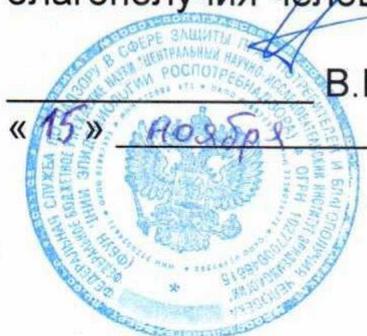


УТВЕРЖДАЮ

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

В.Г. Акимкин
«15» ноября 2017 г.

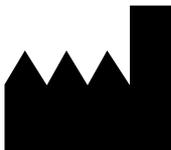


ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для диагностики in vitro

АмплиСенс® HBV-Resist-Seq

АмплиСенс®



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

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ФОРМЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	4
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	8
ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	10
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	13
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	16
ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА И ОГРАНИЧЕНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ПРОБ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	20
СОСТАВ	21
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	23
ПРОВЕДЕНИЕ АМПЛИФИКАЦИИ	23
А. Подготовка пробирок для амплификации	23
Б. Проведение амплификации	25
ОЧИСТКА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ	26
Очистка продуктов амплификации при использовании комплекта реагентов «АмплиСенс® Ампли-сорб»	26
ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ И ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ ОЧИЩЕННЫХ ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАРКЕРА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС ИЗ «КОМПЛЕКТА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К СЕКВЕНИРОВАНИЮ»	27
А. Электрофоретическая детекция	28
Б. Учет результатов	29
В. Оценка концентрации ДНК в исследуемых образцах	31
ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИИ ЦИКЛИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ	33
А. Подготовка пробирок для проведения реакции секвенирования	34
Б. Проведение реакции секвенирования	37
ОЧИСТКА ОТ НЕВКЛЮЧИВШИХСЯ ТЕРМИНАТОРОВ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ДЕНАТУРАЦИЯ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ	37
А. Очистка продуктов реакции секвенирования от невключившихся терминаторов с использованием раствора F из «Комплекта для подготовки к секвенированию <i>HBV/ Res</i> »	38
Б. Предварительная денатурация очищенных продуктов реакции секвенирования с использованием раствора для денатурации из «Комплекта для подготовки к секвенированию <i>HBV/ Res</i> »	39
АВТОМАТИЧЕСКАЯ ДЕТЕКЦИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРА ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ	40
АНАЛИЗ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	40
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	44
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	44
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	46

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	- комплиментарная ДНК, полученная в ходе реакции обратной транскрипции
К-	- отрицательный контроль ПЦР
К+	- положительный контроль ПЦР
МЕ	- международные единицы
ОК	- отрицательный контроль экстракции
ПВП	- противовирусные препараты
ПВТ	- противовирусная терапия
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
п.н.	- пара нуклеотидов
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
<i>HBV</i>	- 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 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).

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

Комплект программного обеспечения «ДЕОНА», предназначенный для выявления мутаций устойчивости в ревертазном (RT) домене Р-гена вируса гепатита В (HBV) к противовирусным препаратам и клинической интерпретации результатов, входит в набор 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.), комплект программного обеспечения «ДЕОНА».

Форма 2 включает комплекты реагентов «ПЦР-комплект» вариант 100, «АмплиСенс[®] Ампли-сорб» вариант 50, «ЭФ» вариант 200, «Комплект для подготовки к секвенированию *HBV/Res*», комплект программного обеспечения «ДЕОНА».

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» (РУ № 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 независимых 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 экстракции из 5 образцов панели HBVDR12 (QCMD, Великобритания) (на этапе клинических испытаний),
- 3 независимых 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

Тип образцов	Результаты применения набора реагентов «АмплиСенс® HBV-Resist-Seq»	Результаты применения методов (препаратов) сравнения ⁵	
		Положительных ⁶	Отрицательных ⁷
Плазма крови	Всего исследовано 160 образцов		
	положительных⁶	22	0
	отрицательных⁷	0	138

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*.

Форма 1: **REF** TM-V5-F-1; **REF** S-2221-5; Форма 2: **REF** M-V5-F-2; **REF** S-2222-5 / **VER**:

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).

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*

Тип образцов	Диагностическая чувствительность ⁸ (с доверительной вероятностью 90%), в интервале (%)	Диагностическая специфичность ⁹ , (с доверительной вероятностью 90%), в интервале (%)
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).

Таблица 8

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

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

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

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*.

RT_184	ACT									
RT_194	GCT									
RT_202	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									

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реагенты, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции (зона 1), продолжать в Зонах Амплификации (зона 2) и Детекции (зона 3). Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в Зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в ЗОНЕ 1 (экстракция нуклеиновых кислот) и ЗОНЕ 2 (приготовление реакционных смесей и проведение ПЦР).

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, включая буфер и гели, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

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

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹³. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- При работе с включенным трансиллюминатором пользоваться защитным экраном или защитной маской.
- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 мин.
- Набор реагентов предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Набор реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению.
- К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики

¹³ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).

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

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

- При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности набор безопасен.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.
- Аллергическая реакция отсутствует.

Листы безопасности материалов (MSDS – material safety data sheet) доступны по запросу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

ЗОНА 1.

Экстракция ДНК из исследуемых образцов

1. Комплект реагентов для экстракции ДНК/РНК - «РИБО-преп» (РУ № ФСР 2008/03147).
2. Дополнительные материалы и оборудование для экстракции ДНК – согласно инструкции к комплекту реагентов для экстракции ДНК/РНК.

ЗОНА 2.

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, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 и до 200 мкл (например, Axygen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США)..
5. Штативы для наконечников и пробирок объемом 0,2 (0,5) мл (в зависимости от типа используемых пробирок) (например, Axygen, 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 (Axygen 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, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
12. Емкость для сброса наконечников.

ЗОНА 3.

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

13. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся 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, MiniSpin, (Eppendorf Manufacturing Corporation, («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия).
19. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия).
20. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (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 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
24. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
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, Ахуген, Inc., («Эксиджен, Инк»), США).
- 28.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100 мкл (например, Ахуген, 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, Ахуген, Inc., («Эксиджен, Инк»), США)
- 34.Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, 200 и до 1000 мкл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США).
- 35.Штативы для пробирок объемом 0,5 мл и наконечников (например, Ахуген, 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, США).
40. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия).
41. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
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, Axugen, Inc., («Эксиджен, Инк»), США).
44. Штатив для пробирок объемом 0,2 мл и наконечников (например, Axugen, 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, с установленной операционной системой Microsoft® Windows XP™ (RUS) и выше, выход в сеть Internet.

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 СП 1.3.2322-08.

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 СП 1.3.2322-08.

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/Res</i>	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/Res</i>	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 синего 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).

Комплект программного обеспечения «ДЕОНА» (АО «РМБит», Россия), предназначенный для выявления мутаций устойчивости в ревертазном (RT) домене Р-гена вируса гепатита В (*HBV*) к противовирусным препаратам и клинической интерпретации результатов, **включает:**

1. Инсталляционный носитель информации.
2. Руководство пользователя.
3. Инструкцию по установке.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

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

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 2 – 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 **2,5x ПЦР-буфером blue**, осадить капли на вортексе.
2. В отдельной пробирке приготовить реакционную смесь. Смешать необходимое количество **ПЦР-смеси-1-**

HBV / Res, 2,5x ПЦР-буфера blue и полимеразы (TaqF)
согласно табл. 9, осадить капли с крышки пробирки.

Таблица 9

Схема приготовления реакционных смесей

Объем реагента на одну реакцию, мкл		Объем реагентов на указанное количество реакций, мкл		
		5,0	10,0	0,5
Число биологических образцов	Число реакций ¹⁴	ПЦР-смесь-1- HBV / Res ¹⁵	2,5x ПЦР-буфер blue ¹⁵	Полимераза (TaqF) 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 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.

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.

9. Поставить контрольные реакции:
- отрицательный контроль экстракции (ОК)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл пробы**, выделенной из **ОКО**.
 - отрицательный контроль ПЦР (К–)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К–**.
 - положительный контроль ПЦР (К+)** – в пробирку с реакционной смесью внести **10 мкл К+ HBV / Res**.

Б. Проведение амплификации

- Запрограммировать амплификатор для выполнения соответствующей программы амплификации (см. табл. 10).
- 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	

- После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов амплификации (**ЗОНУ 3**). 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.

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

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

ОЧИСТКА ПРОДУКТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

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

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

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°C) прогреть при температуре 60-65 °C до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок объемом 1,5 мл с плотно закрывающимися крышками. Промаркировать пробирки.
3. В промаркированные пробирки раскапать 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 г**.
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 г**.
10. Тщательно удалить надосадочную жидкость и высушить осадок сорбента при открытых крышках пробирок в термостате при температуре **60 °С** в течение **3-5 мин**.
11. Добавить в пробирки **40 мкл 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 г**.
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 °С.

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

(проводится в ЗОНЕ 3 – помещении для детекции

продуктов амплификации)

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

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 H₂O 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 H₂O 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.

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

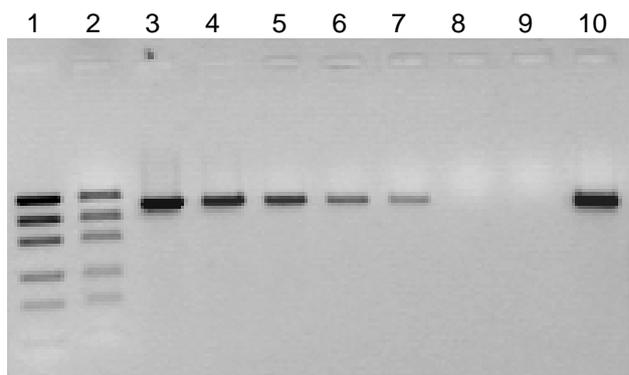
2. После определения примерной концентрации ДНК в каждом образце, необходимо подготовить ПЦР-продукты к секвенированию, доведя концентрацию ДНК с помощью **Н₂О стерильной** до необходимой для проведения реакции секвенирования, согласно рекомендациям, указанным в табл. 13.

ВНИМАНИЕ! В таблице приведены объемы **Н₂О стерильной** для разведения оставшегося объема очищенного ПЦР-продукта (25 мкл). Если количество разводимого ПЦР-продукта не соответствует 25 мкл, объемы **Н₂О стерильной** должны быть пропорционально изменены.

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 (OK)
9. Отрицательный контроль этапа ПЦР (K-)
10. Положительный контроль этапа ПЦР (K+)

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 СЕКВИРОВАНИЯ

(проводится в ЗОНЕ 3 – помещении для детекции продуктов амплификации)

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

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 - «**B1**», «**B2**», «**B3**» 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	5х 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 «В1», «В2», «В3» и «В4», используя **новые** наконечники с фильтрами для внесения образца в пробирки (лунки) с разными реакционными смесями.
6. Закрывать 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

¹⁸ Объемы вносимых реагентов приведены с запасом на 1 образец.

центрифугировать планшеты на центрифуге с ротором для планшет при 2 тыс g в течении 5 с.

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»

<i>Цикл</i>	<i>Температура, °C</i>	<i>Время</i>	<i>Количество циклов</i>
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 3 – помещении для детекции продуктов амплификации)

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

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 невключившихся 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 планшетов и центрифугировать планшет на центрифуге с ротором для планшетов при **2 тыс g** в течении **5 с**.
2. При использовании пробирок перенести их содержимое в 96-луночный планшет и закрыть его специальной септой и держателем. При использовании планшета закрыть его специальной септой и держателем.
3. Поместить планшет в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и запустить выполнение программы (см. табл. 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 3 – помещении для детекции продуктов амплификации)

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

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.

Процедуры сборки консенсус-последовательности, сравнения собранной консенсус-последовательности с референс-последовательностью, выявления мутаций устойчивости вируса гепатита В к противовирусным препаратам и клиническая интерпретация полученных результатов происходит автоматически с использованием программного обеспечения «ДЕОНА» («Профиль Вирус гепатита В») (АО «РМБит», Россия) согласно руководству пользователя к программному обеспечению «ДЕОНА» (АО «РМБит», Россия). Оценка качества и правила редактирования хроматограмм и собранной консенсус-последовательности, критерии валидности результата, а также алгоритм клинической интерпретации результатов, заложенный в ПО «ДЕОНА», приведены в руководстве пользователя к ПО «ДЕОНА» и «Методических рекомендациях по анализу и интерпретации результатов исследования, проведенного с использованием набора реагентов для диагностики *in vitro* АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq* для выявления мутаций устойчивости вируса гепатита В (*HBV*) к противовирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации.

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

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. Список известных мутаций, ассоциированных с возникновением устойчивости к противовирусным препаратам у вируса гепатита В, приведен в «Методических рекомендациях по анализу и интерпретации результатов исследования, проведенного с использованием набора реагентов для выявления мутаций устойчивости вируса гепатита В (*HBV*) к противовирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации АмплиСенс® *HBV-Resist-Seq*.

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»**.

Если в результате проведенного анализа в определенной позиции аминокислотной последовательности одновременно выявлены **мутация N** и аминокислота «дикого типа», то по данной позиции выдается результат **«мутация N обнаружена»**.

Если в результате проведенного анализа в определенной позиции аминокислотной последовательности 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»**.

Если в результате проведенного анализа в определенной позиции аминокислотной последовательности 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;
- менее чем на 90 % идентична референсной последовательности;
- содержит стоп-кодоны;
- содержит вставки и делеции в анализируемой области;
- содержит более двух нетипичных аминокислот.

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»**;

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

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 разукomплектовать 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 ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Предприятие-производитель 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: cs@pcr.ru.¹⁹

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

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

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Максимальное число тестов
	Код партии		Использовать до
	Изделие для in vitro диагностики		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		