

«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

«24» апреля 2021 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

набора реагентов

для диагностики in vitro

АмплиСенс® HBV-Resist-Seq

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	6
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	7
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	12
СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ	14
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	14
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	19
СОСТАВ	20
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	22
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	22
А. Подготовка пробирок для амплификации	22
Б. Проведение амплификации	24
ОЧИСТКА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	25
Очистка продуктов амплификации при использовании комплекта реагентов «АмплиСенс® Ампли-сорб»	25
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ И ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ ОЧИЩЕННЫХ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКЕРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ИЗ «КОМПЛЕКТА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К СЕКВЕНИРОВАНИЮ»	27
А. Электрофоретическая детекция	27
Б. Учет результатов	28
В. Оценка концентрации ДНК в исследуемых образцах	30
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ЦИКЛИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ	32
А. Подготовка пробирок для проведения реакции секвенирования	33
Б. Проведение реакции секвенирования	36
ОЧИСТКА ОТ НЕВКЛЮЧИВШИХСЯ ТЕРМИНАТОРОВ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ	36
А. Очистка продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов с использованием раствора F из «Комплекта для подготовки к секвенированию HBV / Res»	37
Б. Предварительная денатурация очищенных продуктов реакции секвенирования с использованием раствора для денатурации из «Комплекта для подготовки к секвенированию HBV / Res»	38
АВТОМАТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРА ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ	39
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	39
Анализ и интерпретация результатов с помощью программного обеспечения «АмплиСенс® Resist-HBV»	42
Анализ и интерпретация результатов с помощью программного обеспечения «ДЕОНА»	43
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	45
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ	46
ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	47
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	48

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

а/к	- аминокислота
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплиментарная ДНК, полученная в ходе реакции обратной транскрипции
К-	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
МЕ	- международные единицы
МУ	- методические указания
ОКО	- отрицательный контрольный образец
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПВП	- противовирусные препараты
ПВТ	- противовирусная терапия
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
п.н.	- пара нуклеотидов
ПО	- программное обеспечение
РУ	- регистрационное удостоверение
СанПиН	- санитарные правила и нормы
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
ХГВ	- хронический гепатит В
HBV	- hepatitis B virus (вирус гепатита В)
RT	- ревертазный домен полимеразы вируса гепатита В

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® **HBV-Resist-Seq**, далее – набор реагентов, предназначен для выявления мутаций устойчивости в ревертазном (RT) домене Р-гена вируса гепатита В (HBV) к противовирусным препаратам из группы аналогов нуклеозидов/нуклеотидов в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации.

Набор реагентов предназначен для работы с ранее экстрагированной из плазмы крови ДНК HBV, имеющей концентрацию не менее 150 МЕ/мл.

Один набор рассчитан на тестирование 50 биологических образцов. Минимальное рекомендованное количество биологических образцов в каждой постановке – 5.

ВНИМАНИЕ! Набор реагентов АмплиСенс® **HBV-Resist-Seq** предназначен для проведения исследования с использованием прибора для определения нуклеотидной последовательности

методом прямого секвенирования (секвенатора).

Исследование с использованием данного набора реагентов рекомендуется для больных хроническим гепатитом В (ХГВ) в определенных случаях перед началом противовирусной терапии (ПВТ) препаратами из группы аналогов нуклеозидов/нуклеотидов и во время приема данных противовирусных препаратов (см. табл. 1).

Таблица 1

Показания к проведению исследования на наличие мутаций устойчивости *HBV* к противовирусным препаратам¹

Срок	Показания
Перед началом ПВТ	Предыдущее лечение аналогами нуклеозидов/нуклеотидов было неэффективным ²
Во время проведения ПВТ	Выявлено наличие первичной резистентности ³
	Наблюдается вирусологический рецидив ⁴

Информация о наличии мутаций лекарственной устойчивости в геноме *HBV* необходима для выбора оптимальной тактики лечения и своевременной коррекции схемы лечения при ХГВ.

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

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение мутаций устойчивости вируса гепатита В (*HBV*) к противовирусным препаратам с помощью набора реагентов **АмплиСенс® *HBV*-Resist-Seq** включает в себя следующие стадии:

1. Амплификация фрагмента ревертазного (RT) домена Р-гена

¹ EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J. Hepatol 2012; 57: 167–185. Pawlotsky J.M. et al., Gastroenterology, 2008, 134:405–415

² Pawlotsky J.M. et al., Gastroenterology, 2008, 134:405–415

³ Снижение концентрации ДНК *HBV* менее чем на 1 lg от начального уровня на 12-ой неделе ПВТ (EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J. Hepatol 2012; 57: 167–185).

⁴ Подтвержденное возрастание концентрации ДНК *HBV* более чем на 1 lg от минимального уровня, достигнутого в процессе ПВТ (EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. J. Hepatol 2012; 57: 167–185).

HBV размером 970 п.н. с помощью «ПЦР-комплекта». Для амплификации используется ранее экстрагированная ДНК *HBV*. Если для тестирования с помощью набора реагентов АмплиСенс *HBV-Resist-Seq* не хватает объема ранее экстрагированной ДНК, необходимо провести повторную экстракцию ДНК из плазмы крови.

2. Подготовка и проведение секвенирования, включает следующие стадии:

- а) проведение очистки продуктов амплификации от невключившихся нуклеотидов и праймеров с помощью комплекта реагентов «АмплиСенс® Ампли-сорб».
- б) электрофоретическая детекция очищенных продуктов амплификации в агарозном геле с помощью комплекта реагентов «ЭФ».
- в) оценка концентрации очищенных продуктов амплификации.

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;
- электрофоретически – 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, предназначенный для визуальной оценки количества очищенных продуктов амплификации, входит в «Комплект для подготовки к секвенированию *HBV / Res*» из набора реагентов АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq*.

г) проведение реакции циклического секвенирования.

Необходимо использовать праймеры для секвенирования ревертазного (RT) домена Р-гена *HBV* из «Комплекта для подготовки к секвенированию *HBV / Res*», входящего в набор реагентов АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq*, и комплект реагентов для секвенирования с флуоресцентно-меченными

терминаторами. **«Комплект для секвенирования»**, содержащий флуоресцентно-меченные терминаторы и предназначенный для проведения реакции секвенирования, входит в состав **формы комплектации 1** набора реагентов **АмплиСенс® HBV-Resist-Seq**.

- д) очистка продуктов реакции секвенирования от не включившихся терминаторов с помощью **Раствора F**, входящего в **«Комплект для подготовки к секвенированию HBV / Res»**.
 - е) проведение предварительной денатурации очищенных продуктов реакции секвенирования перед их загрузкой в прибор для секвенирования (секвенатор) с помощью **раствора для денатурации**, входящего в **«Комплект для подготовки к секвенированию HBV / Res»**.
 - ж) автоматическая детекция нуклеотидной последовательности с помощью секвенатора (например, с помощью прибора фирмы Applied Biosystems, США).
3. Анализ и интерпретация результатов:
- а) сборка секвенированных нуклеотидных последовательностей в консенсус-последовательность и анализ собранной консенсус-последовательности с помощью специального программного обеспечения, позволяющего выявить мутации устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам;
 - б) клиническая интерпретация полученных результатов с помощью специального программного обеспечения, входящего в состав набора реагентов **АмплиСенс® HBV-Resist-Seq**.

ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100, «АмплиСенс® Ампли-сорб» вариант 50, «ЭФ» вариант 200, «Комплект для подготовки к секвенированию HBV / Res», «Комплект для секвенирования» (2 шт.), программное обеспечение «АмплиСенс® Resist-HBV» версия 1, дата выпуска 20.08.2020 на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014.

Форма 2 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100, «АмплиСенс® Ампли-сорб» вариант 50, «ЭФ»

вариант 200, «Комплект для подготовки к секвенированию *HBV* / Res», программное обеспечение «АмплиСенс® Resist-*HBV*» версия 1, дата выпуска 20.08.2020 на сайте Изготовителя или программное обеспечение «ДЕОНА» версия 1.2.3, дата выпуска 28.04.2014.

ВНИМАНИЕ! Набор реагентов предназначен для работы с ранее экстрагированной ДНК *HBV*. Если для проведения тестирования с помощью набора реагентов АмплиСенс® *HBV*-Resist-Seq не хватает объема ранее экстрагированной ДНК, то необходимо провести повторную экстракцию ДНК. Для получения ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для экстракции РНК/ДНК «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147).

Форма комплектации 1 предназначена для проведения амплификации ДНК, очистки продуктов амплификации, электрофоретической детекции и оценки концентрации очищенных продуктов амплификации в агарозном геле, постановки реакции секвенирования, очистки продуктов реакции секвенирования и предварительной денатурации продуктов реакции секвенирования.

Форма комплектации 2 предназначена для проведения амплификации ДНК, очистки продуктов амплификации, электрофоретической детекции и оценки концентрации очищенных продуктов амплификации в агарозном геле, очистки продуктов реакции секвенирования, предварительной денатурации продуктов реакции секвенирования, а также содержит праймеры для секвенирования ревертазного (RT) домена Р-гена *HBV*. Для проведения реакции секвенирования необходимо дополнительно использовать комплект реагентов для секвенирования с флуоресцентно-мечеными терминаторами, рекомендованный производителем используемого секвенатора.

ВНИМАНИЕ! ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора не дает рекомендаций по использованию коммерческих продуктов, которые следует использовать в соответствии с инструкциями производителя.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Для данного набора реагентов применимы следующие характеристики:

Аналитическая чувствительность

Таблица 2

Вид исследуемого материала	Объём образца для экстракции, мкл	Комплект для экстракции ДНК	Аналитическая чувствительность, МЕ/мл
Плазма крови	100	«РИБО-преп»	150

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

Аналитическая специфичность

Оценка аналитической специфичности набора реагентов проведена посредством добавления в реакцию амплификации геномной ДНК/кДНК следующих вирусов: *HAV* (вирус гепатита А), *HCV* (вирус гепатита С), *HDV* (вирус гепатита D), *HEV* (вирус гепатита E), *HGV* (вирус гепатита G), *TTV* (ТТ вирус), *HIV* (вирус иммунодефицита человека), *EBV* (вирус Эпштейн-Барра), *CMV* (цитомегаловирус), *HSV1*, *HSV2* (вирус простого герпеса 1 и 2 типов), *HHV6* и *HHV8* (вирус герпеса 6 и 8 типов), а также геномной ДНК человека.

При проведении тестирования образцов ДНК/кДНК вышеперечисленных вирусов и ДНК человека неспецифических реакций выявлено не было.

Воспроизводимость и повторяемость (по результатам клинических и технических испытаний)

Для определения воспроизводимости были проведены:

- 3 независимые экстракции из разведений стандартного образца предприятия содержания вируса гепатита В в концентрации 150 МЕ/мл (каждый выделенный образец тестировался в трех повторах в ПЦР) (на этапе технических испытаний),
- 5 независимых экстракций из 5 образцов панели HBVDR12 (QCMD, Великобритания) (на этапе клинических испытаний),
- 3 независимые экстракции из 11 биологических образцов, полученных от пациентов с ХГВ (на этапе клинических испытаний).

Все экстрагированные образцы ДНК проходили этап амплификации и секвенирования. Данные по оценке

воспроизводимости приведены в табл. 3.

Таблица 3

Воспроизводимость

Исследуемые образцы	Количество повторов	Частота выявления		
		% выявленных образцов	95 % доверительный интервал	
			Нижняя граница, %	Верхняя граница, %
Разведение стандартного образца предприятия с концентрацией 150 МЕ/мл	9	100 (9/9)	66,4	100
Образцы панели HBVDR12 (клинические испытания)	25	100 (25/25)	86,3	100
Биологические образцы	33	100 (33/33)	89,4	100
Общее	67	100 (67/67)	94,6	100

Для определения повторяемости были проведены:

- экстракция ДНК из 44 биологических образцов, полученных от пациентов с ХГВ (на этапе ПЦР каждый образец исследовался в двух повторах).
- экстракция ДНК из 5 образцов панели HBVDR12 (QCMD, Великобритания) (каждый образец исследовался в трех повторах).

Все экстрагированные образцы ДНК проходили этап амплификации и секвенирования. Данные по оценке повторяемости приведены в табл. 4.

Таблица 4

Повторяемость

Исследуемые образцы	Количество повторов	Частота выявления		
		% выявленных образцов	95 % доверительный интервал	
			Нижняя граница, %	Верхняя граница, %
Биологические образцы	88	100 (88/88)	95,9	100
Образцы панели HBVDR12	15	100 (15/15)	78,2	100
Общее	103	100 (103/103)	96,5	100

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Таблица 5

Результаты применения набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® HBV-Resist-Seq и методов (препаратов) сравнения

Вид исследуемого материала	Результаты применения «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq»		Результаты применения методов (препаратов) сравнения ⁵	
			Положительных ⁶	Отрицательных ⁷
Плазма крови	Всего исследовано 160 образцов	положительных ⁶	22	0
		отрицательных ⁷	0	138

Были использованы 160 образцов плазмы крови от пациентов с ХГВ, находящихся на разных стадиях ПВТ: 1) до начала ПВТ (с опытом предыдущего неэффективного лечения ХГВ аналогами нуклеотидов/нуклеозидов) (128 образцов); 2) после 12 недели ПВТ при выявлении первичной резистентности (26 образцов); 3) при выявлении вирусологического рецидива (6 образцов). Среди пациентов, принимающих ПВП, 3 получали тенофовир и 29 – энтекавир, причем 12 из них ранее лечились ламивудином. Среди 128 пациентов, не находящихся на терапии, 99 ранее принимали ламивудин, 24 – телбивудин, 4 – энтекавир, 1 – адефовир.

Мутантные варианты, выявленные в 22 образцах с помощью набора реагентов АмплиСенс® HBV-Resist-Seq, имели 100 % совпадений с мутантными вариантами, выявленными для этих образцов методами (препаратами) сравнения (см. табл. 6).

⁵ Вследствие отсутствия аналогичных наборов реагентов в качестве методов (препаратов) сравнения применялись: 1) секвенирование, с использованием альтернативных реагентов, фрагмента ревертазного домена Р-гена *HBV* размером 1030 п.н., полученного с помощью альтернативных реагентов для проведения ПЦР и альтернативных праймеров, приведенных в одном из основополагающих исследований, посвященных изучению мутаций устойчивости, - D. J. Tenney et al. Clinical Emergence of Entecavir-Resistant Hepatitis B Virus Requires Additional Substitutions in Virus Already Resistant to Lamivudine// Antimicrob. Agents and Chemotherapy. – 2004. - Vol. 48. - P. 3498–3507; 2) альтернативные комплекты реагентов для очистки продуктов амплификации, электрофоретической детекции и оценки концентрации ДНК; 3) программное обеспечение Geneious версии 6.1 (Biomatters Limited, Новая Зеландия, <http://www.geneious.com/>) для сборки полученных секвенированных последовательностей в консенсус-последовательность; 4) интернет-ресурс HBVseq, (<http://hivdb.stanford.edu/HBV/HBVseq/development/HBVseq.html>) для анализа собранной консенсус-последовательности с целью выявления мутаций лекарственной устойчивости.

⁶ Образцы, в которых были выявлены мутации, ассоциированные с возникновением лекарственной устойчивости *HBV*.

⁷ Образцы, в которых не были выявлены мутации, ассоциированные с возникновением лекарственной устойчивости *HBV*.

Таблица 6

**Результаты исследования 22 образцов,
содержащих мутантные варианты**

Выявленный спектр мутаций в RT-домене Р-гена <i>HBV</i>	Количество образцов, содержащих определенный спектр мутаций	
	Методы (препараты) сравнения	АмплиСенс® <i>HBV-Resist-Seq</i>
L80V	1	1
I169T	1	1
A181S	1	1
M204V	1	1
M204I	2	2
L80I+M204I	2	2
L80V+M204I	2	2
L80I+L180M+M204I	2	2
V173L+L180M+M204V	2	2
L180M+T184S+M204V	1	1
L180M+S202G+M204V	2	2
L80I+V173L+L180M+M204I	1	1
L180M+T184I/L+S202G+M204V	3	3
I169T+V173L+L180M+M204V+M250V	1	1

Таблица 7

**Диагностические характеристики набора реагентов для
диагностики in vitro АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq***

Вид исследуемого материала	Диагностическая чувствительность ⁸ (с доверительной вероятностью 90%), (%)	Диагностическая специфичность ⁹ (с доверительной вероятностью 90%), (%)
Плазма крови	89,5 - 100	98 - 100

Апробация набора реагентов АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq* была проведена в рамках международной программы QCMD-2012 (Quality Control for Molecular Diagnostics) по выявлению мутаций устойчивости *HBV* к противовирусным препаратам (Hepatitis B Virus Drug Resistance Typing. 2012 EQA Pilot Study). Результаты тестирования приведены в табл. 8. Набор реагентов АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq* показал 100 % совпадений с заявленными характеристиками образцов панели HBVDR12 (QCMD, Великобритания).

⁸ Относительная чувствительность в сопоставлении с использованными методами (препаратами) сравнения.

⁹ Относительная специфичность в сопоставлении с использованными методами (препаратами) сравнения.

Результаты тестирования образцов панели HBV12DR (QCMD)

Позиция кодона в RT-домене Р-гена <i>HBV</i> ¹⁰	Наименование образца в панели									
	HBVDR12-01	HBVDR12-02	HBVDR12-03	HBVDR12-04	HBVDR12-05					
	Результаты тестирования (нуклеотидная последовательность ¹¹)									
	QCMD	АмплиСенс	QCMD	АмплиСенс	QCMD	АмплиСенс	QCMD	АмплиСенс	QCMD	АмплиСенс
RT_80	CTA	CTA	ATA ¹²	ATA	TTA	TTA	CTA	CTA	TTA	TTA
RT_173	GTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTG
RT_180	CTG	CTG	MTG	MTG	CTG	CTG	ATG	ATG	CTG	CTG
RT_181	GCT	GCT	GCT	GCT	GTT	GTT	GBT	GBT	GCT	GCT
RT_184	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT	ACT
RT_194	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT
RT_202	AGT	AGT	AGT	AGT	AGT	AGT	AGT	AGT	AGT	AGT
RT_204	ATG	ATG	RTK	RTK	ATG	ATG	GTG	GTG	ATG	ATG
RT_236	AAT	AAT	AAC	AAC	AMC	AMC	AAT	AAT	AAC	AAC
RT_250	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG	ATG

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением 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 МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации

¹⁰ Приведены данные по позициям, представленным в отчете «Hepatitis B Virus Drug Resistance Typing. 2012 EQA Pilot Study Final Report» (QCMD, Великобритания).

¹¹ Используется обозначение полиморфных позиций в соответствии с кодом IUPAC.

¹² Жирным шрифтом выделены мутации, приводящие к возникновению лекарственной устойчивости *HBV*.

нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения ПЦР-исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).

Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Температура в помещении лаборатории от 20 до 28 °С, относительная влажность от 15 до 75%.
- Допускать к работе с набором реагентов только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке.

ВНИМАНИЕ! Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается перемещение персонала из помещения для секвенирования в другие рабочие помещения лаборатории. Смена рабочей верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для секвенирования.

- Не использовать набор реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать набор реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать набор реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать вдыхания паров, контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. Вреден при проглатывании. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

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

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

При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

Сведения о безопасности набора реагентов и Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ

Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковку¹³, биологический материал, а также материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять 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 (профилактических) мероприятий».

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

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции ДНК/РНК – «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).

¹³ Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, использованные реагенты, упаковка относятся к классу опасности медицинских отходов Г.

2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК/РНК.

Проведение реакции амплификации

3. Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 или 0,5 мл (в соответствии с моделью используемого амплификатора) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
5. Штативы для наконечников и пробирок объемом 0,2 (0,5) мл (в зависимости от типа используемых пробирок) (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
6. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
7. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
8. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
9. Программируемый амплификатор / термостат программируемый для проведения ПЦР (например, «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), MaxuGene Gradient (Axugen Scientific Inc., («Эксиджен Саентифик, Инк»), США) и другие рекомендованные Производителем).
10. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
11. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
12. Емкость для сброса наконечников.

Очистка продуктов амплификации (при использовании комплекта реагентов «АмплиСенс® Ампли-сорб»)

13. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc., («Эксиджен, Инк»), США).
14. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

15. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
16. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и наконечников (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
17. Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).
18. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, Eppendorf Manufacturing Corporation, («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия).
19. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
20. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C (например, SIA BioSan, Латвия, или аналогичный).
21. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия).
22. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
23. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °C.
24. Отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
25. Емкость для сброса наконечников.

Электрофоретическая детекция и оценка концентрации очищенных продуктов амплификации в агарозном геле

26. Дополнительные материалы и оборудование для электрофоретической детекции – согласно инструкции к комплекту реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле.
27. Одноразовые нестрипованные пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (например, Axugen, Inc., («Эксиджен, Инк»), США).
28. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
29. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
30. Емкость для сброса наконечников.

В случае определения концентрации спектрофотометрически:

31. Спектрофотометр ультрафиолетовой и видимой области

спектра (например, Eppendorf BioSpectrometer (Eppendorf AG, («Эппендорф АГ»), Германия).

Проведение реакции секвенирования, очистка, предварительная денатурация продуктов реакции секвенирования и автоматическая детекция нуклеотидной последовательности

32.Комплект реагентов для проведения реакции секвенирования с флуоресцентно-мечеными терминаторами, рекомендованный производителем используемого секвенатора, – при использовании формы комплектации 2.

33.Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 0,5 мл (например, Axugen, Inc., («Эксиджен, Инк»), США)

34.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

35.Штативы для пробирок объемом 0,5 мл и наконечников (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

36.Бокс абактериальной воздушной среды (ПЦР-бокс) (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С.», ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

37.Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).

38.Амплификатор, адаптированный под пробирки 0,2 мл и 96-луночные планшеты (например, MaxyGene Gradient (Axugen, Scientific Inc. («Эксиджен Саентифик, Инк»), США).

39.Прибор для определения нуклеотидной последовательности методом прямого секвенирования (секвенатор), с принадлежностями к нему, например, Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems («Апплайд Биосистемс»), США).

40.Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).

41.Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки.

42.Емкость для сброса наконечников.

В случае использования пробирок для постановки реакции секвенирования:

43.Одноразовые нестрипованные полипропиленовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл (например,

Ахуген, Inc., («Эксиджен, Инк»), США).

44. Штатив для пробирок объемом 0,2 мл и наконечников (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).

45. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g с адаптерами для ПЦР-пробирок объемом 0,2 мл (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).

В случае использования 96-луночных планшетов для постановки реакции секвенирования:

46. Центрифуга с ротором для планшетов до 2 тыс g. (например, центрифуга 5804 с ротором A-2-DWP, Eppendorf AG («Эппендорф АГ»), Германия).

47. Шейкер для 96-луночных планшетов (например, мини-шейкер PSU-2T, SIA Biosan, Латвия).

Интерпретация результатов секвенирования

48. Компьютер со стандартным пакетом Microsoft® Office с выходом в интернет, соответствующий требованиям, указанным в руководстве оператора ПО «АмплиСенс® Resist-HBV» или руководстве пользователя ПО «ДЕОНА», входящих в состав данного набора реагентов.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служит плазма крови. Для проведения анализа используется ранее экстрагированная из плазмы крови ДНК HBV.

Взятие, транспортирование и хранение биологического материала проводить в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора и СанПиН 3.3686-21.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАЦИИ ДНК

Для образцов плазмы крови требуется предварительная подготовка. Подготовку образцов проводить в соответствии с

методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, и СанПиН 3.3686-21.

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.

ВНИМАНИЕ! Для исследования пригодна ранее полученная ДНК при условии ее хранения в течение 1 недели при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1 года при температуре от минус 24 до минус 16 °С, любого срока хранения при температуре не выше минус 68 °С.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Для проведения исследования не использовать для взятия крови пробирки, содержащие гепарин.

СОСТАВ

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100 – комплект реагентов для амплификации ДНК фрагмента ревертазного (RT) домена Р-гена вируса гепатита В – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
ПЦР-смесь-1 <i>HBV</i> / Res	Прозрачная бесцветная жидкость	0,6	1 пробирка
2,5x ПЦР-буфер blue	Прозрачная жидкость синего цвета	1,15	1 пробирка
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	4,0	1 флакон
K+ <i>HBV</i> / Res	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
K–	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 110 реакций амплификации, включая контрольные образцы.

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

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Раствор для отмывки 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1 флакон
Сорбент	Суспензия белого цвета	0,4	2 пробирки
H ₂ O стерильная	Прозрачная бесцветная жидкость	1,8	2 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на очистку ПЦР-продукта из 50 проб.

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

Реагент	Описание	Объем, мл Масса, г	Количество
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).

Комплект реагентов «Комплект для подготовки к секвенированию HBV / Res» – комплект праймеров для секвенирования ревертазного (RT) домена Р-гена вируса гепатита В и реагентов для оценки концентрации очищенных продуктов амплификации, для очистки и предварительной денатурации продуктов реакции секвенирования – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Праймер В1	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер В2	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер В3	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Праймер В4	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
Маркер молекулярных масс	Прозрачная жидкость от синего до фиолетового цвета	0,15	1 пробирка
Буфер для нанесения образцов	Прозрачная жидкость синего цвета	0,2	2 пробирки
Н ₂ О 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 50 образцов к секвенированию с четырех праймеров.

Комплект реагентов «Комплект для секвенирования» – комплект реагентов для проведения реакции секвенирования, содержащий флуоресцентно-меченные терминаторы – включает:

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Смесь Seq	Прозрачная жидкость розового цвета	0,02	6 пробирок
5x буфер Seq	Прозрачная бесцветная жидкость	0,04	6 пробирок

Комплект реагентов рассчитан на проведение 100 реакций секвенирования. Входит в состав формы комплектации 1 (2 штуки).

Программное обеспечение «АмплиСенс® Resist-HBV» версия 1, дата выпуска 20.08.2020 (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.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Экстракция ДНК *HBV* проводится в случае, если для проведения тестирования с помощью набора реагентов АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq* не хватает объема ранее экстрагированной ДНК.

Для экстракции ДНК используется комплект реагентов «РИБО-преп» в соответствии с инструкцией к используемому комплекту для экстракции.

ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ

(проводится в зоне Амплификации – помещении для проведения ПЦР)

Выбор пробирок для амплификации зависит от используемого амплификатора.

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

А. Подготовка пробирок для амплификации

Общий объем реакционной смеси – 25 мкл, включая объем

пробы ДНК – 10 мкл.

1. Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью-1-*HBV / Res* и 2,5х ПЦР-буфером *blue*, осадить капли на вортексе.
2. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество ПЦР-смеси-1-*HBV / Res*, 2,5х ПЦР-буфера *blue* и полимеразы (*TaqF*) согласно табл. 9, осадить капли с крышки пробирки.

Таблица 9

Схема приготовления реакционных смесей

		Объем реагентов на указанное количество реакций, мкл		
Объем реагента на одну реакцию, мкл		5,0	10,0	0,5
Число биологических образцов	Число реакций ¹⁴	ПЦР-смесь-1- <i>HBV / Res</i> ¹⁵	2,5х ПЦР-буфер <i>blue</i> ¹⁵	Полимераза (<i>TaqF</i>) ¹⁵
4	7	40	80	4,0
5	8	45	90	4,5
6	9	50	100	5,0
7	10	55	110	5,5
8	11	60	120	6,0
9	12	65	130	6,5
10	13	70	140	7,0
11	14	75	150	7,5
12	15	80	160	8,0

3. Отобрать необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб (количество контрольных образцов см. в пункте 9).
4. Внести в каждую пробирку по 15 мкл приготовленной реакционной смеси.
5. Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл) (при использовании амплификатора без термостатируемой крышки).
6. Промаркировать пробирки.
7. Подготовить пробирки с экстрагированной ДНК, предназначенной для проведения исследования. В случае

¹⁴ Число биологических образцов + 1 контроль этапа экстракции ДНК + 2 контроля ПЦР (N+3, N – количество биологических образцов).

¹⁵ Объемы вносимых реагентов приведены с запасом на 1 образец.

хранения пробирок их необходимо встряхнуть на вортексе, а затем центрифугировать при 10 тыс g в течение 30 сек.

8. В подготовленные пробирки с реакционной смесью внести по **10 мкл проб ДНК**, полученных в результате экстракции из биологических образцов, используя отдельный наконечник с фильтром для каждой пробы.
9. Поставить контрольные реакции:
 - а) **отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы**, выделенной из **ОКО**.
 - б) **отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.
 - в) **положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ HBV / Res.**

Б. Проведение амплификации

1. Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 10).
2. Запустить выполнение программы амплификации. Когда температура в ячейках достигнет 95 °С (режим паузы), установить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и нажать кнопку продолжения программы.

Примечание. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок на вортексе.

Таблица 10

Программа амплификации «62/50»

Для амплификаторов группы 1 ¹⁶				Для амплификаторов группы 2 ¹⁷		
Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов	Температура, °С	Время	Количество циклов
0	95	Пауза		95	Пауза	
1	95	15 мин	1	95	15 мин	1
2	95	10 с	50	95	30 с	50
	62	10 с		62	30 с	
	72	20 с		72	50 с	
3	72	1 мин	1	72	1 мин	1
4	10	Хранение		10	Хранение	

¹⁶ GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems Group of The Applera Corporation), «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология») и другие, рекомендованные Производителем.

¹⁷ GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems Group of The Applera Corporation), MaxyGene Gradient (Axygen Scientific Inc.) и другие, рекомендованные Производителем.

3. После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов амплификации (зону Детекции). Пробы после амплификации можно хранить в течение 3 дней при температуре от 2 до 8 °С, в течение 1-2 мес при температуре от минус 24 до минус 16 °С.

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® HBV-Resist-Seq входит комплект реагентов «АмплиСенс® Ампли-сорб».

ВНИМАНИЕ! Очистке подвергаются только биологические образцы. Контрольные образцы очистке не подвергаются.

Очистка продуктов амплификации при использовании комплекта реагентов «АмплиСенс® Ампли-сорб»

Объем ПЦР-продукта для очистки – 20 мкл.

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

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 объемом 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками. Промаркировать пробирки.
3. В промаркированные пробирки раскатать по 300 мкл **лизирующего раствора**, затем добавить по **20 мкл ПЦР-продукта**, используя для каждого образца отдельный наконечник с фильтром, 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**. Плотно закрыть крышки.

5. Перемешать содержимое пробирок на вортексе и оставить на **10 мин** при комнатной температуре, тщательно перемешивая каждые **2 мин**.
6. Центрифугировать пробирки в течение **1 мин** при **10 тыс g**.
7. По внутренней стенке пробирки, не захватывая осадок, аккуратно удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.
8. Добавить в пробирки по **500 мкл раствора для отмывки 2**, плотно закрыть крышки. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **10 тыс g**.
9. Удалить надосадочную жидкость и добавить по **500 мкл раствора для отмывки 3**, плотно закрыть крышки. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **10 тыс g**.
10. Тщательно удалить надосадочную жидкость и высушить осадок сорбента при открытых крышках пробирок в термостате при температуре **60 °C** в течение **3-5 мин**.
11. Добавить в пробирки **40 мкл H₂O стерильной**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента, инкубировать при комнатной температуре в течение **5 мин**.
12. Перемешать на вортексе. Осадить сорбент на микроцентрифуге в течение **2 мин** при **10 тыс g**.
13. Отобрать **30 мкл** надосадочной жидкости каждого образца и перенести в новые промаркированные пробирки объемом **0,5 мл**. Надосадочная жидкость содержит очищенный ПЦР-продукт. Пробы готовы к оценке концентрации очищенных ПЦР-продуктов и постановке реакции секвенирования.

ВНИМАНИЕ! Отбирать очищенный ПЦР-продукт для дальнейшего 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 от минус 24 до минус 16 °C.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ И 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 провести электрофоретическую детекцию очищенных продуктов амплификации (ПЦР-продуктов) с целью выявления образцов, пригодных для секвенирования, и оценить их концентрацию. Электрофоретическая детекция и оценка концентрации очищенных продуктов амплификации осуществляется с использованием комплекта реагентов «ЭФ» вариант 200, Маркера молекулярных масс, Буфера для нанесения образцов и H_2O стерильной из «Комплекта для секвенирования HBV / Res».

Объем очищенного ПЦР-продукта – 5 мкл.

А. Электрофоретическая детекция

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

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе маркер молекулярных масс, буфер для нанесения образцов и H_2O стерильную, осадить капли с крышек пробирок.

1. Приготовить агарозный гель в соответствии с разделом «Приготовление рабочих растворов и агарозного геля» инструкции к комплекту реагентов «ЭФ» вариант 200.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 0,5 мл с учетом количества очищенных ПЦР-продуктов. 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 продукта ПЦР** согласно маркировке, используя новый наконечник для каждой пробы. Тщательно перемешать на вортексе и осадить капли с крышек пробирок. Оставшийся объем **очищенного продукта ПЦР** поместить в холодильник и хранить при температуре от минус 24 до 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. В **каждом** ряду дорожек геля должны быть обязательно представлены контрольные образцы **ОК, К– и К+**. Аккуратно внести **5 мкл** указанных образцов в соответствующие лунки геля.
8. Провести электрофоретическую детекцию в соответствии с пунктами 2 и 3 раздела «Порядок работы» инструкции к комплекту реагентов «ЭФ» вариант 200.
9. Последовательно провести:
 - а) учет результатов в контрольных и исследуемых образцах,
 - б) оценку концентрации в исследуемых образцах.

Б. Учет результатов

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфической полосы амплифицированного фрагмента ДНК ревертазного (RT) домена Р-гена *HBV*.

Длина специфической полосы амплифицированного фрагмента ДНК ревертазного (RT) домена Р-гена *HBV* составляет **970 п.н.**

Учет результатов в контрольных образцах

Результат ПЦР-исследования считается достоверным, если получены правильные результаты прохождения положительного и отрицательных контролей, в соответствии с табл. 11.

Таблица 11

Оценка результатов анализа контрольных образцов

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-исследования	Специфическая полоса 970 п.н. на электрофореграмме
ОК	Экстракция ДНК, ПЦР	Нет
К–	ПЦР	Нет
К+	ПЦР	Есть

1. В дорожке, соответствующей отрицательным контролям этапов экстракции и ПЦР, не должно быть специфической светящейся полосы, соответствующей фрагменту генома вируса гепатита В на уровне 970 п.н.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если в положительном контроле не выявляется специфическая светящаяся полоса, то это может свидетельствовать о неправильно выбранной программе амплификации или о других ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР. В этом случае требуется повторить исследование для всех образцов, в которых не обнаружена светящаяся оранжевая полоса на уровне 970 п.н., начиная с этапа Амплификации.
2. Если в отрицательном контроле (ОК или К–) выявляется светящаяся полоса размером 970 п.н., то это может свидетельствовать о контаминации реагентов или исследуемых образцов. Требуется повторить исследование для всех положительных образцов, начиная с этапа Экстракции ДНК, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

Учет результатов в исследуемых образцах

1. Образцами, пригодными для проведения реакции секвенирования, считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 970 п.н. большей или меньшей интенсивности, даже при наличии слабых неспецифических полос.
2. Для образцов, которые не содержат специфическую

светящуюся полосу на уровне 970 п.н. и имеют вирусную нагрузку, близкую к аналитической чувствительности набора реагентов, необходимо провести повторное исследование, начиная с этапа Экстракции ДНК. Если при повторном исследовании образцы вновь не содержат специфическую светящуюся полосу на уровне 970 п.н., то по этим образцам выдается результат «не определено по причине низкой вирусной нагрузки».

В. Оценка концентрации ДНК в исследуемых образцах

1. Для оценки концентрации ДНК в каждом исследуемом образце провести визуальное сравнение интенсивности свечения специфической полосы образца с интенсивностью свечения полос маркера молекулярных масс. Характеристика полос маркера молекулярных масс приведена в табл. 12. Определение концентрации ДНК исследуемого образца ведется по трем верхним полосам маркера молекулярных масс в соответствии с табл. 13 и рис. 1.

Таблица 12

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. После определения примерной концентрации ДНК в каждом образце, необходимо подготовить ПЦР-продукты к секвенированию, доведя концентрацию ДНК с помощью H_2O стерильной до необходимой для проведения реакции секвенирования, согласно рекомендациям, указанным в табл. 13.

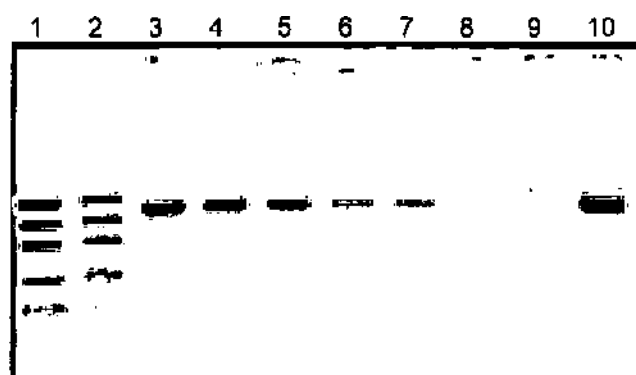
ВНИМАНИЕ! В таблице приведены объемы H_2O стерильной для разведения оставшегося объема очищенного ПЦР-продукта (25 мкл). Если количество разводимого ПЦР-продукта не соответствует 25 мкл, объемы H_2O стерильной должны быть пропорционально изменены.

Таблица 13

Определение количества ДНК в исследуемых образцах и разведение их 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 ₂ O стерильной для доведения ПЦР-продуктов до рабочей концентрации, мкл (кратность разведения)
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)
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 контроль экстракции ДНК (ОК)
9. Отрицательный контроль этапа ПЦР (К-)
10. Положительный контроль этапа ПЦР (К+)

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

ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ЦИКЛИЧЕСКОГО 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.

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

Секвенирование ПЦР-фрагмента ревертазного (RT) домена Р-гена вируса гепатита В осуществляется с четырех праймеров, входящих в «Комплект для подготовки к секвенированию **HBV / Res**», поэтому для проведения реакции секвенирования необходимо приготовить четыре реакционные смеси для

секвенирования - «В1», «В2», «В3» и «В4», каждая из которых содержит определенный праймер из «Комплекта для подготовки к секвенированию» (праймер В1, праймер В2, праймер В3 и праймер В4, соответственно) и реагенты для проведения реакции секвенирования, содержащие флуоресцентно-меченные терминаторы. Реакция секвенирования для каждого анализируемого образца проводится в 4 пробирках, в каждую из которых вносится одна из приготовленных реакционных смесей «В1», «В2», «В3» или «В4» и очищенный образец (ПЦР-продукт).

При использовании формы комплектации 1 набора реагентов АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq* реагенты для проведения реакции секвенирования входят в «Комплект для секвенирования», порядок работы с которым приведен ниже.

При использовании формы комплектации 2 набора реагентов АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq* необходимо дополнительно использовать комплект реагентов для секвенирования, рекомендованный производителем используемого секвенатора, в соответствии с инструкцией производителя.

ВНИМАНИЕ! Концентрация каждого праймера из «Комплекта для подготовки к секвенированию *HBV / Res*» составляет 0,8 пмоль/мкл.

Порядок работы при использовании «Комплекта для секвенирования»

Общий объем реакционной смеси – 10 мкл, включая объем пробы ПЦР-продукта – 5 мкл.

А. Подготовка пробирок для проведения реакции секвенирования

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе праймеры и раствор для денатурации из «Комплекта для подготовки к секвенированию *HBV / Res*» и все реагенты «Комплекта для секвенирования», осадить капли с крышек пробирок. Компоненты реакционной смеси следует смешивать непосредственно перед проведением анализа.

ВНИМАНИЕ! Не допускается замораживание/оттаивание реагентов из «Комплекта для секвенирования» и раствора для денатурации из «Комплекта для подготовки к

секвенированию **HBV / Res**» более двух раз. Реагенты, входящие в состав «Комплекта для секвенирования» светочувствительны! Не оставляйте их на свету в течение длительного времени!

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

ВНИМАНИЕ! При использовании пробирок объемом 0,2 мл для каждого исследуемого образца необходимо приготовить 4 пробирки, промаркированные «№ образца/В1», «№ образца/В2», «№ образца/В3» и «№ образца/В4», соответственно. При использовании 96-луночного планшета необходимо учитывать, что для каждого образца используется 4 лунки. Пример шаблона заполнения планшета приведен на рисунке 2.

Рисунок 2 – Пример шаблона заполнения 96-луночного планшета для проведения реакции секвенирования ПЦР-фрагмента ревертазного (RT) домена Р-гена вируса гепатита В – в лунку **A1** (№1/В1) – вносится реакционная смесь «В1» и образец №1, в лунку **B1** (№1/В2) – вносится реакционная смесь «В2» и образец №1 и т.д.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	№1/В1	№3/В1	№5/В1	№7/В1	№9/В1							
B	№1/В2	№3/В2	№5/В2	№7/В2	№9/В2							
C	№1/В3	№3/В3	№5/В3	№7/В3	№9/В3							
D	№1/В4	№3/В4	№5/В4	№7/В4	№9/В4							
E	№2/В1	№4/В1	№6/В1	№8/В1	№10/В1							
F	№2/В2	№4/В2	№6/В2	№8/В2	№10/В2							
G	№2/В3	№4/В3	№6/В3	№8/В3	№10/В3							
H	№2/В4	№4/В4	№6/В4	№8/В4	№10/В4							

2. Отобрать четыре пробирки объемом 0,5 мл для приготовления реакционных смесей. Промаркировать пробирки «В1», «В2», «В3» и «В4».
3. В каждую из 4-х пробирок объемом 0,5 мл внести из расчета на 1 реакцию: 1 мкл Смеси Seq, 2 мкл 5х буфера Seq из «Комплекта для секвенирования», 2 мкл соответствующего праймера из «Комплекта для

подготовки к секвенированию **HBV / Res**» (см. также табл. 14), Полученные реакционные смеси перемешать на вортексе и осадить капли с крышки пробирки.

Таблица 14

Приготовление реакционных смесей для реакции секвенирования

Объем реагентов на 1 реакцию	1,0 мкл	2,0 мкл	2,0 мкл
Количество исследуемых образцов	Смесь Seq ¹⁸ , мкл	5x Буфер Seq ¹⁸ , мкл	Праймер ¹⁸ , 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 пробирки (лунки) в соответствии с маркировкой (шаблоном) по **5 мкл** соответствующей реакционной смеси.
5. В пробирки (лунки планшета) с раскапанными реакционными смесями аккуратно внести по **5 мкл** очищенных ПЦР-продуктов.

ВНИМАНИЕ! Каждый исследуемый образец внести в 4 пробирки (лунки), содержащие раскапанные реакционные смеси «B1», «B2», «B3» и «B4», используя **новые** наконечники с фильтрами для внесения образца в пробирки (лунки) с разными реакционными смесями.

6. Закрыть крышки пробирок. При использовании планшета закрыть его специальным материалом, предназначенным для этих целей (например, алюминиевой фольгой с адгезивной стороной или адгезивной пленкой).
7. Перед постановкой в амплификатор при использовании пробирок перемешать пробы на вортексе и осадить капли с крышек пробирок; при использовании планшетов перемешать пробы на шейкере для планшетов и центрифугировать планшеты на центрифуге с ротором для планшетов при 2 тыс g в течение 5 с.

¹⁸ Объемы вносимых реагентов приведены с запасом на 1 образец.

Б. Проведение реакции секвенирования

1. Запустить программу амплификации «SEQ» (см. табл. 15). Поместить пробирки (планшет) в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить выполнение программы.

Таблица 15

Программа амплификации «SEQ»

Цикл	Температура, °C	Время	Количество 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 храниться при температуре от минус 24 до минус 16 °C в течение 3 суток.

ОЧИСТКА ОТ НЕВКЛЮЧИВШИХСЯ ТЕРМИНАТОРОВ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ 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.

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

ВНИМАНИЕ! До начала работы разморозить, тщательно перемешать на вортексе раствор F из «Комплекта для подготовки к секвенированию HBV / Res», осадить капли с крышек пробирок.

Порядок работы

А. Очистка продуктов реакции секвенирования от не включившихся терминаторов с использованием раствора F из «Комплекта для подготовки к секвенированию HBV / Res»

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 планшет, не закрывая его алюминиевой фольгой с адгезивной стороной.
2. Инкубировать пробирки (планшет) **15 мин** при комнатной температуре.
3. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге с адаптерами для пробирок объемом 0,2 мл в течение **20 мин** при **12 тыс g**. При использовании планшета центрифугировать пробы на центрифуге с ротором для планшет в течение **30 мин** при **2 тыс g**.
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 супернатант. 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 пробирок объемом 0,2 мл в течение **2 мин** при **12 тыс g**. При использовании планшета центрифугировать пробы на центрифуге с ротором для планшет в течение **2 мин** при **2 тыс g**.
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 супернатант. Не переворачивая

планшет, поместить его в центрифугу на бумажное полотенце или салфетку и центрифугировать планшет в таком виде в течение 20 с при 2 тыс g.

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 от минус 24 до минус 16 °С в течение 1 мес.

Б. Предварительная денатурация очищенных продуктов реакции секвенирования с использованием раствора для денатурации из «Комплекта для подготовки к секвенированию HBV / Res»

1. Перед загрузкой очищенных продуктов реакции секвенирования в секвенатор необходимо провести их предварительную денатурацию, добавив в пробирки (лунки 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 планшета и центрифугировать планшет на центрифуге с ротором для планшета 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. 16).

Таблица 16

Цикл	Температура, °С	Время	Количество 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.

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 в соответствии с инструкцией к прибору. В процессе работы секвенатора проводится автоматическая детекция нуклеотидных последовательностей продуктов реакции секвенирования. Протяженность прочтения прибором нуклеотидных последовательностей продуктов реакции секвенирования с используемых праймеров приведена в табл. 17.

Таблица 17

№	Название праймера для секвенирования	Максимальная протяженность прочтения, п.н.
1	Праймер В1	900
2	Праймер В2	700
3	Праймер В3	650
4	Праймер В4	320

После завершения работы секвенатора приступить к анализу и интерпретации полученных результатов секвенирования.

АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для анализа и интерпретации результатов секвенирования необходимо:

1. Собрать четыре секвенированные нуклеотидные последовательности, полученные для каждого образца в единую последовательность (консенсус-последовательность).

2. Проанализировать собранную консенсус-последовательность:

- сравнить собранную консенсус-последовательность с референс-последовательностью для выявления отличий между ними в позициях, ассоциированных с возникновением мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам;
- определить наличие мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам.

3. Провести клиническую интерпретацию полученных результатов.

Сборку консенсус-последовательности, анализ качества нуклеотидной последовательности, ее редактирование и анализ наличия мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам провести с использованием программного обеспечения «АмплиСенс® Resist-HBV» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) или «ДЕОНА» (АО «РМБит», Россия) в соответствии с руководством оператора (пользователя) к используемому программному обеспечению.

Результатом проведенного анализа консенсус-последовательности является информация о наличии мутаций в сайтах, ассоциированных с возникновением лекарственной устойчивости *HBV* к противовирусным препаратам.

Общие принципы оценки достоверности (валидности) анализа, качества консенсусной последовательности, а также правила редактирования консенсусной последовательности указаны в «Методических рекомендациях по анализу и интерпретации результатов исследования, проведенного с использованием набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *HBV*-Resist-Seq».

Принцип интерпретации результатов

В мировой практике мутации лекарственной устойчивости *HBV* к противовирусным препаратам обозначаются по номеру позиции аминокислоты в ревертазном (RT) домене вирусной полимеразы, с указанием немутантного варианта (аминокислоты дикого типа) и мутантного варианта (мутантной аминокислоты), причем аминокислота дикого типа указывается слева от номера аминокислоты, вариант мутации устойчивости – справа. Например, **M204I** – замена метионина (M),

аминокислоты дикого типа, в 204 положении ревертазного домена на аминокислоту **изолейцин (I)**, наличие которой в данной позиции ассоциировано с возникновением мутации лекарственной устойчивости - **M204I** - к определенным противовирусным препаратам. Необходимо помнить, что в сайтах, ассоциированных с возникновением лекарственной устойчивости *HBV* к противовирусным препаратам, могут быть выявлены другие мутации, для которых не было показано ассоциаций с лекарственной устойчивостью.

Если в результате проведенного анализа в определенной позиции аминокислотной последовательности:

- выявлена **мутация N**, ассоциированная с возникновением устойчивости *HBV*, то по данной позиции выдается результат **«мутация N обнаружена»**.
- одновременно выявлены **мутация N** и аминокислота «дикого типа», то по данной позиции выдается результат **«мутация N обнаружена»**.
- одновременно выявлены несколько мутаций (например, **мутация N и мутация M**), ассоциированных с возникновением устойчивости *HBV*, то по данной позиции выдается результат **«мутация N, мутация M обнаружены»**.
- не выявлена **мутация N**, ассоциированная с возникновением устойчивости *HBV*, то по данной позиции выдается результат **«мутация N не обнаружена»**.

Результат считается **невалидным** в том случае, если полученная после редактирования консенсус-последовательность имеет неудовлетворительное качество:

- не покрывает полностью область определяемых мутаций (для обратной транскриптазы ревертазного домена Р гена – с 80 по 250 а/к);
- менее чем на 90 % идентична референсной последовательности;
- содержит стоп-кодоны.

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

Принцип клинической интерпретации результатов

Мутации лекарственной устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам подразделяются на:

- основные (первичные) – мутации, снижающие чувствительность вируса к противовирусному препарату и в большинстве случаев приводящие к снижению репликативной способности возбудителя;
- компенсаторные (вторичные) – дополнительные мутации, которые устраняют дефекты в репликативной способности вируса, связанные с появлением первичной мутации.

Клиническая интерпретация результатов проводится дифференцированно для каждого противовирусного препарата. Если в результате проведенного исследования:

- обнаружены основные мутации устойчивости к противовирусному препарату, то по данному препарату выдается результат **«вирус гепатита В устойчив к препарату»**;
- не обнаружены основные и компенсаторные мутации устойчивости к противовирусному препарату, то по данному препарату выдается результат **«вирус гепатита В чувствителен к препарату»**;
- обнаружены компенсаторные мутации устойчивости к противовирусному препарату, то по данному препарату выдается результат **«у вируса гепатита В возможно возникновение устойчивости к препарату»**.

Анализ и интерпретация результатов с помощью программного обеспечения «АмплиСенс® Resist-HBV»

(руководство оператора расположено на официальном сайте изготовителя resist.amplisens.ru/hbv/ во вкладке «Помощь»)

1. Открыть ПО «АмплиСенс® Resist-HBV». Для этого в интернет-браузере открыть страницу resist.amplisens.ru/hbv/.
2. Войти в личный кабинет, введя логин и пароль, либо зарегистрироваться.
3. Создать новый проект в профиле «Гепатит В: Ревертазный домен Р-гена».
4. В открывшемся окне нажать **Выбрать...** для выбора файлов хроматограмм.
5. Выделить все файлы, содержащие хроматограммы исследуемого образца (4 файла формата «*.ab1»).

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-HBV» представит отчет с данными об устойчивости исследуемого вируса к противовирусным препаратам (краткий отчет), а также с данными о качестве полученной последовательности (расширенный отчет).
9. Внести необходимую информацию по пациенту.
10. Нажать кнопку **Сохранить PDF**, в случае необходимости сохранения отчета, или распечатать отчет, нажав кнопку **Печатать отчет**.

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

Анализ и интерпретация результатов с помощью программного обеспечения «ДЕОНА»

1. Открыть ПО «ДЕОНА».
2. Создать новый проект с профилем «Гепатит В (Ревертазный домен Р-гена)».
3. На панели инструментов нажать клавишу **Открыть**.
4. Выделить все файлы, содержащие хроматограммы исследуемого образца (4 файла формата «*.ab1»). 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 противовирусным 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**.

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

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. При получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

Хранение. Комплекты реагентов «АмплиСенс® Ампли-сорб», «ПЦР-комплект» (кроме полимеразы (TaqF)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. «Комплект для подготовки к секвенированию *HBV / Res*», «Комплект для секвенирования» и полимеразу (TaqF) из «ПЦР-комплекта» хранить при температуре от минус 24 до 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.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ИЗГОТОВИТЕЛЯ

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

Медицинское изделие техническому обслуживанию и ремонту не подлежит.

Рекламации на качество набора реагентов направлять по адресу 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, дом 3А, e-mail: obtk@pcr.ru¹⁹.

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 регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Директор
ГБУЗ МО МОНИКИ
им. М.Ф. Владимирского

К.Э. Соболев



¹⁹ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

- ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании медицинских изделий, на этикетках и в сопроводительной документации».
- ГОСТ 14192-96 «Маркировка грузов» (п. 4.1).
- ГОСТ Р ИСО/МЭК 9126-93 «Информационная технология. Оценка программной продукции. Характеристика качества и руководства по их применению».
- ГОСТ 28195-89 «Оценка качества программных средств. Общие положения».
- ГОСТ Р МЭК 62304-2013 «ИЗДЕЛИЯ МЕДИЦИНСКИЕ. Программное обеспечение. Процессы жизненного цикла» (п. 4.3).
- 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».
- МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер по каталогу



Осторожно!



Код партии



Содержимого
достаточно для
проведения n тестов



Медицинское изделие
для диагностики in vitro



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
инструкции по
применению



Предел температуры



Не допускать
воздействия
солнечного света



Изготовитель



Дата изготовления

Прошито, пронумеровано и скреплено печатью: 4/8

Руководитель службы регистрации медицинских изделий

(Доверенность № 178/21 от 16.11.2021 г.)

А.О.Лисицына

«20» нояб 2022 г.

М.П.

Всего пронумеровано,
прошнуровано и скреплено
печатью 548 листа(ов)

Директор ГБУЗ МО МОНИКИ
им.М.Ф.Владимирского
Соболев КЭ.

«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

20.08.2020 г.

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ «АмплиСенс® Resist-HBV»

версия 1, дата выпуска 20.08.2020

Руководство оператора

АмплиСенс®



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А
г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, стр. 6
тел. (495) 974 9642, e-mail: amplisens@pcr.ru

IVD

АННОТАЦИЯ

В данном программном документе описан порядок работы оператора с программным обеспечением «АмплиСенс® Resist-HBV» версия 1, дата выпуска 20.08.2020, входящим в состав медицинского изделия «Набор реагентов для диагностики in vitro АмплиСенс® HBV-Resist-Seq по ТУ 9398-222-01897593-2014», РУ № РЗН 2016/4228 (далее – ПО).

СОДЕРЖАНИЕ

1	НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ	5
1.2	Эксплуатационное назначение	5
1.3	Порядок присвоения версии 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 <i>Хроматограмма</i>	10
4.3.1.3	Вкладка <i>Контроль качества</i>	11
4.3.1.4	Вкладка <i>Мутации</i>	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	22
4.3.3.1	Формирование отчета	22
4.3.3.2	Описание лекарственной устойчивости, выявленных мутаций и контроля качества исследования в отчете о результатах исследования	23
5	СООБЩЕНИЯ ОПЕРАТОРУ	24
6	ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА	26

ТЕРМИНЫ И СОКРАЩЕНИЯ

Сокращение	Расшифровка
БД	База данных
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: - Покрывание участка нуклеотидной последовательности - Наличие проблемных участков (стоп-кодона, 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 «rcon» 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 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)
HBV	Hepatitis B virus (вирус гепатита В)

1 НАЗНАЧЕНИЕ ПРОГРАММЫ

1.1 Функциональное назначение

ПО предназначено для анализа и обработки нуклеотидных последовательностей для выявления лекарственной устойчивости вируса гепатита В.

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 вируса гепатита В.

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

1.3 Порядок присвоения версии ПО

ПО присваивается следующий порядковый номер версии (издания) в обозначении программы в случае изменения архитектуры, логики работы, структуры и функций программы.

1.4 Версия и дата выпуска ПО

Версия ПО: 1

Дата выпуска: 20.08.2020

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 информацию о лекарственной устойчивости 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.
- 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, 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.

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.amplisens.ru/hbv/.

3.2 Регистрация (первый вход)

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

В появившемся 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.

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).

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

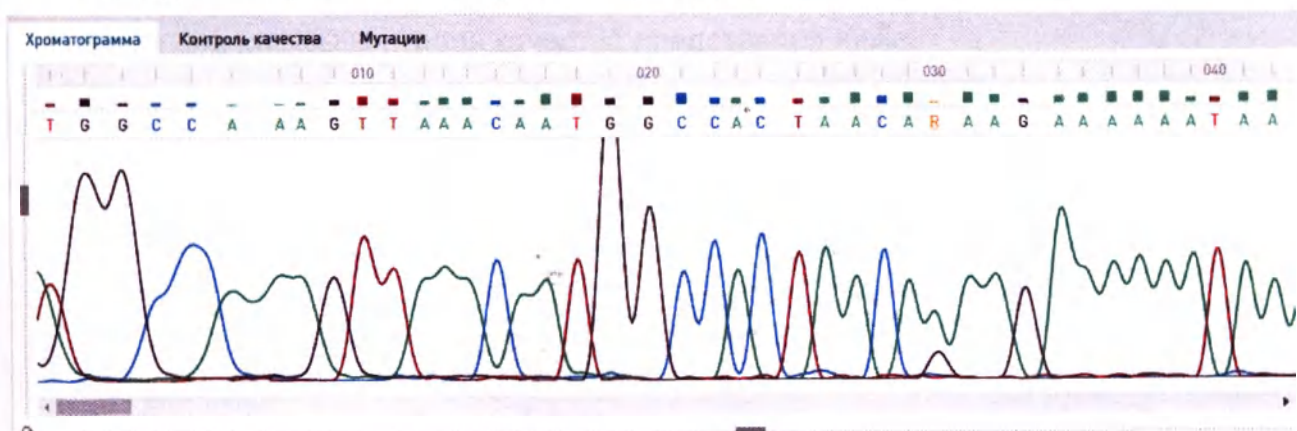
В верхней части экрана представлены кнопки команд управления проектом. Назначение кнопок указано в таблице 3.

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

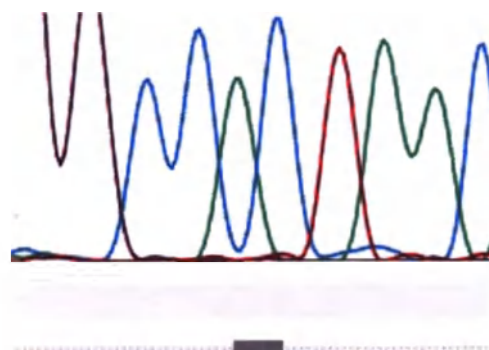
Во вкладке отображается выбранное прочтение.



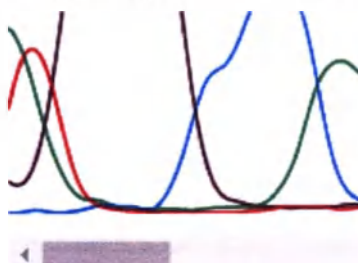
Для управления масштабом хроматограмм используют ползунки:

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.

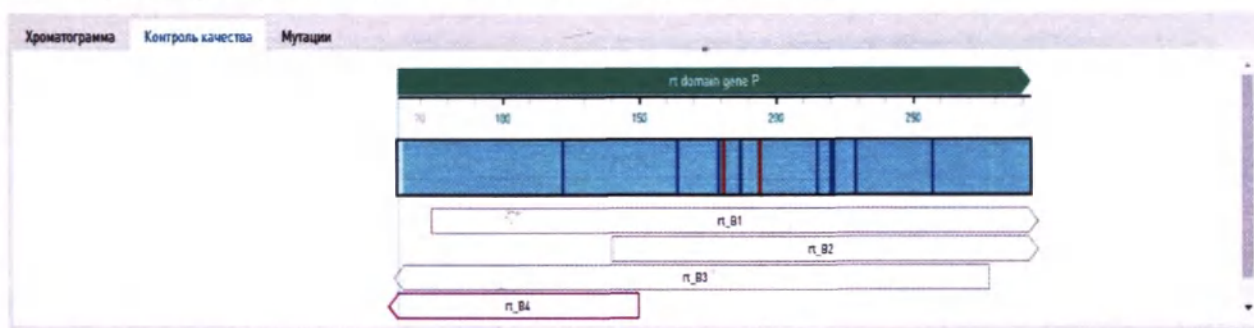


4.3.1.3 Вкладка *Контроль качества*

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

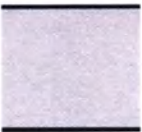
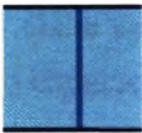
- Покрытие участка нуклеотидной последовательности.
- Наличие проблемных участков (стоп-кодона, нетипичные мутации).

Пример диаграммы контроля качества представлен ниже:

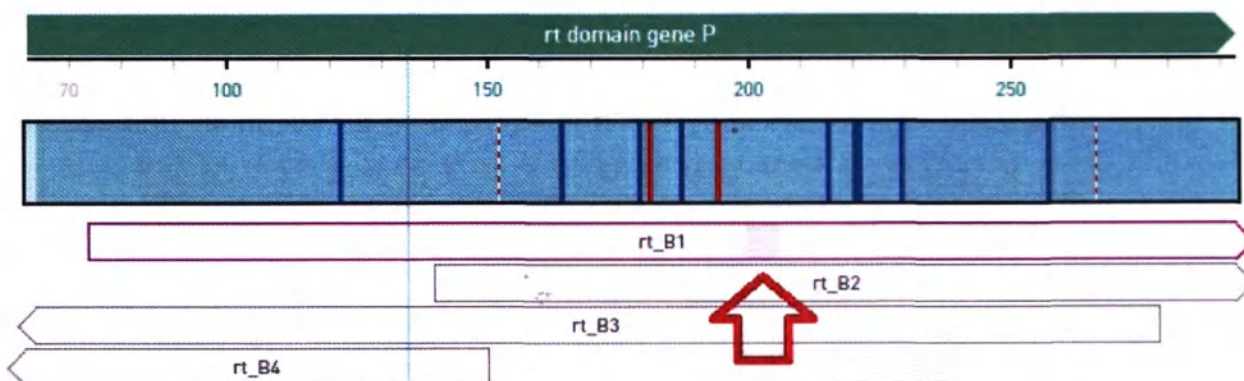


Обозначения диаграмм контроля качества указаны в таблице 4.

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.

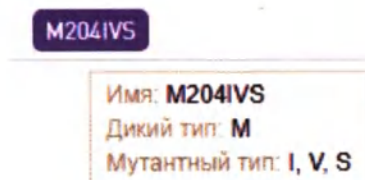


4.3.1.4 Вкладка Мутации

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



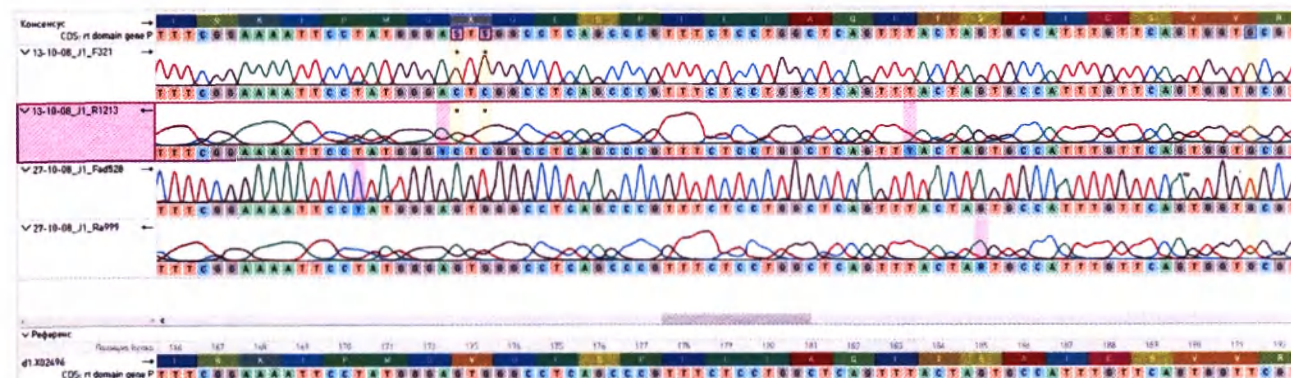
При наведении курсора на обозначение мутации отображается подсказка.



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.



Цветные обозначения нуклеотидов приведены в таблице 5:

Таблица 5

Обозначение	Цвет фона	Описание
	Зеленый	Аденин
	Голубой	Цитозин
	Серый	Гуанин
	Красный	Тимин
	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 референсной последовательности

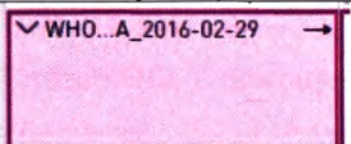
Цветные обозначения отличий в аминокислотной последовательности приведены в таблице 7:

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

Цветные обозначения навигационных элементов приведены в таблице 8:

Таблица 8

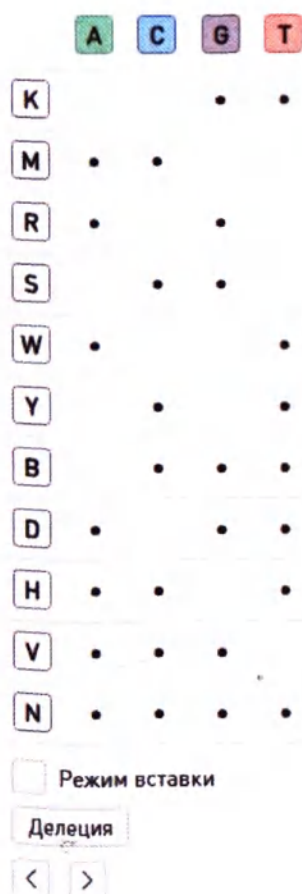
Обозначение	Описание
 Голубой фон	Показывает активную позицию курсора. Автоматическая прокрутка графиков (центрирование) происходит по выделению
 Малиновая рамка	Указывает активную последовательность. При редактировании изменения затрагивают позиции данной последовательности. Во вкладке Хроматограмма 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.



① Нажмите на кнопку в таблице, чтобы изменить символ в последовательности.

- 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

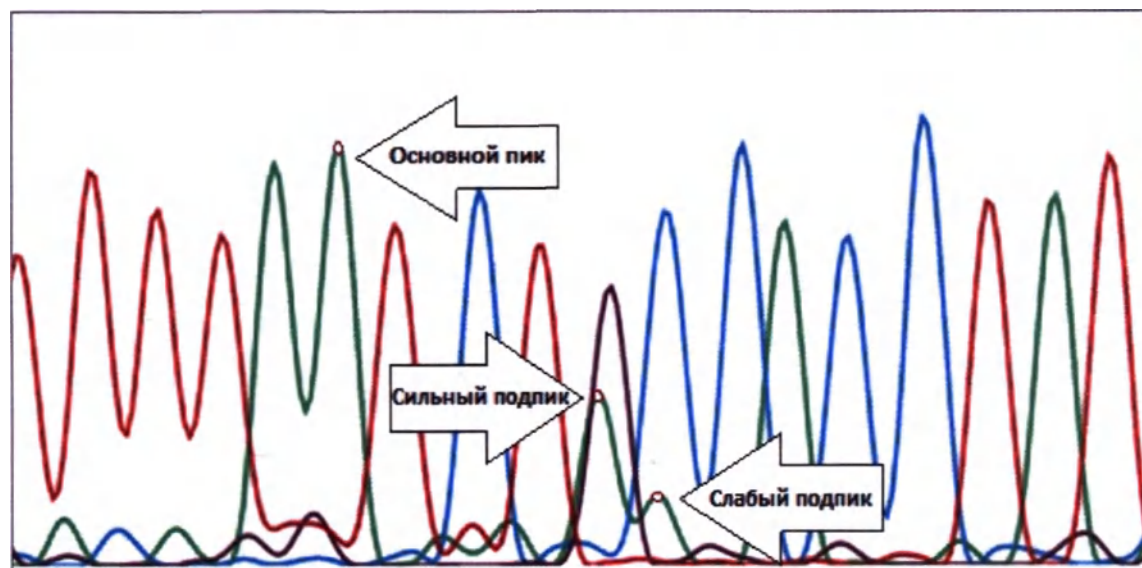
4.3.2 Работа с нуклеотидной последовательностью

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

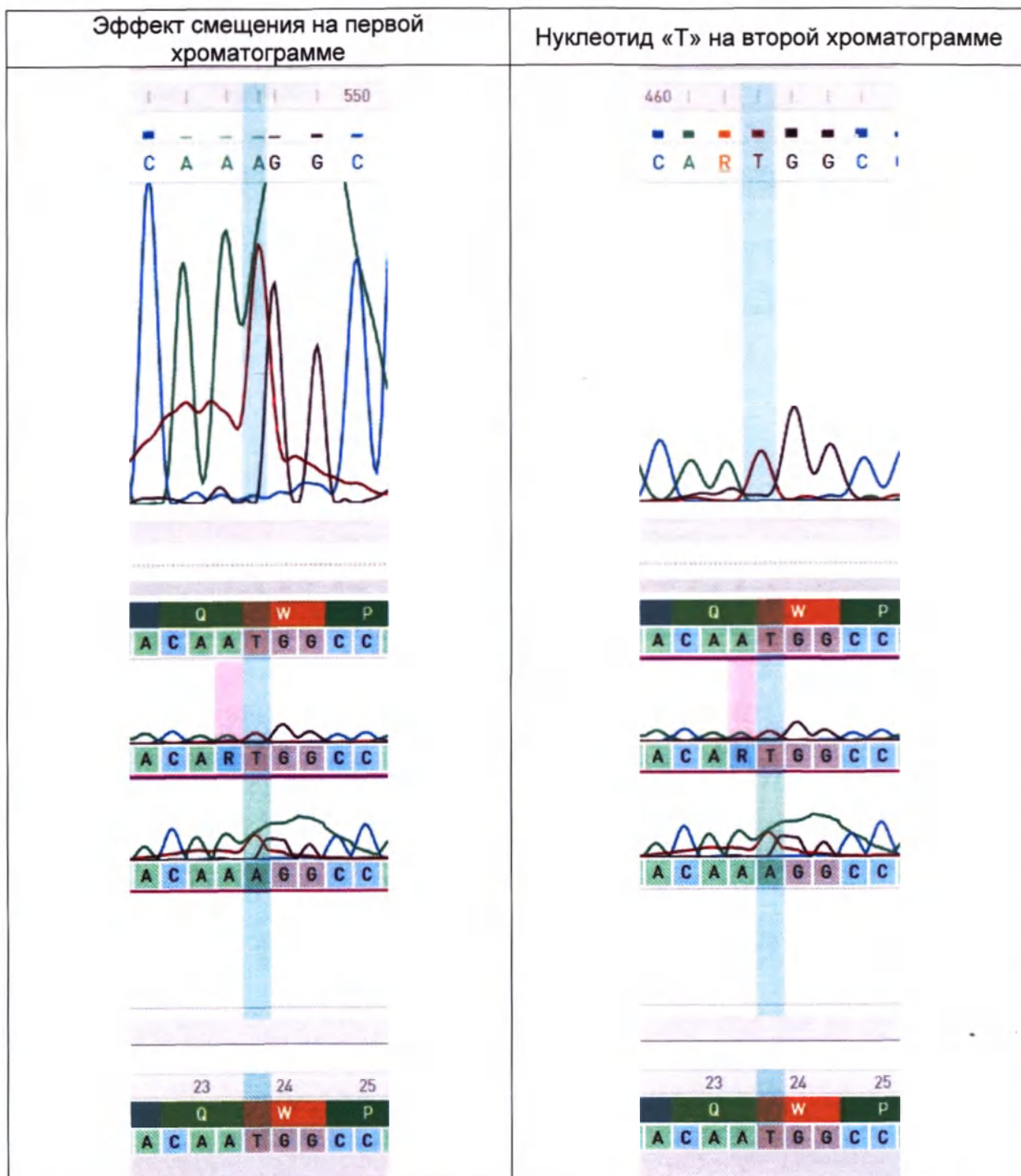
4.3.2.1 Контроль качества исследования

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).

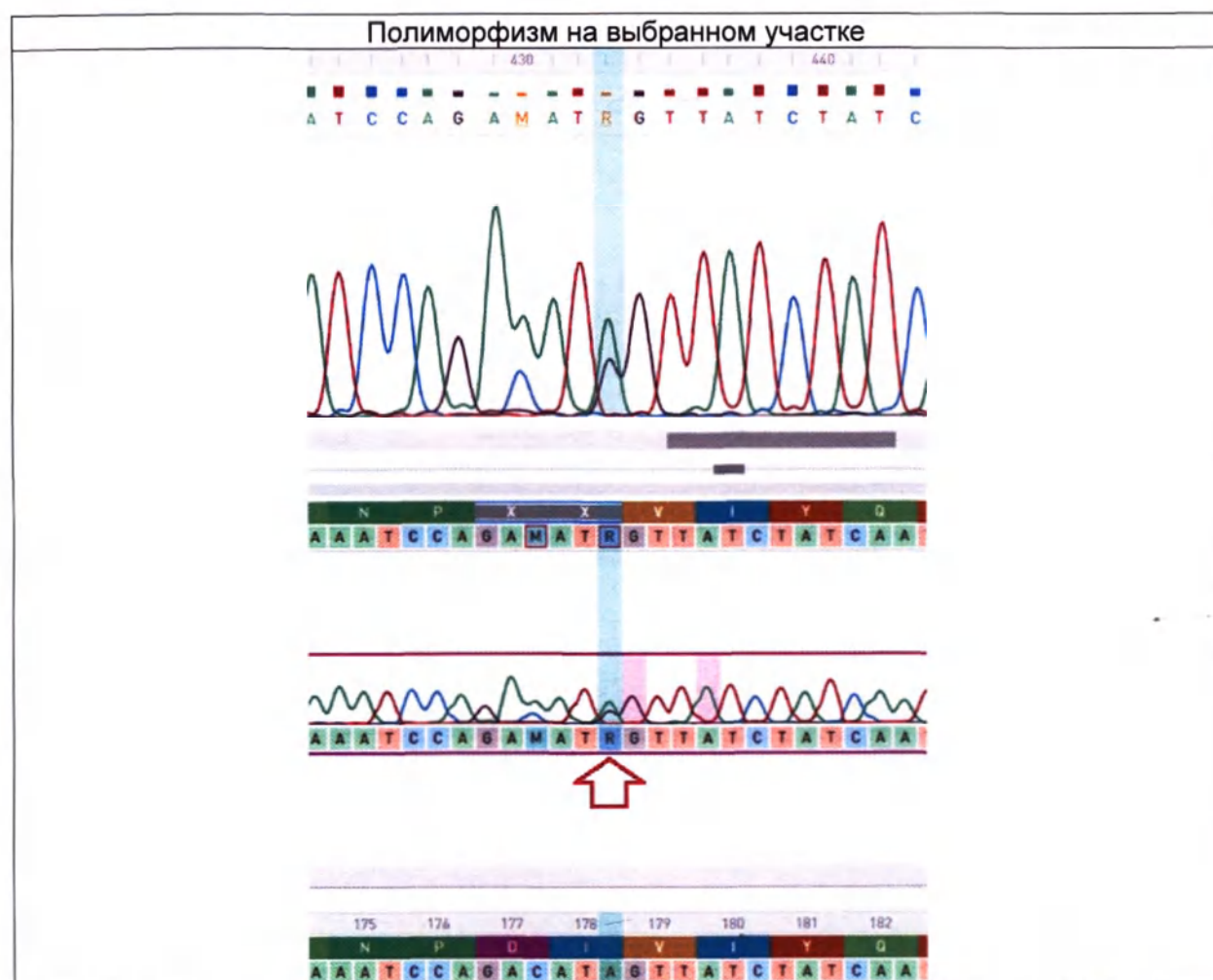
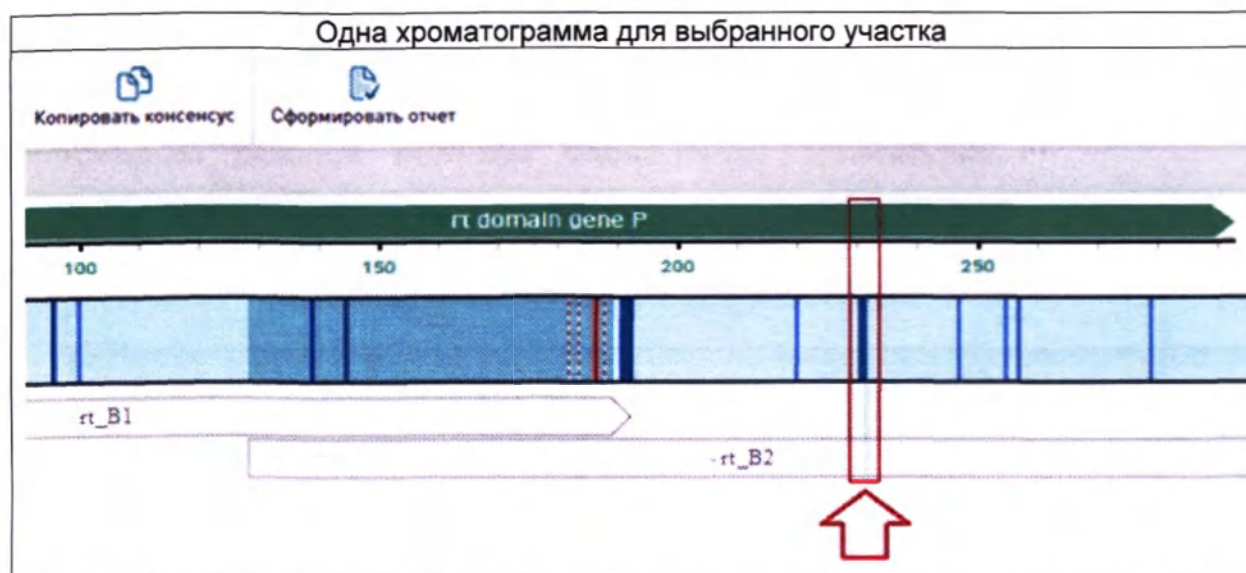
Если на таком участке могут быть мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью, то необходимо провести повторное секвенирование или создать новый проект с загрузкой недостающих прочтений (см. примеры ниже).



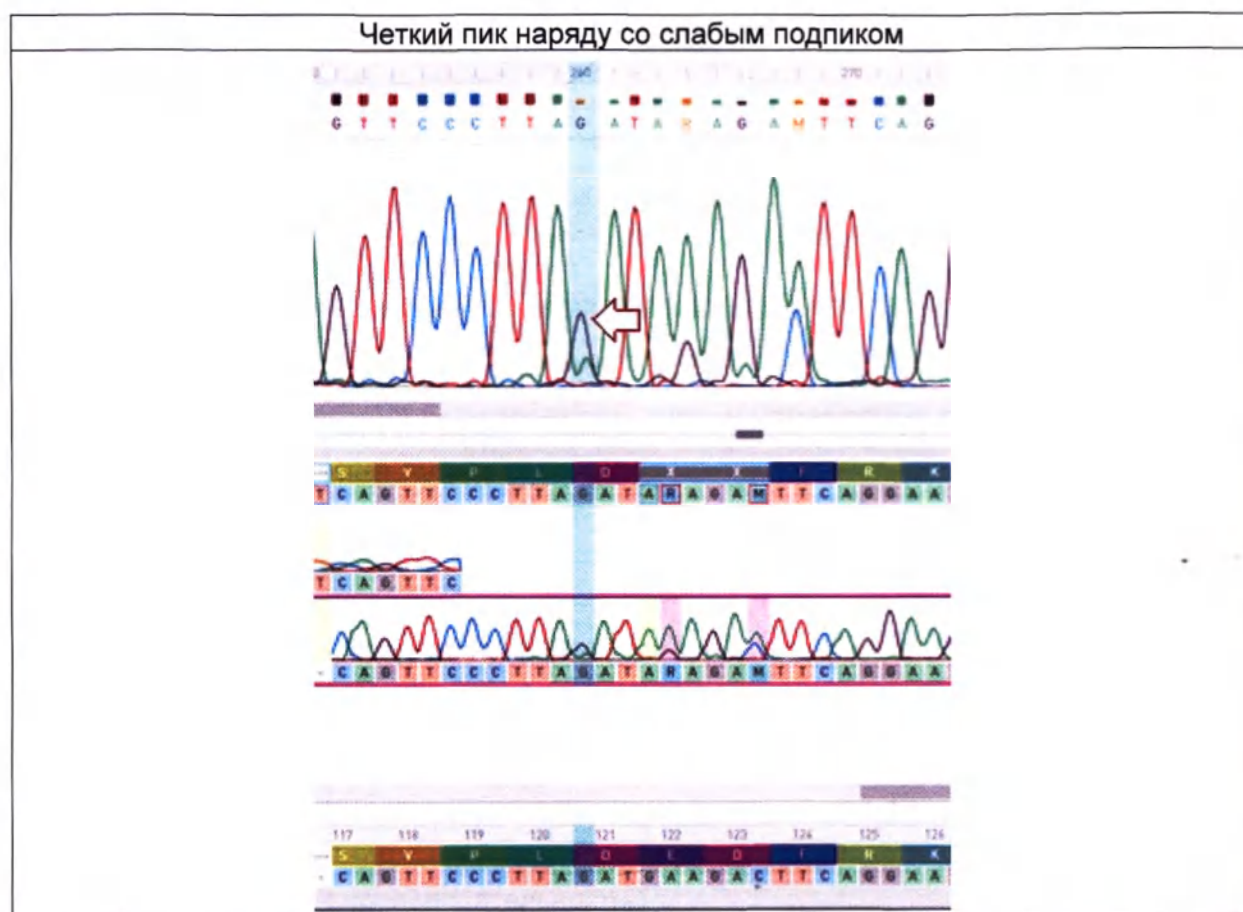
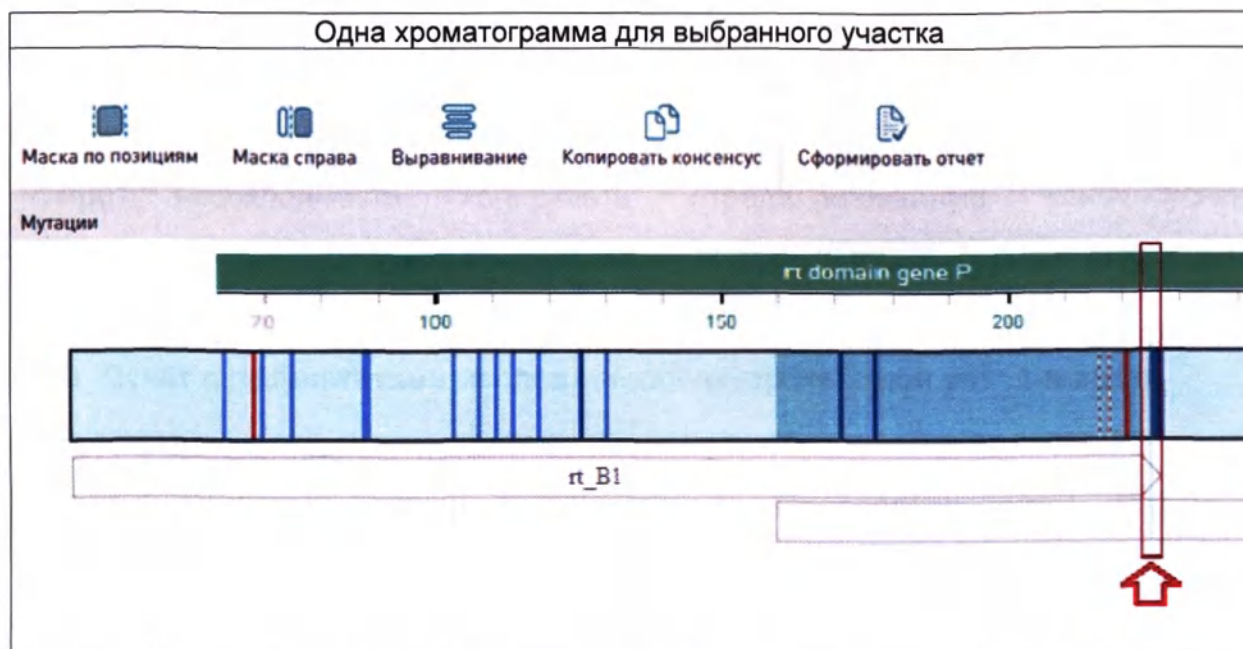
- Если на одной из хроматограмм присутствует только основной пик, а на другой наряду с основным пиком присутствует сильный подпик, то в консенсусной последовательности оставьте полиморфизм.
- Если на одной из хроматограмм присутствует только основной пик, а на другой наряду с основным пиком присутствует 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.



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



- 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.



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).

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

4.3.3.1 Формирование отчета

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 двух вариантах:

- **Краткий отчет** - содержит описание выявленной лекарственной устойчивости возбудителя + список мутаций.
- **Расширенный отчет** - содержит описание выявленной лекарственной устойчивости возбудителя + список мутаций + генотип возбудителя + контроль качества исследования.

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.

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, выявленных мутаций, генотипа возбудителя 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 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 наличия типа препарата	Выводится название препарата	Возможные значения: - Чувствителен - Возможно возникновение устойчивости - Высокий уровень устойчивости

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

Таблица 12

Название анализируемого участка	
Основные мутации	Перечень обнаруженных мутаций, через «,» или «не обнаружено»
Другие мутации	Перечень обнаруженных мутаций, через «,» или «не обнаружено»

По анализируемому участку генома выводится информация о генотипе возбудителя и результатах контроля качества исследования (см. табл. 13):

Название анализируемого участка	
Генотип	Указывается обозначение генотипа
Субтип	Указывается обозначение субтипа
Идентичность, %	Указывается процент соответствия нуклеотидной последовательности вируса генотипу и субтипу
Наименование проблем в качестве консенсуса	Номер кодона
Стоп-кодона	Указываются номера позиций аминокислот, в которых обнаружены стоп-кодона
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
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	При создании проекта загружаемые файлы не соответствуют выбранному профилю или в	Загрузить недостающие файлы прочтений или произвести секвенирование заново

Сообщение	Причина сообщения	Дальнейшие действия оператора
для обработки, либо загружены файлы, не соответствующие данному профилю	загружаемых прочтениях имеются некачественные секции, не позволяющие провести исследование	
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)
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
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.
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.

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

Руководитель службы регистрации медицинских изделий
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
(Доверенность № 178/21 от 16.11.2021 г.)



20.11.21 г.

А.О.Лисицына

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

