют результаты, полученные для данного профиля исследования.

5 СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
«502 ошибка» в браузере (при попытке открыть программу)	Технические неполадки в работе программы	Необходимо связаться с технической поддержкой ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
«Страница недоступна» (при попытке открыть программу)	Сетевые неполадки в сети организации	Необходимо обратиться к системному администратору вашей организации для решения данной проблемы
Неверный формат загружаемого файла. Разрешена загрузка файлов только с расширением «*.ab1»	Выбран файл для загрузки, отличный от расширения «ab1» при создании нового проекта	Выбрать файлы прочтения с расширением «ab1»
Не удалось создать проект. Возможные причины: не найден качественный участок для обработки, либо загружены файлы, не соответствующие данному профилю	При создании проекта загружаемые файлы не соответствуют выбранному профилю или в загружаемых прочтениях имеются некачественные секции, не позволяющие провести исследование	Загрузить недостающие файлы прочтений или произвести секвенирование заново
Неверный логин или пароль	Указан неверный логин и пароль при авторизации	Повторить попытку ввода логина и пароля с указанием корректных данных. Осуществить восстановление пароля, если он утерян (кнопка ***Восстановить пароль*** на форме авторизации)
Для указанной почты ранее уже была создана учетная запись. Укажите другую почту или восстановите пароль на почту, если вы его забыли (кнопка ***Восстановить пароль***)	Указана почта, на которую ранее уже производилась регистрация	Указать другую почту или осуществить восстановление пароля, если он утерян (кнопка ***Восстановить пароль*** на форме авторизации)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
Запустить выравнивание? После выравнивания история операций очищается (кнопки ***Отменить*** и ***Повторить***)	Нажатие на кнопку ***Выравнивание***	Нажать ***ОК*** для подтверждения действия
Информация о валидности результата в отчете со значением ***Невалидный***	Область значимых мутаций покрыта не полностью	Загрузить недостающие файлы прочтений или произвести секвенирование заново
Список мутаций для данного профиля отсутствует	Для данного профиля (например, для определения тропизма возбудителя) не задан список мутаций	Дополнительных действий не требуется
Не удалось связаться с сервером. Отчёт не сформирован. Повторите операцию через 10 минут или обратитесь в тех. поддержку resist@amplisens.ru	Нажатие на кнопку ***Сформировать отчет***	Повторить попытку через 10 минут или обратиться в техническую поддержку.
Сообщение с указанием ссылки на внешний ресурс для интерпретации результата	Нажатие на кнопку ***Сформировать отчет***, если для данного профиля установлен режим интерпретации результата с помощью внешних сервисов	Перейти на указанный ресурс и осуществить интерпретацию результата
Сервис временно не доступен, ведутся технические работы. Плановый срок окончания работ: xx.xx.xxxx xx:xx	Проводятся технические работы	Дождаться окончания технических работ

Сообщения оператору от браузера

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
Закрыть сайт? Возможно, внесенные изменения не сохранятся	Попытка закрыть вкладку	Подтвердить закрытие страницы

6 ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное руководство оператора доступно во вкладке ***Помощь*** настоящего ПО.

Телефон технической поддержки: 8(495)305-54-24.

Почта: resist@amplisens.ru.

Режим работы: пн – пт, с 10:00 до 18:00.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 26
двадцать шесть лист ов

Руководитель подразделения развития и качества продукции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 93/21 от 17.04.2021 г.)

Е.А. Козлова

«20» 08 2021 г.

м.п.

Всего пронумеровано, прошнуровано и скреплено печатью 26 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

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

_____ В.Г. Акимкин

«02» сентября 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению 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»

АмплиСенс®

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Центральный научно-исследовательский
институт эпидемиологии»,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3А

IVD

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

72967
12.10.2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
НАЗНАЧЕНИЕ 3
ПРИНЦИП МЕТОДА 4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ 7
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 11
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ 12
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ 13
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА .. 19
СОСТАВ 21
ЭТАП 1. ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА 27
ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ. I РАУНД 30
ЭТАП 3. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ. II РАУНД 35
ЭТАП 4. ПОДГОТОВКА И ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ 39
ОЧИСТКА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ 39
ОЧИСТКА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ «Ампли-сорб» 40
ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ ОЧИЩЕННЫХ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКЕРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ИЗ «КОМПЛЕКТА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К СЕКВЕНИРОВАНИЮ» 42
ПОДГОТОВКА И ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СЕКВЕНАТОРОВ ФИРМЫ Applied Biosystems, США 48
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ЦИКЛИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ 49
ОЧИСТКА ОТ НЕВКЛЮЧИВШИХСЯ ТЕРМИНАТОРОВ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ 54
АВТОМАТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРА ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ 56
ЭТАП 5. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ 57
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ 69
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ 70
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 71
Экстракция РНК из плазмы крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-золь-Е» 71
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 74
А1. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» 74
А2. Экстракция ДНК из сухих пятен крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп» 76
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 79
Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200 79
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ 81

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

а/к	- аминокислота
ВИЧ-1	- вирус иммунодефицита человека 1 типа
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ВПК	- высококонцентрированный положительный контроль
ГЭ	- геномные эквиваленты
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплементарная ДНК
НПК	- низкоконцентрированный положительный контроль
ОТ-ПЦР	- обратная транскрипция, совмещенная со стадией полимеразной цепной реакции
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль
ПКО	- положительный контрольный образец
п.н.	- пары нуклеотидов
ПО	- программное обеспечение
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 прав потребителей и благополучия человека
FPR	- false positive rate (порог ложноположительного результата)
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)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов рассчитан на тестирование 50 клинических образцов.

Набор реагентов **«АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq»** предназначен для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ в гене протеазы (*pro*), фрагменте гена обратной транскриптазы (*rev*) и гене интегразы (*int*) ВИЧ, а также для определения тропизма ВИЧ на основе анализа нуклеотидной последовательности V3-петли гена белка оболочки (*env*).

Для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ в гене протеазы, фрагменте гена обратной транскриптазы и гене интегразы ВИЧ данный набор реагентов рекомендуется

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
Версия 12.10.2021

использовать, если концентрация РНК ВИЧ в плазме крови более 500 копий/мл. Возможно использование образцов с концентрацией вируса менее 500 копий/мл (от 100 до 500 копий/мл) при увеличении объема пробы для экстракции до 1 мл.

В случае определения тропизма ВИЧ для анализа рекомендуется использовать:

- РНК ВИЧ, выделенную из 200 мкл плазмы крови, если после определения концентрации РНК ВИЧ вирусная нагрузка образца составила более 1000 копий/мл;
- ДНК ВИЧ, выделенную из цельной крови, в случае если вирусная нагрузка менее 1000 копий/мл.

ВНИМАНИЕ! Набор реагентов **«АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq»** рекомендован для проведения исследования с использованием секвенаторов компании Applied Biosystems (США) (см. раздел «Дополнительные материалы и оборудование»).

ВНИМАНИЕ! Результаты исследования учитываются в комплексной диагностике заболевания[1].

ПРИНЦИП МЕТОДА

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

1. Экстракция (выделение) РНК (при анализе генов протеазы, интегразы, фрагментов гена обратной транскриптазы, гена белка оболочки), либо ДНК (при анализе гена белка оболочки) из клинического материала: плазмы крови (при анализе генов протеазы, интегразы, фрагментов гена обратной транскриптазы, гена белка оболочки), либо цельной крови/сухих пятен крови (при анализе гена белка оболочки).
2. ОТ-ПЦР генов протеазы, интегразы, фрагментов гена обратной транскриптазы и гена белка оболочки, либо ПЦР фрагмента гена белка оболочки (в случае определения тропизма ВИЧ на провирусной ДНК).

[1] В соответствии с Директивой Европейского Союза 98/79/EC.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
Версия 12.10.2021

ВНИМАНИЕ! При определении тропизма ВИЧ, начиная с этапа ОТ-ПЦР/ПЦР, РНК/ДНК каждого клинического образца анализируется в трех повторах.

3. Второй раунд ПЦР (при анализе генов протеазы, интегразы, фрагментов гена обратной транскриптазы, а также гена белка оболочки в случае определения тропизма на матрице РНК ВИЧ).

ВНИМАНИЕ! При определении тропизма ВИЧ на матрице провирусной ДНК анализ включает в себя только один раунд ПЦР.

4. Подготовка и проведение секвенирования включает следующие стадии:

   а) *проведение очистки продуктов амплификации от невключившихся нуклеотидов и праймеров.*

   Допускается использование разных способов очистки продуктов амплификации: с помощью колонок (например, Microcon YM-100 (Millipore, США)), ферментов (например, ExoSAP-IT (USB, США)) или сорбента, в зависимости от оснащенности лаборатории. Комплект реагентов **«Ампли-сорб»**, производящий очистку ПЦР-продуктов с помощью сорбента, входит в состав набора реагентов **«АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq»**.

   б) *детекция и оценка концентрации очищенных ПЦР-продуктов в агарозном геле.*

   Допускается применение разных способов оценки концентрации очищенных продуктов амплификации, например:

   – спектрофотометрически – при использовании классического спектрофотометра, оснащенного специализированными кюветами для работы в УФ-диапазоне, или его современных модификаций – приборов NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., США) или Picodrop (Picodrop Limited, Великобритания);

   – электрофоретически – когда концентрация ПЦР-продукта в каждой пробе оценивается визуально при проведении электрофоретической детекции путем сравнения интенсивности полосы анализируемого ПЦР-продукта с интенсивностью полос определенных фрагментов маркера молекулярных масс, имеющих известную концентрацию. **Маркер молекулярных масс,**

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
Гособр 12.10.2021

предназначенный для визуальной оценки количества очищенных продуктов амплификации, входит в **«Комплект для подготовки к секвенированию»** из набора реагентов **«АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq»**.

в) *проведение реакции циклического секвенирования.*

Необходимо использовать праймеры для секвенирования из **«Комплекта для подготовки к секвенированию»**, входящего в набор реагентов **«АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq»**, и комплект реагентов для секвенирования с флуоресцентно-мечеными терминаторами **«Комплект для секвенирования»**.

г) *очистка продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов.*

Допускается использование разных способов очистки продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов, например:

- с помощью их переосаждения различными спиртами: этанолом, бутанолом или изопропанолом. **Раствор F**, предназначенный для очистки продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов, входит в **«Комплект для подготовки к секвенированию»** набора реагентов **«АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq»**;
- с помощью специализированных колонок (например, MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Германия));
- с помощью коммерческих наборов реагентов (например, BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems, США)).

д) *подготовка продуктов реакции секвенирования для проведения автоматической детекции нуклеотидной последовательности.*

Заключается в проведении предварительной денатурации продуктов реакции секвенирования перед их загрузкой в секвенатор. Раствор для денатурации входит в состав **«Комплекта для подготовки к секвенированию»**.

е) *автоматическая детекция нуклеотидной последовательности с помощью прибора для секвенирования (секвенатора) (например, с помощью прибора компании Applied Biosystems, США).*

5. Анализ и интерпретация результатов.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
1500
12.10.2021

а) *сборка полученных нуклеотидных последовательностей в консенсус-последовательность и анализ консенсус-последовательности с помощью специального программного обеспечения;*

б) *клиническая интерпретация полученных результатов с помощью специального программного обеспечения через процесс виртуального фенотипирования.*

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 8 формах комплектации:

Форма комплектации	Исследуемые гены	Комплект реагентов/реагент	Кол-во, шт.
Формы комплектации, содержащие компоненты для проведения реакции секвенирования компании Applied Biosystems, США			
Форма 1	Обратная транскриптаза *(rev)*, протеаза *(pro)*	«РИБО-золь-Е»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«Ампли-сорб» вариант 50	2
		«ЭФ» вариант 200	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Pro/Rev»	1
		«Комплект для секвенирования»	3
		Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020, на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014 – 1 диск	
Форма 2	Обратная транскриптаза *(rev)*, протеаза *(pro)*, интеграза *(int)*	«РИБО-золь-Е»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Int»	1
		«ПЦР-комплект-Int»	1
		«Ампли-сорб» вариант 50	3
		«ЭФ» вариант 200	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Pro/Rev»	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Int»	1
		«Комплект для секвенирования»	5
		Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020, на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014 – 1 диск	

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12507
12.10.2021

Форма комплектации	Исследуемые гены	Комплект реагентов/реагент	Кол-во, шт.
Форма 3	Определение тропизма *(env)*	«РИБО-золь-Е»	1
		«РИБО-преп» вариант 100	1
		Раствор для лизиса	2 флакона
		Раствор для преципитации	1 флакон
		ГЕМОЛИТИК	1 флакон
		ПКО ДНК ВИЧ-1	3 пробирки
		ОКО	3 пробирки
		«ОТ-ПЦР-комплект-Env»	1
		«ПЦР-комплект-Env»	1
		«Ампли-сорб» вариант 50	3
		«ЭФ» вариант 200	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Env»	1
		«Комплект для секвенирования»	3
		Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020, на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014 – 1 диск	
Форма 4	Обратная транскриптаза *(rev)*, протеаза *(pro)*, интеграза *(int)*, определение тропизма *(env)*	«РИБО-золь-Е»	2
		«РИБО-преп» вариант 100	1
		Раствор для лизиса	2 флакона
		Раствор для преципитации	1 флакон
		ГЕМОЛИТИК	1 флакон
		ПКО ДНК ВИЧ-1	3 пробирки
		ОКО	3 пробирки
		«ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Int»	1
		«ПЦР-комплект-Int»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Env»	1
		«ПЦР-комплект-Env»	1
		«Ампли-сорб» вариант 50	6
		«ЭФ» вариант 200	2
		«Комплект для подготовки к секвенированию Pro/Rev»	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Int»	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Env»	1
		«Комплект для секвенирования»	8
		Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020, на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014 – 1 диск	

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
Лист 12.10.2021

Форма комплектации	Исследуемые гены	Комплект реагентов/реагент	Кол-во, шт.
Формы комплектации, НЕ содержащие компоненты для проведения реакции секвенирования компании Applied Biosystems, США			
Форма 5	Обратная транскриптаза *(rev)*, протеаза *(pro)*	«РИБО-золь-Е»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«Ампли-сорб» вариант 50	2
		«ЭФ» вариант 200	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Pro/Rev»	1
		Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020, на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014 – 1 диск	
Форма 6	Обратная транскриптаза *(rev)*, протеаза *(pro)*, интеграза *(int)*	«РИБО-золь-Е»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Int»	1
		«ПЦР-комплект-Int»	1
		«Ампли-сорб» вариант 50	3
		«ЭФ» вариант 200	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Pro/Rev»	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Int»	1
		Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020, на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014 – 1 диск	
Форма 7	Определение тропизма *(env)*	«РИБО-золь-Е»	1
		«РИБО-преп» вариант 100	1
		Раствор для лизиса	2 флакона
		Раствор для преципитации	1 флакон
		ГЕМОЛИТИК	1 флакон
		ПКО ДНК ВИЧ-1	3 пробирки
		ОКО	3 пробирки
		«ОТ-ПЦР-комплект-Env»	1
		«ПЦР-комплект-Env»	1
		«Ампли-сорб» вариант 50	3
		«ЭФ» вариант 200	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Env»	1
		Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020, на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014 – 1 диск	

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12507
12.10.2021

Форма комплектации	Исследуемые гены	Комплект реагентов/реагент	Кол-во, шт.
Форма 8	Обратная транскриптаза *(rev)*, протеаза *(pro)*, интеграза *(int)*, определение тропизма *(env)*	«РИБО-золь-Е»	2
		«РИБО-преп» вариант 100	1
		Раствор для лизиса	2 флакона
		Раствор для преципитации	1 флакон
		ГЕМОЛИТИК	1 флакон
		ПКО ДНК ВИЧ-1	3 пробирки
		ОКО	3 пробирки
		«ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ПЦР-комплект-Pro/Rev»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Int»	1
		«ПЦР-комплект-Int»	1
		«ОТ-ПЦР-комплект-Env»	1
		«ПЦР-комплект-Env»	1
		«Ампли-сорб» вариант 50	6
		«ЭФ» вариант 200	2
		«Комплект для подготовки к секвенированию Pro/Rev»	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Int»	1
		«Комплект для подготовки к секвенированию Env»	1
		Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020, на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014 – 1 диск	

Формы комплектации 1-4 предназначены для проведения полного исследования и включают реагенты для экстракции нуклеиновых кислот из клинического материала, реакции обратной транскрипции РНК и амплификации методом ПЦР, электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле, проведения очистки продуктов амплификации, определения концентрации очищенных продуктов амплификации, постановки реакции секвенирования, очистки продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов.

Формы комплектации 5-8 предназначены для экстракции РНК из клинического материала, реакции обратной транскрипции РНК и амплификации методом ПЦР, электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле, проведения очистки продуктов амплификации, определения концентрации очищенных продуктов амплификации, очистки

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов, а также включают праймеры для секвенирования. Для проведения полного исследования необходимо дополнительно использовать комплект реагентов для секвенирования с флуоресцентно-мечеными терминаторами (например, BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аналитическая чувствительность

Вид клинического материала	Объем экстракции, мкл	Комплект для выделения РНК/ДНК	Мишень	Аналитическая чувствительность
Плазма крови	200	«РИБО-золь-Е»	Гены протеазы, обратной транскриптазы, интегразы, белка оболочки	500 РНК ВИЧ-1, копий/мл
Плазма крови *с предварительным ультрацентрифугированием*	1000	«РИБО-золь-Е»	Гены протеазы, обратной транскриптазы, интегразы, белка оболочки	100 РНК ВИЧ-1, копий/мл
Лейкоцитарное кольцо, полученное из цельной крови	250	«РИБО-преп»	Ген белка оболочки	500 ГЭ/мл[2] ДНК ВИЧ-1
Сухая капля крови	- (один круг, d=12 мм)	«РИБО-преп»	Ген белка оболочки	5000 ГЭ/мл ДНК ВИЧ-1

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию геномной ДНК/РНК следующих организмов и вирусов: вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр, вирус простого герпеса типы 1, 2, вирус ветряной оспы, вирус герпеса человека типы 6, 8, парвовирус В19, вирус клещевого энцефалита, вирус лихорадки западного Нила, аденовирус типы 2, 3, 7, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Homo sapiens*.

Перекрестные реакции для указанных организмов и вирусов

[2] Количество геномных эквивалентов (ГЭ) ДНК ВИЧ-1 в 1 мл образца клинического материала.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

зарегистрированы не были.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» 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 всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
1256/
12.10.2021

(профилактических) мероприятий».

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

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция РНК/ДНК из исследуемого материала

1. Стерильный ламинарный бокс.
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 25-100 °С.
3. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс g с охлаждением.
4. Вортекс.
5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
6. Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема.
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
8. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и наконечников.
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема в штативах до 200 мкл и до 1000 мкл.
10. Одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема до 200 и до 1000 мкл.
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12567
12.10.2021

13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

<u>При работе с сухими пятнами крови:</u>

14. Компостеры с диаметром 6 мм (например, Qiagen, Германия).

<u>При экстракции из 1 мл плазмы крови:</u>

15. Центрифуга с охлаждением до 24 тыс g (например, Hettish, Германия).

Проведение реакции обратной транскрипции и ПЦР

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл, от 50 до 200 мкл).
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 50 и до 200 мкл в штативах.
5. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл.
6. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
7. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Емкость для сброса наконечников.
10. Программируемый амплификатор (например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), PalmCycler (Corbett Research, Австралия)).

Проведение II раунда ПЦР (Nested-ПЦР)

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема (от 0,5 до 10 мкл, от 5 до 50 мкл, от 50 до 200 мкл).
4. Одноразовые наконечники с фильтром до 10, до 50 и до 200 мкл в штативах.
5. Одноразовые полипропиленовые пробирки для ПЦР объемом 0,2 мл.
6. Штативы для пробирок объемом 0,2 мл.
7. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

по МУ 1.3.2569-09.

9. Емкость для сброса наконечников.
10. Программируемый амплификатор (например, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США), PalmCycler (Corbett Research, Австралия)).

Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле

1. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл.
2. Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В.
3. Столик для заливки гелей.
4. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.
5. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов.
6. Аквадистиллятор или возможность централизованного получения дистиллированной воды.
7. Микроволновая печь для плавления агарозы.
8. Колба коническая из термостойкого стекла для плавления агарозы на 250 мл.
9. Мерный цилиндр на 1 л.
10. Штатив для пробирок объемом 0,5 мл или 0,2 мл (в зависимости от типа используемых пробирок).
11. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
12. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл).
13. Емкость для сброса наконечников.
14. Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.
15. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.

Очистка продуктов амплификации (с помощью комплекта реагентов «Ампли-сорб»)

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С.
3. Центрифуга/вортекс.
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12567
12.10.2021

12 тыс g.

5. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости.
6. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл, от 200 до 1000 мкл).
7. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл.
8. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 и до 1000 мкл в штативах.
9. Одноразовые наконечники без фильтра до 200 мкл в штативах.
10. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл.
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С для продуктов амплификации и реагентов, соответственно.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. Емкость для сброса наконечников.

Определение концентрации очищенных продуктов амплификации

1. Автоматические дозаторы переменного объема.
2. Одноразовые наконечники с фильтром до 10 и до 100 мкл в штативах.
3. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
4. Емкость для сброса наконечников.

<u>В случае определения концентрации спектрофотометрически:</u>

5. Спектрофотометр со специализированными кюветами для работы в УФ-диапазоне или один из приборов NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., США), Picodrop (Picodrop Limited, Великобритания).

<u>В случае определения концентрации электрофоретически:</u>

6. Дополнительные материалы и оборудование из пункта «Детекции продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле».
7. Одноразовые нестрипованные пробирки для ПЦР объемом 0,2 или 0,5 мл.
8. Штатив для пробирок объемом 0,2 или 0,5 мл.
9. Центрифуга/вортекс.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
7296
12.10.2021

Проведение реакции секвенирования:

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Центрифуга/вортекс.
3. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл).
4. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 0,5 мл и 1,5 мл.
5. Одноразовые наконечники с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл в штативах.
6. Штативы для пробирок объемом 0,5 мл или 1,5 мл.
7. При использовании форм комплектации 5, 6, 7, 8: комплект реагентов для проведения реакции секвенирования (например, BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США)).
8. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
9. Емкость для сброса наконечников.
10. 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>В случае использования пробирок для постановки реакции секвенирования:</u>

11. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл.
12. Штатив для пробирок объемом 0,2 мл.

<u>В случае использования 96-луночных планшетов для постановки реакции секвенирования:</u>

13. 96-луночные планшеты для секвенирования с септой и держателем (например, 96-Well Plate Base с 96-Well Plate Septa и 96-Well Plate Retainer (Applied Biosystems, США)).
14. Лента алюминиевой фольги с адгезивной стороной.
15. Шейкер для 96-луночных планшетов.

Очистка от невключившихся терминаторов и предварительная денатурация продуктов реакции секвенирования

1. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс).
2. Автоматические дозаторы переменного объема (от 0,5 до 10 мкл, от 5 до 50 мкл, от 20 до 200 мкл).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
Гос. 12.10.2021

3. Одноразовые наконечники с фильтром до 10, до 100 и до 200 мкл в штативах.
4. Штатив для пробирок объемом 1,5 мл.
5. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
6. Емкость для сброса наконечников.
7. 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>В случае использования пробирок:</u>

8. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 12 тыс g.
9. Адаптеры для микроцентрифуги под пробирки 0,2 мкл.
10. Центрифуга/вортекс.
11. Штатив для пробирок объемом 0,2 мл.

<u>В случае использования 96-луночных планшетов:</u>

12. Центрифуга с ротором для планшет до 2 тыс g.
13. Прозрачная адгезивная пленка.
14. Шейкер для 96-луночных планшетов.

Автоматическая детекция нуклеотидной последовательности

1. Прибор для определения нуклеотидной последовательности методом прямого секвенирования (секвенатор), например, фирмы Applied Biosystems (США):
   ABI Prism 310 Genetic Analyzer,
   Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer,
   Applied Biosystems 3100-*Avant* Genetic Analyzer,
   Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer,
   Applied Biosystems 3130*xl* Genetic Analyzer,
   Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer,
   Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer,
   Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer,
   Applied Biosystems 3730*xl* DNA Analyzer.
2. Комплект капилляров для секвенатора размером 36 см или 50 см.
3. Автоматические дозаторы переменного объема (от 5 до 50 мкл).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
Гос. 12.10.2021

4. Одноразовые наконечники с фильтром до 100 мкл в штативах.
5. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
6. Емкость для сброса наконечников.

<u>В случае использования пробирок для постановки реакции секвенирования:</u>

7. 96-луночные планшеты для секвенирования с септой и держателем (например, 96-Well Plate Base с 96-Well Plate Septa и 96-Well Plate Retainer (Applied Biosystems, США)).

Для интерпретации результатов секвенирования

1. Компьютер со стандартным пакетом Microsoft Office с выходом в интернет, соответствующий требованиям, указанным в руководстве оператора ПО «АмплиСенс® Resist» или руководстве пользователя ПО «ДЕОНА».
2. Программное обеспечение в интернете на специализированных сайтах, рекомендованных ВОЗ (<u>http://hivdb.stanford.edu</u> и <u>http://www.geno2pheno.org/</u>).

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва. Для проведения анализа используются:

- **плазма периферической 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 ч с момента взятия крови следует отобрать плазму и перенести в новую пробирку. Для этого пробирку с кровью центрифугируют 20 мин при 800-1600 g, после чего отбирают плазму и переносят в отдельную одноразовую пробирку. Хранить плазму можно не более 3 сут при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 68 °С;
- **свежая цельная кровь**, взятая утром натощак в пробирку с

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
7256/
12.10.2021

раствором ЭДТА в качестве антикоагулянта. После забора пробирка с кровью закрывается крышкой, перемешивается переворачиванием 3-4 раза и хранится при температуре от 2 до 8 °С не более 48 ч. Контейнер с материалом доставляется в лабораторию в емкости со льдом в течение 1 сут;

– **сухие пятна крови**, высушенные на бумажной карточке типа 903 (например, Whatman, Германия). Процедуру приготовления сухих пятен крови проводить в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO/CDS/CSR/EDC/2001.16 Guidelines for Using HIV Testing Technologies in Surveillance, 2009 update). Процедура нанесения крови на бумагу: на каждого пациента должна приходиться одна карточка. На каждый круг карточки наносится одна капля крови (около 50 мкл). Во время нанесения крови на бумагу необходимо, чтобы капля заняла большую часть круга. Правильно заполненной карточка считается та, у которой хотя бы три круга заполнены кровью правильно. После нанесения крови на карточку карту необходимо просушить при температуре от 18 до 25 °С в течение 4–12 ч (беречь от прямых солнечных лучей). Затем для транспортировки или хранения карточки упаковываются в пакеты типа zip-lock (пакеты, защищающие от повышенной влажности) вместе с осушителями (10 шт. на пакет) и индикатором влажности (1 шт. на пакет). В один пакет может быть упаковано до 10 индивидуальных карточек. Высушенные и упакованные карточки при низких условиях влажности могут храниться при 2–8 °С в течение 6 мес. Карточки с сухими пятнами крови могут быть транспортированы в лабораторию в течение двух недель при комнатной температуре.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
(2967)
12.10.2021

СОСТАВ

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

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
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	–	6 пробирок
Растворитель Q	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	6 пробирок
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	6 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на выделение РНК из 72 образцов, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 3, 5, 6, 7 (1 шт.), форм 4 и 8 (2 шт.).

Комплект реагентов «РИБО-преп» вариант 100 – комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета[3]	30	1 флакон
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 4	Прозрачная бесцветная жидкость	20	1 флакон
РНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	8 пробирок

[3] При хранении раствора для лизиса при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12507
12.10.2021

К комплекту реагентов прилагаются:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для лизиса	Прозрачная жидкость голубого цвета[3]	30	2 флакона
Раствор для преципитации	Прозрачная бесцветная жидкость	40	1 флакон
ПКО ДНК ВИЧ-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	3 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на экстракцию РНК/ДНК из 100 проб, включая контроли. Входит в состав форм комплектации 3, 4, 7, 8.

ГЕМОЛИТИК – реагент для предобработки цельной периферической и пуповинной крови:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Гемолитик	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон

Реагент рассчитан на предобработку 100 клинических образцов. Входит в состав форм комплектации 3, 4, 7, 8.

Комплект реагентов «ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev» – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК гена протеазы и фрагмента гена обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОТ-ПЦР-смесь-1 Pro/Rev	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	6 пробирок
ОТ-ПЦР-смесь-2-SO4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,11	6 пробирок
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	6 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	6 пробирок
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	6 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 72 реакций, включая контрольные образцы. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 4, 5, 6, 8.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект-Pro/Rev» – комплект реагентов для проведения второго раунда амплификации кДНК гена протеазы и фрагмента гена обратной транскриптазы

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
7296/
12.10.2021

вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1 Pro	Прозрачная бесцветная жидкость	0,25	6 пробирок
ПЦР-смесь-1 Rev	Прозрачная бесцветная жидкость	0,25	6 пробирок
ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	6 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	6 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 72 реакций, включая контрольные образцы. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 4, 5, 6, 8.

Комплект реагентов «ОТ-ПЦР-комплект-Int» – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК гена интегразы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОТ-ПЦР-смесь-1 Int	Прозрачная бесцветная жидкость	0,125	6 пробирок
ОТ-ПЦР-смесь-2-SO4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,11	6 пробирок
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	6 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	6 пробирок
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,01	6 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 72 реакций, включая контрольные образцы. Входит в состав форм комплектации 2, 4, 6, 8.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект-Int» – комплект реагентов для проведения второго раунда амплификации кДНК гена интегразы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1 Int	Прозрачная бесцветная жидкость	0,25	6 пробирок
ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	6 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	6 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 72 реакций,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
1256/
12.10.2021

включая контрольные образцы. Входит в состав форм комплектации 2, 4, 6, 8.

Комплект реагентов «ОТ-ПЦР-комплект-Env» – комплект реагентов для проведения реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК фрагмента гена белка оболочки (*env*) вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ОТ-ПЦР-смесь-1 Env	Прозрачная бесцветная жидкость	0,325	6 пробирок
ОТ-ПЦР-смесь-2-SO4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	6 пробирок
RT-G-mix-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	6 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	6 пробирок
ТМ-Ревертаза (MMlv)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,03	6 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 180 реакций, включая контрольные образцы. Входит в состав форм комплектации 3, 4, 7, 8.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект-Env» – комплект реагентов для проведения второго раунда амплификации кДНК фрагмента гена белка оболочки (*env*) вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
ПЦР-смесь-1 Env	Прозрачная бесцветная жидкость	0,63	6 пробирок
ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Прозрачная бесцветная жидкость	0,3	6 пробирок
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,02	6 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 180 реакций, включая контрольные образцы. Входит в состав форм комплектации 3, 4, 7, 8.

Комплект реагентов «Ампли-сорб» вариант 50 – комплект реагентов для очистки продуктов ПЦР-амплификации – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
1256/
12.10.2021

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	0,4	2 пробирки
H_2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на очистку ПЦР-продукта из 50 проб. Входит в состав форм комплектации 1, 5 (2 шт.), 2, 3, 6, 7 (3 шт.), 4, 8 (6 шт.).

Комплект реагентов «ЭФ» вариант 200 – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл Масса, г	Кол-во
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

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, 5, 6, 7 (1 шт.), 4, 8 (2 шт.).

Комплект реагентов «Комплект для подготовки к секвенированию Pro/Rev» – комплект праймеров для секвенирования гена протеазы и фрагмента гена обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) и реагентов для определения концентрации очищенных продуктов амплификации и очистки продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Праймер Pro-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер Pro-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер Rev-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер Rev-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер Rev-3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер Rev-4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Маркер молекулярных масс	Прозрачная жидкость синего цвета	0,15	2 пробирки
Буфер для нанесения образцов	Прозрачная жидкость синего цвета	0,2	3 пробирки
H_2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8	8 пробирок
Раствор F	Прозрачная бесцветная жидкость	25	3 флакона
Раствор для денатурации	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	18 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на подготовку к секвенированию 75 образцов. Входит в состав форм комплектации 1, 2, 4, 5, 6, 8.

Комплект реагентов «Комплект для подготовки к секвенированию Int» – комплект праймеров для секвенирования гена интегразы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) и реагентов для определения концентрации очищенных продуктов амплификации и очистки продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Праймер Int-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер Int-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер Int-3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер Int-4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Маркер молекулярных масс	Прозрачная жидкость синего цвета	0,15	1 пробирка
Буфер для нанесения образцов	Прозрачная жидкость синего цвета	0,2	2 пробирки
H_2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8	4 пробирки
Раствор F	Прозрачная бесцветная жидкость	25	2 флакона
Раствор для денатурации	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	12 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на подготовку к секвенированию 50 образцов. Входит в состав форм комплектации 2, 4, 6, 8.

Комплект реагентов «Комплект для подготовки к секвенированию Env» – комплект праймеров для секвенирования фрагмента гена белка оболочки вируса

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) и реагентов для определения концентрации очищенных продуктов амплификации и очистки продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов – **включает:**

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Праймер Env-1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	3 пробирки
Праймер Env-2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	3 пробирки
Маркер молекулярных масс	Прозрачная жидкость синего цвета	0,15	3 пробирки
Буфер для нанесения образцов	Прозрачная жидкость синего цвета	0,2	4 пробирки
H_2O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8	12 пробирок
Раствор F	Прозрачная бесцветная жидкость	25	3 флакона
Раствор для денатурации	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	18 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на подготовку к секвенированию 50 образцов. Входит в состав форм комплектации 3, 4, 7, 8.

Комплект реагентов «Комплект для секвенирования» включает:

Реактив	Описание	Объем, мл	Кол-во
Смесь Seq	Прозрачная жидкость розового цвета	0,02	6 пробирок
5х буфер Seq	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	6 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций секвенирования. Входит в состав форм комплектации 1 и 3 (3 шт.), 2 (5 шт.), 4 (8 шт.).

Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist» версия 01, дата выпуска 06.03.2020 (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) – находится на официальном сайте Изготовителя, – или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014 (АО «РМБит») – на цифровом носителе.

ЭТАП 1. ЭКСТРАКЦИЯ РНК/ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

(проводится в зоне Экстракции – помещении для экстракции нуклеиновых кислот)

1. Исследуемый материал – **плазма крови.**

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
1268
12.10.2021

Экстракция РНК из плазмы крови проводится для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ в гене протеазы, фрагментах гена обратной транскриптазы и гена интегразы, а также при определении тропизма ВИЧ. Порядок экстракции РНК из образцов плазмы с использованием комплекта реагентов **«РИБО-золь-Е»** (объем пробы для экстракции: 0,2 мл или 1,0 мл) см. в **Приложении 1.**

ВНИМАНИЕ! Экстракция РНК производится из образцов плазмы крови, в которых концентрация РНК ВИЧ более 100 копий/мл. Если концентрация РНК ВИЧ в образце более 500 копий/мл рекомендуется проводить экстракцию из 200 мкл плазмы крови. Если концентрация РНК ВИЧ в образце в диапазоне от 100 до 500 копий/мл, анализ необходимо проводить с предварительным ультрацентрифугированием 1,0 мл плазмы крови.

2. Исследуемый материал – **цельная кровь, сухие пятна крови.**

ВНИМАНИЕ! Экстракция ДНК из образцов цельной крови или сухих пятен крови проводится только при определении тропизма ВИЧ.

Порядок экстракции ДНК из образцов **цельной крови** с использованием комплекта реагентов **«РИБО-преп»** (для исследования используется лейкоцитарное кольцо, полученное из цельной крови; объем исследуемой пробы – 250 мкл) см. в **Приложении 2 (А1)**.

Порядок экстракции ДНК из **сухих пятен крови** с использованием комплекта реагентов **«РИБО-преп»** (объем исследуемой пробы – одно сухое пятно) см. в **Приложении 2 (А2)**.

ВНИМАНИЕ! Рекомендуемый алгоритм анализа клинических образцов при определении тропизма ВИЧ указан на схеме 1. Однако определение тропизма ВИЧ также возможно:

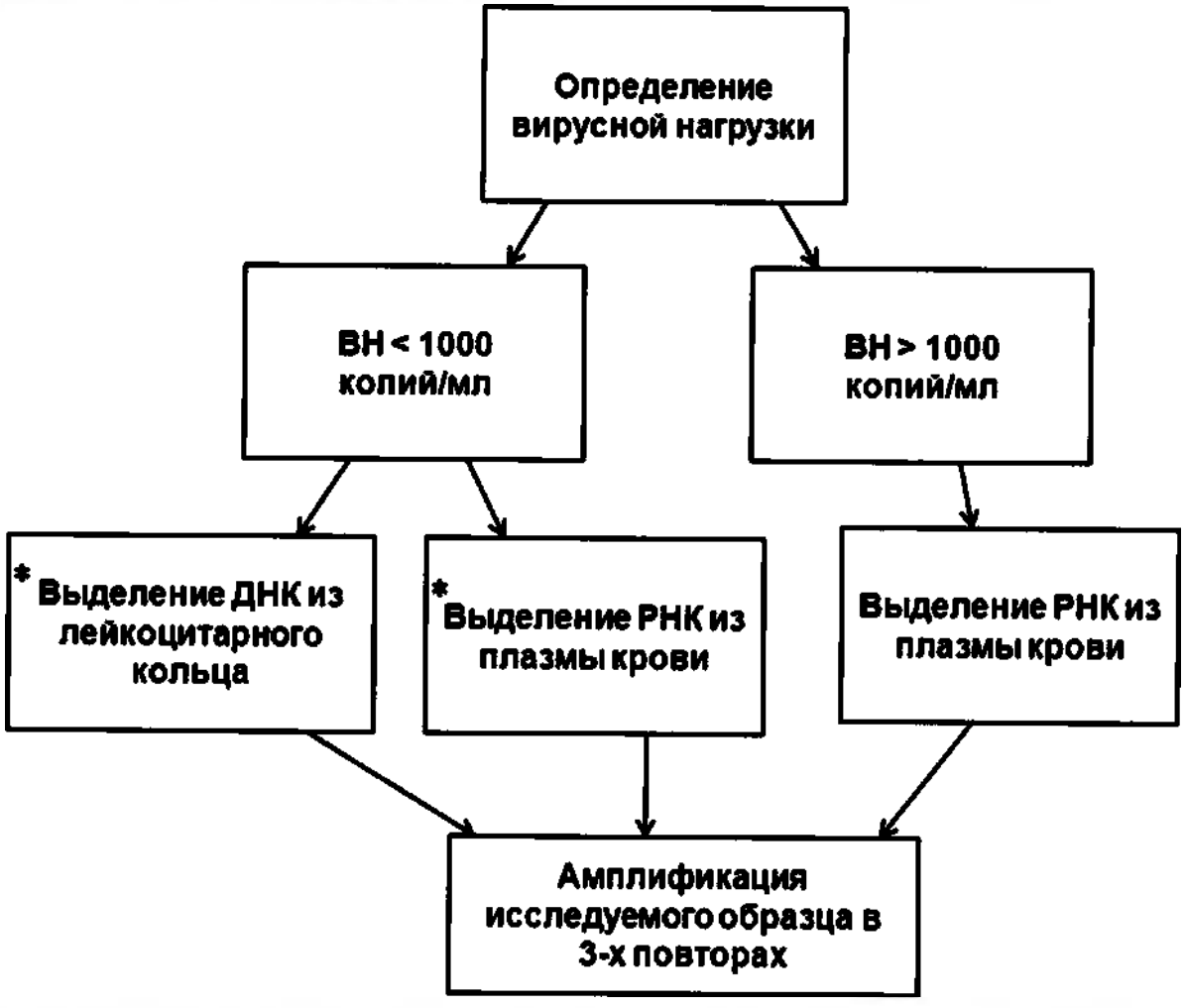
- с использованием РНК ВИЧ, выделенной из 200 мкл плазмы крови, если после определения концентрации РНК ВИЧ вирусная нагрузка образца составила от 500 до 1000 копий/мл,
- с использованием РНК ВИЧ, выделенной из 1000 мкл плазмы крови с предварительным ультрацентрифугированием, если после определения

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
1268
12.10.2021

концентрации РНК ВИЧ вирусная нагрузка образца оказалась в диапазоне от 100 до 500 копий/мл,

– с использованием сухих пятен крови в качестве клинического материала (необходимо учитывать, что в этом случае чувствительность будет меньше по сравнению с анализом, где в качестве клинического материала используется цельная кровь).

Схема 1 – Рекомендуемый алгоритм анализа клинических образцов при определении тропизма ВИЧ.



* В случае вирусной нагрузки исследуемого образца менее 1000 копий/мл анализ может быть выполнен как на матрице РНК, так и на матрице ДНК. Однако рекомендуется проведение анализа на матрице ДНК, вследствие более короткого времени проведения анализа, а также меньшей трудоемкости.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
7296/
12.10.2021

<u>ЭТАП 2.</u> ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И АМПЛИФИКАЦИИ. I РАУНД
(проводится в зоне Амплификации – помещении для проведения ПЦР).
ВНИМАНИЕ! При работе с РНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку RNase-free, DNase-free.
Для внесения в пробирки реагентов, проб РНК/ДНК и контрольных образцов используются одноразовые наконечники с фильтрами.

<u>Протокол А.</u> Проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК гена протеазы и фрагмента гена обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

Общий объем реакции – 40 мкл, объем пробы РНК – 20 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **ОТ-ПЦР-смесью-1 Pro/Rev** добавить **9 мкл RT-G-mix-1** и **110 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-SO4,** тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
3. К полученному раствору добавить **20 мкл полимеразы (TaqF)** и **10 мкл ТМ-Ревертазы (MMlv)**, перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.

Примечание – в случае приготовления реакционной смеси на другое количество реакций смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении:

9 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1 Pro/Rev,
8 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-SO4,
0,7 мкл RT-G-mix-1,
1,5 мкл полимеразы (TaqF),
0,7 мкл ТМ-Ревертазы (MMlv).

4. Внести в каждую пробирку по **20 мкл** подготовленной реакционной смеси.
5. В подготовленные пробирки внести по **20 мкл проб РНК**, полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
№2967 12.10.2021

6. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 1).

Таблица 1

Программа ОТ-ПЦР генов протеазы (Pro) и обратной транскриптазы (Rev) РНК ВИЧ

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	45	30 мин	1
2	95	10 мин	1
3	95	30 с	30
	50	30 с	
	72	1 мин 30 с	
4	72	5 мин	1
5	4-10	хранение	

7. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу амплификации.
8. 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 и оборудования.

Протокол Б. Проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК гена интегразы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

Общий объем реакции – 40 мкл, объем пробы РНК – 20 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **ОТ-ПЦР-смесью-1 Int** добавить **9 мкл RT-G-mix-1** и **110 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-SO4,** тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.
3. К полученному раствору добавить **20 мкл полимеразы (TaqF)** и **10 мкл ТМ-Ревертазы (MMlv)**, перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.

Примечание – В случае приготовления реакционной смеси на другое количество реакций смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении:

9 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1 Int,
8 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-SO4,
0,7 мкл RT-G-mix-1,
1,5 мкл полимеразы (TaqF),

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12567
12.10.2021

0,7 мкл ТМ-Ревертазы (MMlv).

4. Внести в каждую пробирку по **20 мкл** подготовленной реакционной смеси.
5. В подготовленные пробирки внести по **20 мкл проб РНК, полученных в результате экстракции** из исследуемых и контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.
6. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 2).

Таблица 2

Программа ОТ-ПЦР гена интегразы (Int) РНК ВИЧ

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	45	30 мин	1
2	95	10 мин	1
3	95	30 с	30
	50	30 с	
	72	1 мин 30 с	
4	72	5 мин	1
5	4-10	хранение	

7. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу амплификации
8. 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 и оборудования.

Протокол В. Проведение реакции обратной транскрипции РНК и амплификации кДНК фрагмента гена белка оболочки вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

ВНИМАНИЕ! Начиная с этапа ОТ-ПЦР, РНК каждого клинического образца анализируется в трех повторах. Контрольные образцы анализируются в одном повторе.

Общий объем реакции – 40 мкл, объем пробы РНК – 20 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 30 реакций (9 клинических образцов в трех повторах и 3 контрольных образца в одном повторе). Для этого в пробирку с **ОТ-ПЦР-смесью-1 Env** добавить **30 мкл RT-G-mix-1** и **300 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-SO4**, тщательно перемешать на вортексе,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

осадить капли с крышки пробирки.

3. К полученному раствору добавить **60 мкл полимеразы (TaqF) и 30 мкл ТМ-Ревертазы (MMlv)**, перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.

Примечание – В случае приготовления реакционной смеси на другое количество реакций смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении:

9 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1 Env,
8 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-SO4,
0,7 мкл RT-G-mix-1,
1,5 мкл полимеразы (TaqF),
0,7 мкл ТМ-Ревертазы (MMlv).

4. Внести в каждую пробирку по **20 мкл** подготовленной реакционной смеси.
5. В подготовленные пробирки внести по **20 мкл проб РНК,** полученных в результате экстракции из исследуемых или контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.

ВНИМАНИЕ! РНК, выделенную из каждого клинического образца, внести в три пробирки.

6. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 3).

Таблица 3

Программа ОТ-ПЦР гена белка оболочки РНК ВИЧ

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	45	30 мин	1
2	95	10 мин	1
3	95	30 с	30
	55	30 с	
	72	1 мин 30 с	
4	72	5 мин	1
5	4-10	хранение	

7. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу амплификации
8. 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 и оборудования.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
/2967/
12.10.2021

Протокол Г. Проведение реакции амплификации ДНК фрагмента гена белка оболочки вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

ВНИМАНИЕ! Данный протокол может быть использован только в случае предварительной экстракции ДНК ВИЧ из клинического материала (цельная кровь, сухие пятна крови).

ВНИМАНИЕ! Начиная с этапа ПЦР, ДНК каждого клинического образца анализируется в трех повторах. Контрольные образцы анализируются в одном повторе.

ВНИМАНИЕ! Реагент **ОТ-ПЦР-смесь-1 Env** используется из комплекта реагентов «ОТ-ПЦР-комплект-Env», а реагенты **ОТ-ПЦР-смесь-2-FL** и **полимераза (TaqF)** – из комплекта «ПЦР-комплект-Env».

Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 13 мкл.

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл.
2. Приготовить реакционные смеси на необходимое количество реакций. Для этого в отдельной одноразовой пробирке смешать реагенты: **ОТ-ПЦР-смесь-1 Env**, **ОТ-ПЦР-смесь-2-FL** и **полимеразу (TaqF)** стерильными наконечниками с фильтром (табл. 4) из расчета на 1 реакцию:
   6,5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-1 Env,
   5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FL,
   0,5 мкл полимеразы (TaqF).

Таблица 4

Схема приготовления реакционной смеси для гена белка оболочки ДНК ВИЧ

Число амплифицируемых образцов	Объем, мкл		
	ОТ-ПЦР-смесь-1 Env	ОТ-ПЦР-смесь-2-FL	Полимераза (TaqF)
10	65	50	5
16	104	80	8
22	143	110	11
28	182	140	14
32	208	160	16

3. Внести в каждую пробирку по **12 мкл** подготовленной реакционной смеси.
4. В подготовленные пробирки внести по **13 мкл проб ДНК**,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

полученных в результате экстракции из исследуемых и контрольных образцов. Осторожно перемешать пипетированием.

ВНИМАНИЕ! ДНК, выделенную из каждого клинического образца, внести в три пробирки.

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

Таблица 5

Программа ПЦР гена белка оболочки ДНК ВИЧ

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	15 с	45
	55	30 с	
	72	40 с	
3	72	5 мин	1
5	4-10	хранение	

6. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу амплификации
7. После окончания реакции пробирки отправить в помещение для детекции продуктов амплификации и проведения реакции секвенирования (зону Детекции). Пробы после амплификации можно хранить в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1-2 мес при температуре не выше минус 16 °С.

ЭТАП 3. ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ. II РАУНД
(проводится в зоне Амплификации – помещении для проведения амплификации).
Общий объем реакции – 25 мкл, объем пробы ДНК – 2,0 мкл.

Протокол А. Проведение II-го раунда амплификации ДНК гена протеазы и фрагмента гена обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл. Необходимо учитывать, что для каждого образца необходимо приготовить две пробирки – одну для II раунда амплификации ДНК гена протеазы, а другую для II раунда амплификации ДНК гена обратной транскриптазы.
2. Приготовить реакционные смеси на 12 реакций отдельно для генов протеазы (pro) и обратной транскриптазы (rev).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12967
12.10.2021

Для этого в пробирки с **ПЦР-смесью-1 Pro** и **ПЦР-смесью-1 Rev** добавить по **70 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FL**, а затем по **7 мкл полимеразы (TaqF)**, тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышек пробирок.

Примечание – В случае приготовления реакционной смеси на другое количество реакций смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении:

17,5 мкл ПЦР-смеси-1 Pro (или ПЦР-смеси-1 Rev),
5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FL,
0,5 мкл полимеразы (TaqF).

3. Внести в каждую пробирку по **23 мкл** подготовленной реакционной смеси.
4. В подготовленные пробирки внести по **2,0 мкл ПЦР-продукта, полученного в первом раунде амплификации**. ПЦР-продукт каждого образца вносится в две пробирки – pro и rev.

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. 6).

Таблица 6

Программа II-го раунда ПЦР генов протеазы (Pro) и обратной транскриптазы (Rev) ДНК ВИЧ

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	30 с	30
	56	30 с	
	72	1мин	
3	72	5 мин	1
4	4-10	хранение	

6. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу амплификации
7. После окончания реакции пробирки отправить в помещение для детекции продуктов амплификации и проведения реакции секвенирования (зону Детекции). Пробы после амплификации можно хранить в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1-2 мес при температуре не выше минус 16 °С.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12567
12.10.2021

Протокол Б. Проведение II-го раунда амплификации ДНК гена интегразы (Int) вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 12 реакций. Для этого в пробирку с **ПЦР-смесью-1 Int** добавить **70 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FL,** а затем **7 мкл полимеразы (TaqF),** тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.

Примечание – В случае приготовления реакционной смеси на другое количество реакций смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении:

17,5 мкл ПЦР-смеси-1 Int,
5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FL,
0,5 мкл полимеразы (TaqF).

3. Внести в каждую пробирку по **23 мкл** подготовленной реакционной смеси.
4. В подготовленные пробирки, внести по **2,0 мкл ПЦР-продукта, полученного 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 загрязнения лаборатории продуктами амплификации.

5. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 7).

Таблица 7

Программа II-го раунда ПЦР гена интегразы (Int) ДНК ВИЧ

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	30 с	30
	56	30 с	
	72	1мин	
3	72	5 мин	1
4	4-10	хранение	

6. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу амплификации
7. После окончания реакции пробирки отправить в помещение для детекции продуктов амплификации и проведения реакции секвенирования (зону Детекции). Пробы после

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12567
12.10.2021

амплификации можно хранить в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1-2 мес при температуре не выше минус 16 °С.

Протокол В. Проведение II-го раунда амплификации ДНК фрагмента гена белка оболочки вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

ВНИМАНИЕ! II-й раунд амплификации ДНК фрагмента гена белка оболочки проводится с ДНК, полученной в первом раунде с матрицы РНК в ходе ОТ-ПЦР (см.Этап 2. Протокол В).

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл.
2. Приготовить реакционную смесь на 30 реакций (9 клинических образцов в трех повторах и 3 контрольных образца в одном повторе). Для этого в пробирку с **ПЦР-смесью-1 Env** добавить **180 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FL**, а затем **18 мкл полимеразы (TaqF)**, тщательно перемешать на вортексе, осадить капли с крышки пробирки.

Примечание – В случае приготовления реакционной смеси на другое количество реакций смешать компоненты из расчета на 1 реакцию в следующем соотношении:

17,5 мкл ПЦР-смеси-1 Env,
5 мкл ОТ-ПЦР-смеси-2-FL,
0,5 мкл полимеразы (TaqF).

3. Внести в каждую пробирку по **23 мкл** подготовленной реакционной смеси.
4. В подготовленные для ПЦР пробирки, внести по **2,0 мкл ПЦР-продукта, полученного 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 загрязнения лаборатории продуктами амплификации.

5. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 8).

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
1268
12.10.2021

Таблица 8

Программа II-го раунда ПЦР гена белка оболочки (Env) ДНК ВИЧ

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	15 мин	1
2	95	15 с	35
	55	30 с	
	72	40 с	
3	72	5 мин	1
4	4-10	хранение	

6. Установить пробирки в ячейки амплификатора и запустить программу амплификации
7. После окончания реакции пробирки отправить в помещение для детекции продуктов амплификации и проведения реакции секвенирования (зону Детекции). Пробы после амплификации можно хранить в течение 3 сут при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1-2 мес при температуре не выше минус 16 °С.

ЭТАП 4. ПОДГОТОВКА И ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

ОЧИСТКА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

(проводится в зоне Детекции – 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 манипуляций в зонах Экстракции и Амплификации.

Для проведения очистки продуктов амплификации в состав набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq» входит комплект реагентов «Ампли-сорб». Однако данный этап может быть проведен другими способами, с использованием реагентов и расходных материалов, не входящих в состав набора.

ВНИМАНИЕ! Очистке подвергаются только клинические образцы. Положительные и отрицательный контроли очистке не подвергаются.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12967
12.10.2021

ОЧИСТКА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ «Ампли-сорб»

1. **Лизирующий раствор** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 60-65°С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками с учетом количества исследуемых образцов. Промаркировать пробирки.
3. В промаркированные пробирки внести по **300 мкл лизирующего раствора**, затем добавить по **20 мкл продукта ПЦР**, тщательно перемешать на вортексе. Сбросить капли с крышки кратким центрифугированием.
4. Ресуспендировать **сорбент**, интенсивно перемешивая на вортексе. В пробирки с исследуемыми пробами добавить отдельным наконечником по **10 мкл** ресуспендированного **сорбента.**
5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 10 мин при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые 2 мин.
6. Центрифугировать пробы при 10 тыс g в течение 1 мин.
7. Удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, используя вакуумный отсасыватель.
8. Добавить в пробирки по 500 мкл **раствора для отмывки 2**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 10 тыс g в течение 1 мин.
9. Удалить надосадочную жидкость и добавить по 500 мкл **раствора для отмывки 3**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 10 тыс g в течение 1 мин.
10. Тщательно удалить надосадочную жидкость и высушить осадок сорбента при открытых крышках пробирок в термостате при температуре 60 °С в течение 3-5 мин.
11. Добавить в пробирки **40 мкл H_2O стерильной**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, инкубировать при комнатной температуре в течение 5 мин.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12567
12.10.2021

12. Перемешать на вортексе. Осадить сорбент на микроцентрифуге при 10 тыс g в течение 2 мин.
13. Отобрать 30 мкл надосадочной жидкости каждого образца и перенести в новые промаркированные пробирки на 0,5 мл. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к оценке концентрации и постановке реакции секвенирования.

ВНИМАНИЕ! Отбирать ДНК для исследования нужно очень осторожно, **не захватывая сорбент**. Если сорбент взмутился, необходимо осадить его на центрифуге.

Полученные пробы можно хранить в течение длительного времени при температуре не выше минус 16 °С.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
1258/
12.10.2021

ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ ОЧИЩЕННЫХ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКЕРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ИЗ «КОМПЛЕКТА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К СЕКВЕНИРОВАНИЮ»

(проводится в зоне Детекции – помещении для детекции продуктов амплификации)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зонах Экстракции и Амплификации.

Перед постановкой реакции секвенирования необходимо оценить концентрацию очищенных продуктов амплификации (ПЦР-продуктов), исходя из которой определить объем ПЦР-продукта, который будет использован для проведения реакции секвенирования, т.к. количество вносимого в реакцию ПЦР-продукта может влиять на качество получаемых хроматограмм. Избыточное количество ампликонов приводит к получению хроматограмм с большой амплитудой пиков в начале прогона и быстрым падением амплитуды пиков в конце прогона, недостаточное количество – уменьшает выраженность сигнала и высоту пика. Оценка концентрации осуществляется с помощью электрофоретической детекции в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200.

Объем очищенного ПЦР-продукта – 5 мкл.

Для внесения реагентов и ПЦР-продукта используются одноразовые наконечники с фильтрами.

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

1. Приготовить агарозный гель. При использовании комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200 производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора см. **приложение 3** «Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200».

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
Проект
12.10.2021

2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 0,5 мл с учетом количества клинических и контрольных образцов. Промаркировать пробирки.
3. Раскапать на дно промаркированных пробирок по **5 мкл буфера для нанесения образцов**.
4. В подготовленные пробирки с буфером для нанесения образцов внести по **5 мкл очищенного ПЦР-продукта** согласно маркировке, используя новый наконечник для каждой пробы. Тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок. Оставшийся объем **очищенного ПЦР-продукта** поместить в холодильник и хранить при температуре не выше минус 16 °С до следующего этапа работы (проведение реакции секвенирования).
5. Аккуратно внести **10 мкл маркера молекулярных масс** в первую лунку геля и **5 мкл маркера молекулярных масс** во вторую 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.
6. Аккуратно внести **весь объем подготовленной смеси ПЦР-продукта с буфером для нанесения образцов** в свободные лунки геля, используя **новый** наконечник для каждой пробы. Избегать перетекания образцов в соседние лунки.
7. Для каждого амплифицируемого гена должны быть обязательно представлены **ОК**, **ВПК**, **НПК**. Аналогично клиническим образцам приготовить смесь контрольных образцов с **буфером для нанесения образцов** и внести в свободные лунки геля. Для более точного учета результатов контрольные и клинические образцы по каждому амплифицируемому гену рекомендуется располагать на одном ряду.
8. Провести электрофоретическую детекцию согласно приложению 3.
9. Последовательно провести: а) учет результатов в контрольных и исследуемых образцах, б) оценку концентрации в исследуемых образцах.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
1258
12.10.2021

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов ПЦР-исследования проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК гена протеазы, фрагмента гена обратной транскриптазы, гена интегразы и фрагмента гена белка оболочки вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1).

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

Учет результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты для положительных и отрицательного контролей, в соответствии с таблицей оценки результатов контрольных реакций (см. табл. 9).

Таблица 9

Результаты для контролей

Контроль	Контролируемый этап	Специфическая полоса на электрофореграмме
ОК	Экстракция РНК/ДНК, ПЦР	Нет
ВПК	Экстракция РНК/ДНК, ПЦР	**Есть**
НПК	Экстракция РНК/ДНК, ПЦР	**Есть**

1. В дорожках с положительными контролями провести визуальное сравнение размеров специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК соответствующего размера (табл. 10) с **маркером молекулярных масс.** Характеристика полос **маркера молекулярных масс** приведена в табл. 11.

Таблица 10

Молекулярные массы амплифицируемых фрагментов ДНК

Амплифицируемая мишень	Размер целевого фрагмента ДНК, пн
Ген протеазы (*pro*)	**570**
Фрагмент гена обратной транскриптазы (*rev*)	**765**
Ген интегразы (*int*)	**1085**
Фрагмент гена белка оболочки (*env*) при анализе ДНК ВИЧ-1	**799**
Фрагмент гена белка оболочки (*env*) при анализе РНК ВИЧ-1	**424**

2. В дорожках, соответствующих отрицательным контролям этапа экстракции, не должно быть никаких полос.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если в каком-либо положительном контроле не выявляется специфическая светящаяся полоса, то это может свидетельствовать об ошибках, допущенных на этапе экстракции нуклеиновых кислот и/или постановках ОТ-ПЦР и II-го раунда ПЦР. В этом случае требуется повторить исследование клинических образцов, в которых не обнаружены специфические полосы, начиная с этапа экстракции для тех генов, для которых положительный контроль был отрицательным. Например, если в положительном контроле на ген протеазы отсутствует специфическая полоса, необходимо повторить исследование на ген протеазы для всех клинических образцов, оказавшихся отрицательными по этому гену.
2. Если в отрицательном контроле (ОК) выявляется светящаяся полоса, то это может свидетельствовать о контаминации реактивов или исследуемых образцов. Требуется повторить исследование для всех положительных образцов, начиная с первого этапа анализа (с экстракции нуклеиновых кислот), а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Учет результатов в исследуемых образцах

1. Образцами, подходящими для секвенирования, считаются образцы, которые содержат специфические светящиеся полосы на уровнях, соответствующих уровням фрагментов ДНК контрольных образцов большей или меньшей интенсивности даже при наличии слабых неспецифических полос.

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

2. **При проведении анализа наличия мутаций резистентности в генах протеазы, обратной транскриптазы и интегразы.** 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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

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».

3. **При проведении анализа определения тропизма ВИЧ.** Для образцов, амплифицированных на матрице РНК после экстракции из плазмы крови и не содержащих специфических светящихся полос на необходимом уровне, необходимо провести повторное исследование, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот. Однако в этом случае необходимо провести анализ, исследуя провирусную ДНК вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). То есть, необходимо провести экстракцию ДНК ВИЧ-1 из клеток крови, а затем провести один раунд ПЦР для амплификации целевого фрагмента ДНК. 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».

ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

1. Концентрация ДНК в каждом исследуемом образце определяется путем сравнения интенсивности свечения специфических полос образцов с интенсивностью свечения полос **маркера молекулярных масс.** Характеристика полос **маркера молекулярных масс** приведена в табл.11. Определение концентрации ДНК исследуемого образца ведется по трем верхним полосам **маркера молекулярных масс**.

Таблица 11

Характеристика маркера молекулярных масс

Положение полосы маркера на агарозном геле	Размер полосы, п.н.	Количество нг в 10 мкл маркера	Количество нг в 5 мкл маркера
Верхняя	1000	100	50
Вторая	700	70	35
Третья	500	50	25

2. Концентрация ДНК в каждом исследуемом образце определяется путем сравнения интенсивности

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

специфических полос образцов с интенсивностью свечения полос **маркера молекулярных масс.** На рис. 1 представлен результат электрофореза образцов имеющих различные концентрации ДНК. После определения примерной концентрации ДНК в каждом образце необходимо подготовить ПЦР-продукты к секвенированию, доведя концентрацию фрагментов с помощью **H_2O стерильной** до необходимой для проведения реакции секвенирования согласно рекомендациям, указанным в табл. 11а.

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

Таблица 11а

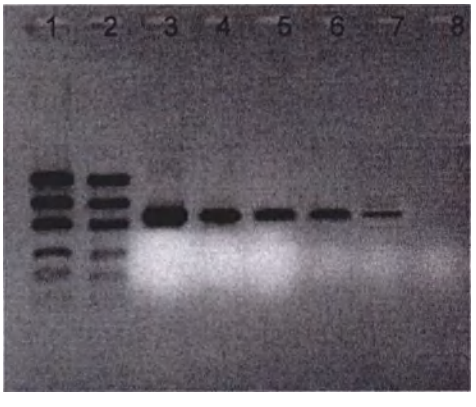
Определение количества ДНК в исследуемых образцах и разведение до необходимой концентрации

Порядковый номер в агарозном геле на рис.1	Интенсивность свечения полосы образца по сравнению с интенсивностью свечения определенных полос маркера молекулярных масс	Примерное количество нг в 5 мкл исследуемого образца	Объем H_2O стерильной для доведения ПЦР-продуктов до рабочей концентрации (кратность разведения), мкл
3	Больше интенсивности свечения полосы размером 1000 п.н., содержащей 100 нг	Более 100	150 (разведение в 7 раз)
4	Больше интенсивности свечения полосы размером 1000 п.н. маркера в количестве 5 мкл, но меньше интенсивности свечения полосы размером 1000 п.н. маркера в количестве 10 мкл, содержащих 50 и 100 нг соответственно	60-100	75 (разведение в 4 раза)
5	Больше интенсивности свечения полосы размером 700 п.н. маркера в количестве 5 мкл, но меньше интенсивности свечения полосы размером 700 п.н. маркера в количестве 10 мкл, содержащих 35 и 70 нг соответственно	40-60	40 (разведение в 2,6 раза)

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12967
12.10.2021

Порядковый номер в агарозном геле на рис.1	Интенсивность свечения полосы образца по сравнению с интенсивностью свечения определенных полос маркера молекулярных масс	Примерное количество нг в 5 мкл исследуемого образца	Объем H_2O стерильной для доведения ПЦР-продуктов до рабочей концентрации (кратность разведения), мкл
6	Больше интенсивности свечения полосы размером 500 п.н. маркера в количестве 5 мкл, но меньше интенсивности свечения полосы размером 500 п.н. маркера в количестве 10 мкл, содержащих 25 и 50 нг соответственно	20-40	15 (разведение в 1,6 раза)
7	Меньше интенсивности свечения полосы размером 500 п.н., содержащей 25 нг	Менее 20	Не требуется добавления

Рисунок 1 – Агарозный гель с исследуемыми образцами различных концентраций.



1. Маркер молекулярного веса, нанесено 10 мкл.
2. Маркер молекулярного веса, нанесено 5 мкл.
3. Исследуемый образец, нанесено более 100 нг.
4. Исследуемый образец, нанесено от 60 до 100 нг.
5. Исследуемый образец, нанесено от 40 до 60 нг.
6. Исследуемый образец, нанесено от 20 до 40 нг.
7. Исследуемый образец, нанесено менее 20 нг.
8. Отрицательный исследуемый образец.

ВНИМАНИЕ! В случае определения концентрации исследуемых образцов другим способом необходимо учитывать, что рекомендуемое количество ПЦР-продукта, вносимое в реакцию секвенирования, составляет 20 нг.

ПОДГОТОВКА И ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СЕКВЕНАТОРОВ ФИРМЫ Applied Biosystems, США

(проводится в зоне Детекции – помещении для детекции продуктов амплификации)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12967
12.10.2021

не производящим манипуляций в зонах Экстракции и Амплификации.

Секвенирование ПЦР-фрагментов вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) с целью анализа наличия мутаций резистентности, а также исследования тропизма осуществляется по следующей схеме:

1. Секвенирование гена протеазы осуществляется с двух праймеров.
2. Секвенирование фрагмента гена обратной транскриптазы осуществляется с четырех праймеров.
3. Секвенирование гена интегразы осуществляется с четырех праймеров.
4. Секвенирование фрагмента гена белка оболочки осуществляется с двух праймеров.

Исходя из задач анализа, необходимо приготовить необходимое количество секвенирующих смесей, каждая из которых содержит определенный праймер из соответствующего комплекта реагентов **«Комплект для подготовки к секвенированию»** и флуоресцентно-меченые терминаторы. В случае использования набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq» в формах комплектации 1, 2, 3, 4 флуоресцентно-меченые терминаторы входят в состав комплекта реагентов **«Комплект для секвенирования»**. В случае использования набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq» в формах комплектации 5, 6, 7, 8 флуоресцентно-меченые терминаторы не входят в состав и необходимо использовать дополнительно комплект реагентов **BigDye Terminator v1.1/v3.1 Cycle Sequencing Kit** в соответствии с инструкцией производителя (Applied Biosystems, США).

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ЦИКЛИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Общий объем реакционной смеси – 10 мкл, включая объем пробы ПЦР-продукта.

<u>Протокол А1.</u> В случае использования набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq» в формах комплектации 1, 2, 3, 4.

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе праймеры из **«Комплекта для**

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

подготовки к секвенированию» и реагенты **«Комплекта для секвенирования»**, осадить капли с крышек пробирок. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

ВНИМАНИЕ! Реагенты, входящие в состав **«Комплекта для секвенирования»** светочувствительны! Не оставлять на свету в течение длительного времени!

ВНИМАНИЕ! Необходимо использовать новые наконечники с фильтрами для внесения образца в пробирки с разными реакционными смесями.

Порядок работы

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл или 96-луночный планшет (в зависимости от модели используемого прибора) для проведения реакции секвенирования исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Для каждого исследуемого образца необходимо приготовить количество пробирок объемом 0,2 мл (если реакция циклического секвенирования будет проводиться в пробирках), соответствующее числу праймеров для секвенирования. При этом пробирки необходимо промаркировать следующим образом «№ образца/название праймера» (например, «1/Pro1», «1/Pro2», «1/Rev1», «1/Rev2», «1/Rev3», «1/Rev4»).

2. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,5 мл, соответствующее числу праймеров для секвенирования, для приготовления реакционных смесей. Промаркировать пробирки согласно используемым праймерам для секвенирования (например, «Pro1», «Pro2», «Rev1», «Rev2», «Rev3», «Rev4»).
3. В каждую из пробирок для приготовления реакционных смесей внести из расчета на 1 реакцию: **1,0 мкл смеси Seq, 2,0 мкл 5x буфера Seq, 2,0 мкл соответствующего праймера** из комплекта реагентов «Комплект для подготовки к секвенированию» (например, **праймер Pro-1** вносится в пробирку «Pro1», **праймер Pro-2** вносится в пробирку «Pro2» и т.д.). Реакционные смеси необходимо готовить с запасом на один образец (табл. 12). Полученные реакционные смеси перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

Таблица 12

Приготовление реакционных смесей для реакции секвенирования

Объем реагентов на 1 реакцию, мкл	1,0 мкл	2,0 мкл	2,0 мкл
Объем реагентов на указанное кол-во реакций	Смесь Seq[4], мкл	5х буфер Seq[4], мкл	Праймер[4], мкл
5	6	12	12
7	8	16	16
9	10	20	20
15	16	32	32
20	21	42	42

4. Аккуратно добавить в каждую пробирку (лунку планшета) в соответствии с маркировкой по **5 мкл** каждой из приготовленных реакционных смесей.

ВНИМАНИЕ! При использовании пробирок объемом 0,2 мкл реакционная смесь Pro1 вносится в пробирки, промаркированные № образца/Pro1. Реакционная смесь Pro2 вносится в пробирки, промаркированные № образца/Pro2 и т.д. При использовании 96-луночного планшета реакционные смеси вносятся в определенные лунки в соответствии с шаблоном заполнения.

5. В подготовленные пробирки (лунки планшета) с раскапанными реакционными смесями аккуратно внести по **5 мкл** очищенных ПЦР-продуктов.

ВНИМАНИЕ! Каждый исследуемый образец внести в необходимое количество пробирок/лунок планшета, содержащих раскапанные реакционные смеси (при исследовании генов протеазы и обратной транскриптазы – в 6, интегразы – в 4, определении тропизма – в 2), используя при этом **каждый раз** новый наконечник с фильтром.

6. Закрыть крышки пробирок. При использовании планшета закрыть его специальным материалом, предназначенным для этих целей (например, прозрачной адгезивной пленкой).
7. Перед постановкой в амплификатор при использовании пробирок перемешать пробы на вортексе и осадить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием на вортексе

[4] Объемы вносимых реагентов приведены с запасом на 1 образец.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

(1-3 с); при использовании планшетов перемешать пробы на шейкере для планшетов и центрифугировать планшеты на центрифуге с ротором для планшетов при 2 тыс g в течении 5 с.

Протокол А2. В случае использования набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq» в формах комплектации 5, 6, 7, 8.

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе праймеры из **«Комплекта для подготовки к секвенированию»**, осадить капли с крышек пробирок.

Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

Порядок работы

1. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл или 96-луночный планшет (в зависимости от модели используемого прибора) для проведения реакции секвенирования исследуемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Для каждого исследуемого образца необходимо приготовить количество пробирок, кратное числу праймеров для секвенирования. При этом пробирки необходимо промаркировать следующим образом: № образца/название праймера (например, 1/Pro1, 1/Pro2, 1/Rev1, 1/Rev2, 1/Rev3, 1/Rev4).

2. Отобрать необходимое количество пробирок объемом 0,5 мл, кратное числу праймеров для секвенирования, для приготовления реакционных смесей. Промаркировать пробирки согласно используемым праймерам для секвенирования (например, Pro1, Pro2, Rev1, Rev2, Rev3, Rev4).
3. В каждой пробирке приготовить реакционные смеси, используя соответствующий праймер и стерильную H_2O из комплекта реагентов «Комплект для подготовки к секвенированию», а также **BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit** (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя. Реакционные смеси необходимо готовить с запасом на один образец. Полученные реакционные смеси перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

4. В подготовленные для проведения реакции секвенирования пробирки объемом 0,2 мл или лунки планшета внести согласно маркировке по необходимое количество приготовленных реакционных смесей.
5. В подготовленные пробирки (лунки планшета) с внесенными реакционными смесями, внести 5 мкл очищенной ДНК-матрицы.
6. Закрыть крышки пробирок. При использовании планшета закрыть его специальным материалом, предназначенным для этих целей (например, прозрачной адгезивной пленкой).
7. Перед постановкой в амплификатор при использовании пробирок перемешать пробы на вортексе и осадить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с); при использовании планшетов перемешать пробы на шейкере для планшетов и центрифугировать планшеты на центрифуге с ротором для планшетов при 2 тыс g в течении 5 с.

ВНИМАНИЕ! Необходимо использовать новые наконечники с фильтром и для внесения образца в пробирки с разными реакционными смесями.

<u>Протокол Б.</u> Проведение реакции циклического секвенирования.

1. Запустить программу амплификации SEQ (см. табл. 13). Поместить пробирки (планшет) в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить выполнение программы.

Таблица 13

Программа амплификации SEQ

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
0	96	Пауза	
1	96	1 мин	1
2	96	10 с	25
	50	5 с	
	60	4 мин	
3	4	хранение	

2. По окончании выполнения программы очистить получившиеся продукты реакции секвенирования от невключившихся терминаторов. Продукты реакции секвенирования до проведения стадии очистки могут

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

храниться при температуре не выше минус 16 °С в течение 3 сут.

ОЧИСТКА ОТ НЕВКЛЮЧИВШИХСЯ ТЕРМИНАТОРОВ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

(проводится в зоне Детекции – помещении для детекции продуктов амплификации)

Для проведения очистки от невключившихся терминаторов в состав набора реагентов «АмплиСенс® *HIV*-Resist-Seq» входит раствор F. Однако данный этап может быть проведен другими способами с использованием реагентов, не входящих в состав набора.

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зонах Экстракции и Амплификации.

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

<u>Протокол А.</u> Очистка продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов с использованием раствора F из «Комплекта для подготовки к секвенированию».

Объем продукта реакции секвенирования – 10 мкл.

1. В пробирки (лунки планшета) с продуктами реакции секвенирования добавить по **100 мкл раствора F**. При использовании пробирок перемешать пробы на вортексе, при использовании планшета – на шейкере для планшетов, не закрывая его адгезивной пленкой.
2. Инкубировать пробирки (планшет) **15 мин** при комнатной температуре.
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге с адаптерами для 0,2 мкл пробирок при **12 тыс g** (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение **20 мин**. При использовании планшета центрифугировать пробы на центрифуге с ротором для планшетов при **2 тыс g** в течение **30 мин**.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

4. При использовании пробирок аккуратно отобрать надосадочную жидкость, используя автоматический дозатор и отдельный наконечник с фильтром для каждой пробы. При использовании планшета перевернуть его вверх дном и резким движением сбросить надосадочную жидкость. Не переворачивая планшет, поместить его в центрифугу на бумажное полотенце или салфетку и центрифугировать планшет в таком виде при **2 тыс g** в течение **20 с.**
5. Добавить в пробирки (лунки планшета) по **150 мкл раствора F**, не перемешивая пробы.
6. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге с адаптерами для 0,2 мкл пробирок при **12 тыс g** (например, 13 400 об/мин для центрифуги MiniSpin, Eppendorf) в течение **2 мин**. При использовании планшета центрифугировать пробы на центрифуге с ротором для планшетов при **2 тыс g** в течение **2 мин**.
7. При использовании пробирок тщательно отобрать надосадочную жидкость, используя автоматический дозатор и отдельный наконечник с фильтром для каждой пробы. При использовании планшета перевернуть его вверх дном и резким движением сбросить надосадочную жидкость. Не переворачивая планшет, поместить его в центрифугу на бумажное полотенце или салфетку и центрифугировать планшет в таком виде при **2 тыс g** в течение **20 с.**
8. Высушить осадок, поместив пробирки (планшет) в амплификатор, при температуре **65 °С** в течение **2 мин** (при этом пробирки (планшет) должны быть открыты).
9. Приступить к предварительной денатурации очищенных продуктов реакции секвенирования перед их загрузкой в секвенатор. Очищенные продукты реакции секвенирования до проведения денатурации могут храниться при температуре не выше минус 16 °С в течение 1 мес.

<u>Протокол Б.</u> Предварительная денатурация очищенных продуктов реакции секвенирования с использованием раствора для денатурации из «Комплекта для подготовки к секвенированию»

1. Перед загрузкой очищенных продуктов реакции секвенирования в секвенатор необходимо провести их предварительную денатурацию, добавив в пробирки (лунки

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

планшета) по **10 мкл раствора для денатурации**. При использовании пробирок перемешать пробы на вортексе и осадить капли с крышек пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с); при использовании планшета перемешать пробы на шейкере для планшетов и центрифугировать планшет на центрифуге с ротором для планшетов при 2 тыс g в течении 5 с.

2. При использовании пробирок перенести их содержимое в 96-луночный планшет и закрыть его специальной септой и держателем. При использовании планшета закрыть его специальной септой и держателем.
3. Поместить планшет в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить выполнение программы (см. табл. 14).

Таблица 14

Цикл	Температура, °С	Время	Кол-во циклов
1	95	2 мин	1
2	4	10 мин	1

4. По окончании выполнения программы загрузить планшет в секвенатор и задать требуемые режимы секвенирования в соответствии с инструкцией производителя (Applied Biosystems, США).

АВТОМАТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРА ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

(проводится в зоне Детекции – помещении для детекции продуктов амплификации)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зонах Экстракции и Амплификации.

Для автоматической детекции нуклеотидной последовательности необходимо использовать прибор для секвенирования (см. раздел «Дополнительные материалы и оборудование») в соответствии с инструкцией к прибору. В процессе работы секвенатора проводится автоматическая детекция нуклеотидных последовательностей продуктов реакции секвенирования.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

ЭТАП 5. АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для анализа и интерпретации результатов секвенирования необходимо:

1. Собрать необходимое количество хроматограмм (6 – для генов протеазы и обратной транскриптазы, 4 – для гена интегразы и 2 – при определении тропизма), полученных для каждого образца, в единую последовательность (консенсус-последовательность).
2. Проанализировать собранную консенсус-последовательность:
   - в случае анализа генов протеазы, обратной транскриптазы и интегразы сравнить собранную консенсус-последовательность с референс-последовательностью для выявления и проверки достоверности отличий между ними в позициях, ассоциированных с возникновением мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека к противовирусным препаратам;
   - при определении тропизма сравнить собранную консенсус-последовательность с референс-последовательностью для выявления и проверки достоверности отличий между ними в области гипервариабельной петли V3;
   - определить наличие мутаций устойчивости вируса иммунодефицита человека к противовирусным препаратам (в случае анализа генов протеазы, обратной транскриптазы и интегразы).
3. Провести клиническую интерпретацию полученных результатов.

Сборку консенсус-последовательности, анализ качества нуклеотидной последовательности, ее редактирование и анализ наличия мутаций лекарственной устойчивости и тропизма ВИЧ, провести с использованием программного обеспечения «АмплиСенс® Resist» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия или «ДЕОНА» (АО «РМБит», Россия) в соответствии с руководством оператора (пользователя) используемого программного обеспечения.

Примечание – При использовании ПО «ДЕОНА» (АО «РМБит», Россия) в случае анализа гена белка оболочки

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

при определении тропизма ВИЧ, анализ собранной консенсус-последовательности осуществляется с помощью интернет ресурса www.geno2pheno.org.

Результатом проведенного анализа консенсус-последовательности является информация о наличии обнаруженных мутаций в сайтах, ассоциированных с возникновением лекарственной устойчивости ВИЧ к противовирусным препаратам в случае анализа генов протеазы, обратной транскриптазы и интегразы, либо информация о тропизме ВИЧ в случае анализа гена белка оболочки.

Общие принципы оценки достоверности (валидности) анализа, качества консенсусной последовательности, а также правила редактирования консенсусной последовательности, обозначения мутаций описаны в **«Методических рекомендациях** по анализу и интерпретации результатов исследования, проведенного с использованием 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»»**.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

Анализ и интерпретация результатов с помощью программного обеспечения «ДЕОНА» (руководство пользователя расположено на цифровом носителе вместе с ПО «ДЕОНА»)

Анализ и интерпретация результатов исследования лекарственной устойчивости ВИЧ к ингибиторам протеазы и обратной транскриптазы

1. Открыть программу «ДЕОНА».
2. Создать новый проект с профилем «Протеаза и ревертаза ВИЧ».
3. На панели инструментов нажать клавишу ***Открыть***.
4. Выделить все файлы, содержащие хроматограммы исследуемого образца (6 файлов: 2 на ген протеазы и 4 на ген обратной транскриптазы). Нажать кнопку ***Открыть***.
5. ПО «ДЕОНА» предложит сохранить созданный проект. Назвать файл в соответствии с названием исследуемого образца и используемого профиля и выбрать место для сохранения проекта.
6. Проанализировать качество полученной консенсусной последовательности (проверить истинность вырожденных нуклеотидов и нуклеотидов, отличных от референсной последовательности) и, в случае необходимости, отредактировать ее. Особое внимание следует уделить местам, где располагаются мутации, ответственные за возникновение резистентности.
7. Нажать кнопку ***Сохранить*** для сохранения внесенных изменений в исследуемые последовательности.
8. Нажать кнопку ***Анализ***. ПО «ДЕОНА» через интернет автоматически свяжется с базой Стэнфордского университета и, в случае успешного соединения, представит отчет с данными устойчивости исследуемого вируса к АРВ-препаратам различных классов, а также с данными качества исследуемой последовательности.
9. Нажать кнопку ***Данные отчета*** и внести необходимую информацию по пациенту. После окончания ввода данных нажать кнопку ***ОК***.
10. Нажать кнопку ***Сохранить как PDF*** в случае необходимости сохранения отчета и распечатать отчет, нажав кнопку ***Печатать отчет***.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

Результат анализа исследуемого образца на наличие лекарственной устойчивости к ингибиторам протеазы и обратной транскриптазы считается невалидным в случаях, если консенсусная последовательность:

- не покрывает полностью область значимых мутаций (для гена протеазы – с 10 по 93 а/к, для гена обратной транскриптазы – с 41 по 238 а/к);
- содержит разрывы в области значимых мутаций;
- содержит стоп-кодоны;
- менее чем на 80 % идентична референс-последовательности.

При получении невалидного результата требуется повторное проведение анализа данного образца, начиная с этапа экстракции РНК.

Анализ и интерпретация результатов исследования лекарственной устойчивости ВИЧ к ингибиторам интегразы

1. Открыть программу «ДЕОНА».
2. Создать новый проект с профилем «Интеграза ВИЧ».
3. На панели инструментов нажать клавишу ***Открыть***.
4. Выделить все файлы, содержащие хроматограммы исследуемого образца (4 файла). Нажать кнопку ***Открыть***.
5. ПО «ДЕОНА» предложит сохранить созданный проект. Назвать файл в соответствии с названием исследуемого образца и используемого профиля и выбрать место для сохранения проекта.
6. Проанализировать качество полученной консенсусной последовательности (проверить истинность вырожденных нуклеотидов и нуклеотидов, отличных от референсной последовательности) и, в случае необходимости, отредактировать ее. Особое внимание следует уделить местам, где располагаются мутации, ответственные за возникновение резистентности.
7. Нажать кнопку ***Сохранить*** для сохранения внесенных изменений в исследуемые последовательности.
8. Нажать кнопку ***Анализ***. ПО «ДЕОНА» через интернет автоматически свяжется с базой Стэнфордского университета и, в случае успешного соединения, представит отчет с данными устойчивости исследуемого вируса к АРВ-

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

препаратам различных классов, а также с данными качества исследуемой последовательности.

9. Нажать кнопку ***Данные отчета*** и внести необходимую информацию по пациенту. После окончания ввода данных нажать кнопку ***ОК***.
10. Нажать кнопку ***Сохранить как PDF*** в случае необходимости сохранения отчета и распечатать отчет, нажав кнопку ***Печатать отчет***.

Результат анализа исследуемого образца на наличие лекарственной устойчивости к ингибиторам интегразы считается невалидным в случаях, если консенсусная последовательность:

- не покрывает полностью область значимых мутаций (для гена интегразы - с 51 по 263 а/к);
- содержит разрывы в области значимых мутаций;
- содержит стоп-кодоны;
- менее чем на 80 % идентична референс-последовательности.

При получении невалидного результата требуется повторное проведение анализа данного образца, начиная с этапа экстракции РНК.

Анализ и интерпретация результатов исследования при определении тропизма ВИЧ

1. Создать проект в ПО «ДЕОНА».
   а) Выбрать профиль «Тропизм ВИЧ».
   б) На панели инструментов нажать клавишу ***Открыть***.
   в) Выделить два файла, содержащие хроматограммы исследуемого повтора или образца.
   г) Нажать кнопку ***Открыть***.
   д) Нажать кнопку ***ОК***.
   е) ПО «ДЕОНА» предложит сохранить созданный проект. Назвать файл в соответствии с названием исследуемого образца и используемого профиля и выбрать место для сохранения проекта.
   ж) Нажать кнопку ***Сохранить***.
2. Проанализировать качество полученной консенсусной последовательности в области петли V3 (проверить истинность вырожденных нуклеотидов и нуклеотидов, отличных от референсной последовательности) и, в случае

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

необходимости, отредактировать ее.

3. Скопировать нуклеотидную консенсусную последовательность в буфер обмена.
4. Открыть в интернете сайт www.geno2pheno.org и перейти в раздел ***geno2pheno [coreceptor].***
5. Скопировать в окно ввода нуклеотидную последовательность из буфера обмена (в окне программы пункт 3: ***Sequence containing the V3 region of gp120***).
6. Задать условия анализа в пункте 2 (***Significance Levels***), выбрав следующий вариант ***false positive rate (FPR):***
   а) ***false positive rate (1 – specificity) = 10%*** в случае если анализируется один из трех повторов клинического образца,
   б) ***faise positive rate (1 – specificity) = 20%*** в случае если для анализа используется менее трех повторов клинического образца.
7. В случае необходимости ввести в пункте 1 ***(Identifier (optional))*** идентификационный код пациента.
8. Проанализировать последовательность, нажав в пункте 5 (***Action***) кнопку ***Go***.
9. Результаты анализа находятся под пунктом 4 (***Predicted phenotype***) в столбце ***Prediction***. Возможны следующие результаты анализа:
   а) ***Only the CCR5-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) could work***. Это означает, что проанализированная последовательность принадлежит R5-тропному вирусу, поэтому итоговый результат будет ***R5-тропный вирус***.
   б) ***The CXCR4-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) should not be administered!*** Это означает, что проанализированная последовательность принадлежит не-R5-тропному вирусу (это может быть X4-тропный вирус или вирус, обладающий двойной тропностью).

ВНИМАНИЕ! Клиническая интерпретация осуществляется по следующему алгоритму:

– Для трех повторов исследуемого образца получено 6 качественных хроматограмм, по три с каждой цепи. Необходимо собрать три консенсусные

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

последовательности и провести анализ на сайте www.geno2pheno.org. Во всех трех случаях во время анализа консенсусных последовательностей необходимо выставить порог FPR равным 10 %. Если хотя бы для одной из консенсусных последовательностей будет получен результат ***The CXCR4-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) should not be administered!***, итоговый результат по данному исследуемого образцу будет ***клинический образец содержит не-R5-тропный вирус***.

- Для трех повторов исследуемого образца получено от 2 до 6 качественных хроматограмм. Необходимо собрать максимальное количество консенсусных последовательностей по двум хроматограммам и провести анализ на сайте www.geno2pheno.org. Во время сборки допускается использовать хроматограммы от разных повторов. Во время анализа консенсусных последовательностей, собранных по двум хроматограммам, необходимо выставить порог FPR, равный 20 %. Хроматограмму (если такая имеется), которая не была использована для сборки консенсусной последовательнсти для анализа не использовать. Если хотя бы для одной из консенсусных последовательностей будет получен результат ***The CXCR4-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) should not be administered!***, итоговый результат по данному исследуемого образцу будет ***клинический образец содержит не-R5-тропный вирус***.
- Для трех повторов исследуемого образца получено только одна качественная хроматограмма. В данном случае результат должен считаться ***невалидным***. В случае если анализ проводился на матрице РНК, его рекомендуется повторить на матрице ДНК.

10. Сохранить результаты анализа, нажав на кнопку ***PDF-output*** и сохранив файл на локальном диске.

Результат анализа исследуемого образца на определение тропизма ВИЧ считается невалидным в

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

случаях, если консенсусная последовательность в области V3 петли:

- не покрывает область петли полностью (выделенная область длиной от 34 до 37 а/к);
- содержит разрывы или стоп-кодоны;
- менее чем на 80 % идентична референс-последовательности.

При получении невалидного результата требуется повторное проведение анализа данного образца, начиная с этапа экстракциии нуклеиновых кислот.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

Анализ и интерпретация результатов с помощью программного обеспечения «АмплиСенс® Resist»
(руководство оператора расположено на официальном сайте изготовителя http://resist.amplisens.ru во вкладке «Помощь»)

Анализ и интерпретация результатов исследования лекарственной устойчивости ВИЧ к ингибиторам протеазы и обратной транскриптазы

1. Открыть ПО «АмплиСенс® Resist». Для этого в интернет-браузере открыть страницу http://resist.amplisens.ru.
2. Войти в личный кабинет, введя логин и пароль, либо зарегистрироваться.
3. Создать новый проект в профиле «ВИЧ: Протеаза и Ревертаза».
4. В открывшемся окне нажать ***Выбрать...*** для выбора файлов хроматограмм.
5. Выделить все файлы, содержащие хроматограммы исследуемого образца (6 файлов: 2 на ген протеазы и 4 на ген обратной транскриптазы).
6. Нажать кнопку ***Создать проект***.
7. Проанализировать качество полученной консенсусной последовательности (проверить истинность вырожденных нуклеотидов и нуклеотидов, отличных от референсной последовательности) и, в случае необходимости, отредактировать ее. Особое внимание следует уделить местам, где располагаются мутации, ответственные за возникновение резистентности.
8. Нажать кнопку ***Сформировать отчет***. ПО «АмплиСенс® Resist» представит отчет с данными устойчивости исследуемого вируса к АРВ-препаратам, а также с данными качества исследуемой последовательности.
9. Внести необходимую информацию по пациенту.
10. Нажать кнопку ***Сохранить PDF***, в случае необходимости сохранения отчета, или распечатать отчет, нажав кнопку ***Печатать отчет***.

Результат анализа исследуемого образца на наличие лекарственной устойчивости к ингибиторам протеазы и обратной транскриптазы считается невалидным в случаях, если консенсусная последовательность:

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

- не покрывает полностью область значимых мутаций (для гена протеазы – с 10 по 93 а/к, для гена обратной транскриптазы – с 41 по 238 а/к);
- содержит разрывы в области значимых мутаций;
- содержит стоп-кодоны;
- менее чем на 80 % идентична референс-последовательности.

При получении невалидного результата требуется повторное проведение анализа данного образца, начиная с этапа экстракции РНК.

Анализ и интерпретация результатов исследования лекарственной устойчивости ВИЧ к ингибиторам интегразы

1. Открыть ПО «АмплиСенс® Resist». Для этого в интернет-браузере открыть страницу http://resist.amplisens.ru.
2. Войти в личный кабинет, введя логин и пароль, либо зарегистрироваться.
3. Создать новый проект в профиле «ВИЧ: Интеграза».
4. В открывшемся окне нажать ***Выбрать...*** для выбора файлов хроматограмм.
5. Выделить все файлы, содержащие хроматограммы исследуемого образца (4 файла).
6. Нажать кнопку ***Создать проект***.
7. Проанализировать качество полученной консенсусной последовательности (проверить истинность вырожденных нуклеотидов и нуклеотидов, отличных от референсной последовательности) и, в случае необходимости, отредактировать ее. Особое внимание следует уделить местам, где располагаются мутации, ответственные за возникновение резистентности.
8. Нажать кнопку ***Сформировать отчет***. ПО «АмплиСенс® Resist» представит отчет с данными устойчивости исследуемого вируса к АРВ-препаратам, а также с данными качества исследуемой последовательности.
9. Внести необходимую информацию по пациенту.
10. Нажать кнопку ***Сохранить PDF*** в случае необходимости сохранения отчета или распечатать отчет, нажав кнопку ***Печатать отчет.***

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

Результат анализа исследуемого образца на наличие лекарственной устойчивости к ингибиторам интегразы считается невалидным в случаях, если консенсусная последовательность:

- не покрывает полностью область значимых мутаций (для гена интегразы - с 51 по 263 а/к);
- содержит разрывы в области значимых мутаций;
- содержит стоп-кодоны;
- менее чем на 80 % идентична референс-последовательности.

При получении невалидного результата требуется повторное проведение анализа данного образца, начиная с этапа экстракции РНК.

Анализ и интерпретация результатов исследования при определении тропизма ВИЧ

1. Открыть ПО «АмплиСенс® Resist». Для этого в интернет-браузере открыть страницу http://resist.amplisens.ru.
2. Войти в личный кабинет, введя логин и пароль, либо зарегистрироваться.
3. Создать новый проект в профиле «ВИЧ: Тропизм».
4. В открывшемся окне нажать ***Выбрать...*** для выбора файлов хроматограмм.
5. Выделить все файлы, содержащие хроматограммы одного повтора исследуемого образца (2 файла).
6. Нажать кнопку ***Создать проект***.
7. Проанализировать качество полученной консенсусной последовательности в области петли V3 (проверить истинность вырожденных нуклеотидов и нуклеотидов, отличных от референсной последовательности) и, в случае необходимости, отредактировать ее.
8. Нажать кнопку ***Сформировать отчет***.
9. ПО «АмплиСенс® Resist» представит отчет с данными о тропизме исследуемого вируса, а также с данными качества исследуемой последовательности для данного повтора.

ВНИМАНИЕ! Клиническая интерпретация осуществляется по следующему алгоритму:

- Для трех повторов исследуемого образца получено 6 качественных хроматограмм, по три с каждой цепи.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

Необходимо провести анализ и сформировать отчет для каждого повтора в отдельности. После формирования отчета для третьего повтора перейти в ***Отчет по нескольким повторам***. В отчете внести значения FPR, полученные при анализе каждого повтора. ПО «АмплиСенс® Resist» определит итоговый результат и отобразит в отчете.

- Для трех повторов исследуемого образца получено от 2 до 6 качественных хроматограмм. Необходимо провести анализ и сформировать отчет для каждого повтора в отдельности. После формирования отчета для третьего повтора перейти в ***Отчет по нескольким повторам***. В отчете внести значения FPR, полученные при анализе каждого повтора. Если результат анализа какого-либо повтора невалидный, значение FPR для него в таблицу не вносят. ПО «АмплиСенс® Resist» определит итоговый результат и отобразит в отчете.
- Для трех повторов исследуемого образца получено только одна качественная хроматограмма. В данном случае результат должен считаться ***невалидным***. В случае если анализ проводился на матрице РНК, его рекомендуется повторить на матрице ДНК.

11. Сохранить отчет с результатами анализа, нажав на кнопку ***Сохранить PDF*** и сохранив файл на локальном диске.

Результат анализа исследуемого образца на определение тропизма ВИЧ считается невалидным в случаях, если консенсусная последовательность в области V3 петли:

- не покрывает область петли полностью (выделенная область длиной от 34 до 37 а/к);
- содержит разрывы или стоп-кодоны;
- менее чем на 80 % идентична референс-последовательности.

При получении невалидного результата требуется повторное проведение анализа данного образца, начиная с этапа экстракции нуклеиновых кислот.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

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.

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 при 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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Изготовитель 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 направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, e-mail: obtk@pcr.ru[5].

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 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
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора — Е.Н. Родионова

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского — К.Э. Соболев

[5] 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
72967
12.10.2021

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Экстракция РНК из плазмы крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-золь-Е»

Объем исследуемого материала для экстракции РНК – 0,2 мл или 1,0 мл.

В случае необходимости предварительное ультрацентрифугирование 1,0 мл плазмы должно проводиться в течение 1 ч при скорости центрифуги не менее 24000 g при температуре от 2 до 8 °С с использованием пробирок на 1,5 мл. Сразу после окончания ультрацентрифугирования необходимо удалить 800 мкл надосадочной жидкости и работать с осадком (200 мкл) как описано ниже.

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

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

Порядок работы:

1. 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, периодически перемешивая на вортексе. После полного растворения осадить содержимое пробирки **калибратор *HIV*-Q** на центрифуге/вортексе в течение 3-5 с для сброса капель с крышки.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 1,5 мл (включая отрицательный (ОК) и положительные контроли экстракции – высококонцентрированный положительный контроль (ВПК) и низкоконцентрированный положительный контроль (НКП). Промаркировать пробирки.
3. В пробирки внести по **400 мкл раствора D**.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

4. В пробирки внести по **200 мкл исследуемых образцов**, используя наконечники с фильтром. Закрыть крышки и перемешать на вортексе. Осадить на центрифуге для сброса капель жидкости с крышки.
5. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли** (ВПК, НПК). Для этого в пробирку с раствором D, подписанную ВПК, добавить **200 мкл растворенного калибратора *HIV*-Q.** В пробирку с раствором D, подписанную НПК, добавить **10 мкл растворенного калибратора *HIV*-Q и 190 мкл ОКО.** Содержимое пробирок ВПК и НПК перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки кратким центрифугированием.
6. Для каждой панели необходимо поставить **отрицательный контроль (ОК)**. Для этого в пробирку с раствором D, подписанную ОК, добавить **200 мкл ОКО**, перемешать на вортексе и осадить капли жидкости с крышки кратким центрифугированием.

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

7. Добавить к образцам, лизированным в растворе D, по **40 мкл раствора E**. Перемешать на вортексе. Центрифугировать для удаления капель с крышки пробирки.
8. Добавить в пробирки по **400 мкл раствора A**, перемешать на вортексе. Центрифугировать для удаления капель с крышки пробирки.
9. Добавить в пробирки по **130 мкл раствора B**. Перемешать на вортексе не менее 15-20 с, пока раствор не станет равномерно молочно-белым.
10. Поставить пробирки в морозильную камеру с температурой не выше минус 16 °С на 10 мин.
11. Центрифугировать пробирки 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, содержащую белки и ДНК, и верхнюю – водную, содержащую РНК.
12. Во время центрифугирования образцов отобрать новые пробирки объемом 1,5 мл в количестве, соответствующем количеству обрабатываемых образцов, включая контроли.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

Внести в каждую пробирку по **500 мкл раствора С, 10 мкл тРНК 1 мкг/мкл** (препарата нагрузочной РНК) и по **10 мкл гликогена 1%**.

13. Из пробирок с клиническими и контрольными образцами после центрифугирования аккуратно отобрать верхнюю фазу (приблизительно 500-550 мкл), используя наконечники с фильтром, и перенести в пробирки, содержащие **раствор С, тРНК 1 мкг/мкл и гликоген 1%**.
14. Перемешать на вортексе, центрифугировать для удаления капель с крышки пробирки и поставить в морозильную камеру с температурой не выше минус 16 °С на 20 мин.
15. Центрифугировать пробирки 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 отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Если осадок не виден, отобрать надосадочную жидкость, не касаясь стенок, оставив на дне пробирки примерно 20 мкл.
16. Осадок ресуспендировать в **800 мкл холодного раствора для отмывки 3**. Перемешать на вортексе, центрифугировать 10 мин при 10–16 тыс g. Отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадка.
17. Подсушить осадок в термостате для микропробирок при температуре 56 °С в течение 5-7 мин. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
18. Растворить осадок в **50 мкл РНК-буфера** (в случае одновременного анализа образца на наличие мутаций устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам, расположенных в генах протеазы, обратной транскриптазы, интегразы, а также определения тропизма ВИЧ необходимо увеличить объем элюции до 70 мкл), прогреть при температуре 56 °С в течение 5 мин. Надосадочная жидкость содержит очищенную РНК. Пробы готовы к постановке реакции обратной транскрипции и ПЦР.

Раствор РНК можно хранить при температуре не выше минус 68 °С в течение года.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

А1. Экстракция ДНК из цельной крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Объем клинического материала для экстракции ДНК – 0,25 мл.

Порядок работы

Подготовка клинического материала при экстракции ДНК из цельной крови.

1. **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Центрифугировать первичную пробирку с кровью при 800-1600 g в течение 20 мин.
3. Отобрать необходимое количество пробирок на 1,5 мл с завинчивающейся крышкой (включая контроли) и промаркировать. В пробирки, предназначенные для клинических проб, внести отдельными наконечниками по **1,0 мл гемолитика** и по **0,25 мл** лейкоцитарного кольца (находится на разделе двух фаз – плазмы и клеточной фракции крови) соответственно маркировке. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе.
4. Оставить пробирки при комнатной температуре на 5 мин, затем еще раз аккуратно перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на 5 мин.
5. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге при 8 тыс g в течение 2 мин. Надосадочную жидкость отобрать с помощью вакуумного отсасывателя, не задевая осадка.

Полученный осадок лейкоцитов следует немедленно лизировать или заморозить при температуре не выше минус 16 °С и хранить 2 нед, а при температуре не выше минус 68 °С – длительное время.

Примечание – Полученный осадок лейкоцитов может быть транспортирован при температуре не выше минус 16 °С в другую лабораторию для продолжения процедуры анализа.

Лизис клинического материала

1. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (высококонцентрированный ПК (ВПК), низкоконцентрированный ПК (НПК))**. Для этого в

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

пробирку, подписанную ВПК, добавить **50 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1** и **50 мкл ОКО.** В пробирку, подписанную НПК, добавить **5 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1** и **95 мкл ОКО.**

2. Для каждой панели необходимо поставить отрицательный контроль (ОК). Для этого в пробирку, подписанную ОКО, добавить **100 мкл ОКО**.
3. Добавить в пробирки с лейкоцитами и в пробирки с контрольными образцами по **300 мкл раствора для лизиса**.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и прогреть в термостате при температуре **65 °С** в течение **5 мин**.
5. Сбросить капли жидкости с крышки кратким центрифугированием и добавить в пробирки по **400 мкл раствора для преципитации**. Перемешать на вортексе.
6. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге при **12 тыс g** в течение **5 мин**.
7. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок. Для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
9. Процентрифугировать при **12 тыс g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
10. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
11. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
12. Процентрифугировать при **12 тыс g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
13. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
14. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С** на

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

5 мин для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).

15. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
16. Процентрифугировать пробирки при **12 тыс g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

Примечание – Очищенная ДНК может быть транспортирована при температуре не выше минус 16 °С в другую лабораторию для продолжения процедуры анализа.

А2. Экстракция ДНК из сухих пятен крови при использовании комплекта реагентов «РИБО-преп»

Объем клинического материала для экстракции РНК/ДНК – 1 сухое пятно крови.

Примечание – **Раствор для лизиса** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

1. Отобрать необходимое количество пробирки на 1,5 мл (включая контроли) и промаркировать их.
2. Отобрать необходимое количество заранее простерилизованных компостеров (с диаметром 6 мм).
3. Используя для каждого образца отдельный компостер выбить в соответствующие пробирки круги с сухими пятнами крови. Для получения достаточного количества материала компостером необходимо вырезать одно целое пятно крови, последовательно совершая 4-5 вырезаний.
4. Для каждой панели необходимо поставить **положительные контроли (высококонцентрированный ПК (ВПК), низкоконцентрированный ПК (НПК))**. Для этого в пробирку, подписанную ВПК, добавить **50 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1** и **50 мкл ОКО.** В пробирку, подписанную НПК, добавить **5 мкл ПКО ДНК ВИЧ-1** и **95 мкл ОКО.**
5. Для каждой панели необходимо поставить отрицательный контроль (ОК). Для этого в пробирку, подписанную ОК,

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

добавить **100 мкл ОКО**.

6. В пробирки, содержащие бумагу с сухими пятнами крови, и с контрольными образцами добавить по **700 мкл раствора для лизиса**. Закрыть пробирки и аккуратно перемешать содержимое пробирки на вортексе.
7. Переставить пробирки в термостат и прогреть при **65 °С** в течение **30 мин**. Во время инкубации пробирки необходимо встряхивать на вортексе каждые 8-10 мин.
8. Во время инкубации необходимо приготовить и промаркировать необходимое количество новых пробирок на 1,5 мл для клинических образцов.
9. Вынуть из термостата пробирки и процентрифугировать их на микроцентрифуге при **10 тыс g** в течение **1 мин.**
10. Для клинических образцов перенести надосадочную жидкость в соответствующие промаркированные новые пробирки.

ВНИМАНИЕ! Необходимо перенести максимальное количество жидкости. Для этого во время отбора жидкости наконечником необходимо отжимать бумагу, находящуюся в осадке. Допустимо попадание небольшого количества бумаги вместе с отобранной жидкостью в новые пробирки.

11. Добавить в пробирки по **600 мкл раствора для преципитации**, перемешать на вортексе.
12. Процентрифугировать пробирки на микроцентрифуге при **12 тыс g** в течение **5 мин.**
13. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость, не задевая осадок, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
14. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз. Можно провести процедуру одновременно для всех пробирок, для этого необходимо накрыть пробирки в штативе сверху крышкой или другим штативом, прижать их и переворачивать штатив.
15. Процентрифугировать при **12 тыс g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
16. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

17. Добавить в пробирки по **200 мкл раствора для отмывки 4**, плотно закрыть крышки и осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3-5 раз.
18. Процентрифугировать при **12 тыс g** в течение **1-2 мин** на микроцентрифуге.
19. Осторожно, не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
20. Поместить пробирки в термостат при температуре **65 °С на 5 мин** для подсушивания осадка (при этом крышки пробирок должны быть открыты).
21. Добавить в пробирки по **50 мкл РНК-буфера**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре **65 °С на 5 мин**, периодически встряхивая на вортексе.
22. Процентрифугировать пробирки при **12 тыс g** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Электрофоретическая детекция продуктов амплификации в агарозном геле с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200

(проводится в зоне Детекции – помещении для детекции продуктов ПЦР)

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в зонах Экстракции и Амплификации.

Приготовление рабочих растворов и агарозного геля

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 – канцерогенное соединение, 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 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.

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

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 двигаться к положительному). Залить в камеру для горизонтального электрофореза готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Порядок работы

1. Смеси образцов с **буфером для нанесения образцов** внести в соответствующие лунки геля, используя **новый** наконечник для каждой пробы. Избегать перетекания образцов в соседние лунки.
2. 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.
3. По завершении времени электрофореза (краситель ксиленцианол при этом пройдет примерно половину длины геля (~ 1,5 см)) выключить источник тока и перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. 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!

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
72967
12.10.2021

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU
12.10.2021

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 81
восемьдесят один лист

Руководитель подразделения развития и качества продукции ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 93/21 от 17.04.2021 г.)

Е.А. Козлова

«02» 09 2021 г.

М.П.

Всего пронумеровано, прошнуровано и скреплено печатью 81 листа(ов)
Директор ГБУЗ МО МОНИКИ им.М.Ф.Владимирского
Соболев К.Э.

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

72967
12.10.2021