ОКП РБ 21.10.60.600 МКС 11.100.10

СОГЛАСОВАНО
Заместитель Министра здравоохранения
Республики Беларусь
_____ И.Г. Лосицкий
«__» _____ 2016г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор Государственного учреждения
«Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»
_____ В.А. Горбунов
«15» 03 2016г.

Тест-система для генотипирования и выявления мутаций резистентности вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) к антиретровирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации **«Бел ВИЧ-1-резистентность-генотип»**

Технические условия
ТУ BY 100558032.336 -2016
(Вводятся впервые)

Срок действия с «31» 03 2016г
до «31» 03 2021г

СОГЛАСОВАНО:
Письмо ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»
№ 16-12-01/9417
«26» 11 2015г.

РАЗРАБОТЧИК:
Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»
Зав.лаб. В.Ф. Еремин
Вед.н.с. Е.Л. Гасич
Н.с. С.В. Сосинович
Мл.н.с. М.В. Домнич
Мл.н.с. А.С. Немира
Мл.н.с. О.Л. Матлах
«15» 07 2015г.

СОГЛАСОВАНО:
Заместитель директора УП "Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении"
_____ С.И. Зинченко
«11» 03 2016г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ
№ 046658 от 31.03.2016

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Настоящие технические условия распространяются на тест-систему для генотипирования и выявления мутаций резистентности вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) к антиретровирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации «Бел ВИЧ-1-резистентность-генотип» далее по тексту «тест-система» предназначенную для определения генотипа ВИЧ первого типа и мутаций резистентности вируса к антиретровирусным препаратам в участке гена *pol*, кодирующем каталитические энзимы вируса: протеазу и 1/3 обратной транскриптазы, методом ПЦР с последующим секвенированием продуктов амплификации. Одна тест-система рассчитана на проведение 48 исследований, включая положительный и отрицательный контроли. Область применения – лабораторная диагностика, вирусологические лаборатории.

Пример записи обозначения: тест-система «Бел ВИЧ-1-резистентность-генотип» по ТУ BY 100558032.336 - 2016.

1. Технические требования

1.1 Основные параметры и характеристики

1.1.1 Тест-система должна соответствовать требованиям настоящих технических условий и изготавливаться по лабораторному регламенту, утвержденному в установленном порядке.

1.1.2 Тест-система должна соответствовать характеристикам и нормам, указанным в таблице 1.

Таблица 1 – Контрольные показатели тест-системы

	Наименование показателя	Характеристика и нормы	Метод контроля
1	ОТ-смесь	бесцветная жидкость	п.4.1
2	Обратная транскриптаза	бесцветная жидкость	-„-
3	Ингибитор РНКаз	бесцветная жидкость	-„-
4	ПЦР-смесь-1	бесцветная жидкость	-„-
5	ПЦР-смесь-2	бесцветная жидкость	-„-
6	ДНК-полимераза	бесцветная жидкость	-„-
7	Положительный контроль, К+	бесцветная жидкость	-„-
8	Отрицательный контроль, К-	бесцветная жидкость	-„-
9	Агароза	порошок белого цвета	-„-
10	Трис-боратный буфер (ТБЕ)	бесцветная жидкость	-„-
11	Загрузочный буфер	синяя жидкость	-„-
12	Бромистый этидий	темно-оранжевая жидкость	
13	Маркер молекулярного веса	синяя жидкость	-„-
14	Чистящий реагент	бесцветная густая жидкость	-„-
15	Секвенс-Микс-А	светло-розовая жидкость	-„-
16	Секвенс-Микс-В	светло-розовая жидкость	-„-
17	Секвенс-Микс-С	светло-розовая жидкость	-„-
18	Секвенс-Микс-D	светло-розовая жидкость	-„-
19	Формамид	бесцветная жидкость	-„-
20	Ацетат натрия	бесцветная жидкость	-„-
21	Этанол 96%	бесцветная жидкость	-„-
22	Этанол 70%	бесцветная жидкость	-„-

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1.2 Комплектность

1.2.1 Тест-система выпускается в комплекте, рассчитанном на проведение 48 исследований

1.2.2 Состав комплекта тест-системы представлен в таблице 2:

Таблица 2 – Состав комплекта тест-системы

№	Наименование компонента	Состав компонента	Объем, мл	Количество
1	«КОНТРОЛЬ»	Положительный контроль, К+	0,1	1 пробирка
		Отрицательный контроль, К-	0,5	1 пробирка
2	«ОТ»	ОТ-смесь	0,38	1 пробирка
		Обратная транскриптаза	0,1	1 пробирка
		Ингибитор РНКаз	0,025	1 пробирка
3	«ПЦР»	ПЦР-смесь-1	1,2	1 пробирка
		ПЦР-смесь-2	1,9	1 пробирка
		ДНК-полимераза	0,02	1 пробирка
4	«ЭФ»	20х Трис-боратный буфер (20хТБЕ)	20,0	2 флакона
		Бромистый этидий	0,05	1 пробирка
		Загрузочный буфер	0,05	1 пробирка
		Маркер молекулярного веса	0,04	1 пробирка
		Агароза	1,7 грамм	4 пакета
5	«ОЧИСТКА ПЦР»	Чистящий реагент	0,1	1 пробирка
6	«СЕКВ»	Секвенс-Микс-А	0,6	1 пробирка
		Секвенс-Микс-В	0,6	1 пробирка
		Секвенс-Микс-С	0,6	1 пробирка
		Секвенс-Микс-D	0,6	1 пробирка
7	«ОЧИСТКА СЕКВ»	Формамид	2,0	2 пробирки
		Ацетат натрия	0,4	1 пробирка
		Этанол 96%	20,0	2 флакона

Таблица 3 – Технические показатели тест-системы

Наименование показателя	Норма	Метод контроля
1. Специфичность тест-системы, не менее %	100	п.4.5.1 п.4.9
2. При проведении ПЦР размер фрагментов ДНК должен быть	1500 нуклеотидных пар	п.4.6.1.5
3. Чувствительность тест-системы не менее %	95	п.4.5.2 п. 4.8

1.3 Требования к сырью и материалам

1.3.1 Сырье и материалы должны соответствовать требованиям ТНПА и иметь документы, подтверждающие качество и безопасность.

1.3.2 Для изготовления применяются следующее сырье и материалы:

вода дистиллированная - ГОСТ 6709, обратная транскриптаза - EP0352 (Thermo Scientific, США), буфер для обратной транскриптазы - EP0352 (Thermo Scientific, США), ингибитор РНКаз - EO0381 (Thermo Scientific, США), дезоксинуклеотидтрифосфаты - R0182 (Thermo Scientific, США), ДНК-полимераза - M0273 (BioLabs, США), буфер для ДНК-полимеразы - M0273 (BioLabs, США), агароза для электрофореза, Трис, борная кислота, ЭДТА, бромистый этидий, загрузочный буфер - R0611 (Thermo Scientific, США), маркер молекулярного веса ДНК -

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

15628-050 (Life Technologies, США), чистящий реагент - 4J94-73 (Abbott Molecular, США), BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit - 4337455 (Life Technologies, США), ацетат натрия 3М pH 4.6, Hi-Di® Formamide - 4311320 (Life Technologies, США), спирт этиловый 96% - ГОСТ 5962-2013, ДНК ВИЧ-1, положительные образцы сыворотки/плазмы крови получены из УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска с вирусной нагрузкой не менее 10000 копий РНК/мл крови, отрицательные образцы сыворотки/плазмы крови – не содержащие антител и РНК ВИЧ-1, получены от здоровых доноров из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, в анамнезе которых отсутствует диагноз ВИЧ-инфекция.

1.4 Упаковка

1.4.1 Жидкие составные компоненты тест-системы должны быть упакованы в полипропиленовые флаконы с завинчивающимися или плотно закрывающимися полипропиленовыми крышками по ТУ BY100626757.001:

- ОТ-смесь во флакон вместимостью 2мл по (0,38±0,01)мл;
- Обратная транскриптаза во флакон вместимостью 0,6мл по (0,1±0,01)мл;
- Ингибитор РНКаз во флакон вместимостью 0,6мл по (0,03±0,01)мл;
- ПЦР-смесь-1 во флакон вместимостью 2мл по (1,2±0,01)мл;
- ПЦР-смесь-2 во флакон вместимостью 2мл по (1,9±0,01)мл;
- ДНК-полимераза во флакон вместимостью 2мл по (0,02±0,005)мл;
- Положительный контроль, К+ во флакон вместимостью 2мл по (0,5±0,01)мл;
- Отрицательный контроль, К- во флакон вместимостью 2мл по (0,5±0,01)мл;
- 20х Трис-боратный буфер (20хТБЕ) во флакон вместимостью 20мл по (20,0±0,50)мл;
- Бромистый этидий во флакон вместимостью 2мл по (0,05±0,005)мл;
- Загрузочный буфер во флакон вместимостью 2мл по (0,05±0,01)мл;
- Маркер молекулярного веса во флакон вместимостью 2мл по (0,034±0,005)мл;
- Чистящий реагент во флакон вместимостью 2мл по (0,1±0,01)мл;
- Секвенс-Микс-А во флакон вместимостью 2мл по (0,6±0,01)мл;
- Секвенс-Микс-В во флакон вместимостью 2мл по (0,6±0,01)мл;
- Секвенс-Микс-С во флакон вместимостью 2мл по (0,6±0,01)мл;
- Секвенс-Микс-D во флакон вместимостью 2мл по (0,6±0,01)мл;
- Формамид во флакон вместимостью 2мл по (2,0±0,01)мл;
- Ацетат натрия во флакон вместимостью 2мл по (0,4±0,01)мл;
- Этанол 96% во флакон вместимостью 20мл по (10,0±0,50)мл.

1.4.2 Агароза должна быть упакована в полиэтиленовый пакет с замком типа zip-lock по (1,7±0,1)г.

1.4.3 Комплекты компонентов тест-системы должны быть упакованы в 10 полиэтиленовых пакетов с замком типа zip-lock:

Компонент №1 «Контроль» упакован в полиэтиленовый пакет размером 8х5см;

Компонент №2 «ОТ» упакован в полиэтиленовый пакет размером 8х5см;

Компонент №3 «ПЦР» упакован в полиэтиленовый пакет размером 8х5см;

Компонент №4 «ЭФ» упакован в полиэтиленовый пакет размером 16,5х10см;

Компонент №5 «АГ» упакован в полиэтиленовый пакет размером 15х9см;

Компонент №6 «ОЧИСТКА ПЦР» упакован в полиэтиленовый пакет размером 8,5х4,5см;

Компонент №7 «СЕКВ» упакован в полиэтиленовый пакет размером 8х5см;

Компонент №8 «ОЧИСТКА СЕКВ» упакован в полиэтиленовый пакет размером 16,5х10см;

Компоненты №1 «Контроль», №2 «ОТ», №3 «ПЦР», №6 «ОЧИСТКА ПЦР» упакованы в полиэтиленовый пакет размером 14,5х9см;

Компоненты №7 «СЕКВ», №8 «ОЧИСТКА СЕКВ» упакованы в полиэтиленовый пакет размером 16х10см.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

1.4.4 Хранение компонентов №1, 2, 3, 6, 7, 8 должно производиться при температуре от -15-25°С; хранение компонентов №4 должно производиться при температуре от 2-8°С; хранение компонентов №5 должно производиться при температуре от 18-25°С.

1.4.5 Восемь полиэтиленовых пакетов с комплектами компонентов тест-системы упакованы в один полиэтиленовый пакет размером 23х20,5см с замком типа zip-lock.

1.4.6 Инструкция пользования тест-системой вкладывается в полиэтиленовый пакет, указанный в п. 1.4.5

1.5 Маркировка.

1.5.1 На каждый флакон должна быть наклеена этикетка из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625) с указанием:

- наименования компонента;
- номинального объема компонента;
- обозначения настоящих ТУ;
- номера серии;
- условий хранения;
- даты изготовления (год-месяц-число);
- срока годности (год-месяц-число).

1.5.2 На каждый полиэтиленовый пакет с замком zip-lock должна быть наклеена этикетка из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625) с указанием:

- наименования компонента;
- состава компонента;
- обозначения настоящих ТУ;
- номера серии;
- даты изготовления (год-месяц-число);
- срока годности (год-месяц-число);
- условий хранения.

1.5.3 На полиэтиленовый пакет размером 23х20,5см с замком zip-lock должна быть наклеена этикетка из бумаги этикеточной (ГОСТ 7625) с указанием:

- назначения тест-системы;
- наименования тест-системы на русском и английском языках;
- номера серии;
- даты изготовления (год-месяц-число);
- срока годности (год-месяц-число);
- обозначения настоящих ТУ;
- адреса и контактов производителя;
- состава компонента;
- условий хранения.

2. Требования безопасности

2.1 Реагенты тест-системы являются неинфекционными.

2.2 В состав компонента тест-системы «ЭФ» входит бромистый этидий, который является сильным мутагеном. При работе с тест-системой необходимо руководствоваться СП 17-129 РБ2000 и использовать хирургические перчатки и медицинские халаты.

2.3 Обращение с браком и отходами производства тест-системы и после ее использования – в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.14-20-2005.

2.4 Лица, участвующие в производстве тест-системы, должны ежегодно проходить медосмотр согласно Постановлению МЗ РБ [1].

2.5 Воздух в рабочей зоне должен отвечать требованиям санитарных норм, правил и гигиенических нормативов в соответствии с [2].

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.6 При работе с тест-системой соблюдать правила работы с микроорганизмами II группы патогенности (ВИЧ-инфекция) в соответствии с [3].

3. Правила приемки

3.1 Каждая серия тест-систем должна быть принята отделом биологического контроля (ОБК) изготовителя и проверена на соответствие всем требованиям настоящих ТУ.

3.2 Серией считается количество тест-систем, полученных в процессе изготовления в одном технологическом процессе, имеющих единый номер серии и оформленным одним документом о качестве (паспортом) с указанием:

- наименования изготовителя и его местонахождения (юридический адрес, включая страну);
- наименования тест-системы;
- номера серии;
- даты выдачи и номера документа о качестве;
- результатов контроля;
- норм показателей;
- даты изготовления (число, месяц, год);
- срока годности (месяцев, лет);
- обозначения настоящих ТУ;
- заключения о соответствии панели требованиям настоящих ТУ;
- штампа ОБК.

3.3 Для осмотра и оценки качества соответствия, упаковки, маркировки и комплектности поставки, а также проведения контроля на соответствие требованиям настоящих ТУ и создания архивных образцов из разных мест серии ОБК составляя выборку, включающую три единицы потребительской тары.

3.4 После проверки качества упаковки, маркировки и комплектности поставки одну единицу потребительской тары используют для контроля на соответствие требованиям настоящих ТУ. Остальные две единицы потребительской тары маркируют на этикетке надписью «Архив» с датой их сбора и хранят в архиве до истечения срока годности.

3.5 При неудовлетворительных результатах контроля хотя бы по одному показателю по нему проводят повторный контроль трех единиц потребительской тары, взятых из той же серии. При неудовлетворительных результатах повторного контроля данная серия бракуется.

4. Методы контроля

4.1 Материалы и оборудование, необходимые для контроля тест-системы:

- исследуемая тест-система «Бел ВИЧ-1 – резистентность-генотип»;
- набор для выделения РНК из плазмы крови любого производителя, разрешенные к применению в РБ;
- исследуемая сыворотка/плазма крови от ВИЧ-инфицированных с вирусной нагрузкой не менее 10000 копий РНК ВИЧ-1/мл;
- исследуемая сыворотка/плазма крови от здоровых доноров;
- ламинарный бокс;
- термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100°С;
- микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16000 об/мин;
- программируемая центрифуга с охлаждением для пробирок типа «Эппендорф» со скоростью вращения не менее 15000g;
- амплификатор с активным терморегулированием, обеспечивающий температуру 4-99°С (любой марки);
- микровстряхиватель для пробирок (любой марки);
- камера для горизонтального электрофореза (любой марки);
- программируемый источник питания (до 400V, любой марки);

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

- система для визуализации гелей;
- трансиллюминатор (любой марки);
- генетический анализатор с системой капиллярного электрофореза;
- персональный компьютер с программным обеспечением и выходом в сеть интернет;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки типа «Эппендорф» различного объема;
- колбы мерные 10мл, 100мл, 1000мл (ГОСТ 1770);
- термостат, обеспечивающий температуру 37°С, любого производителя;
- автоматические пипетки с переменным объемом 0,5-10мкл, 5-100мкл, 20-200мкл, 100-1000мкл, поверенные в установленном порядке;
- полипропиленовые наконечники с фильтрами для автоматических пипеток.

4.2 Упаковка тест-системы и маркировка контролируется визуально.

4.3 Внешний вид компонентов тест-системы контролируют визуально.

4.4 Объем компонентов тест-системы контролируют с помощью автоматических пипеток с переменным объемом от 10 до 1000 мкл, поверенных в установленном порядке.

4.5 Контроль специфичности и чувствительности.

4.5.1 Специфичность тест-системы определяют с использованием 10 образцов сыворотки/плазмы крови, не содержащих антител к ВИЧ-1, полученных от здоровых доноров из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, в анамнезе которых отсутствует диагноз ВИЧ-инфекция.

4.5.2 Чувствительность тест-системы определяют с использованием 10 положительных образцов сыворотки/плазмы крови с определяемой вирусной нагрузкой не менее 10000 копий РНК ВИЧ-1/мл крови, полученных из УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», г. Минск.

4.6 Контроль тест-системы проводят в соответствии с прилагаемой к ней инструкцией, утвержденной в установленном порядке, где в качестве исследуемых образцов используются образцы сыворотки/плазма крови пациентов, у которых определяется РНК ВИЧ-1, а также сыворотки/плазма крови, не содержащие РНК ВИЧ-1.

4.6.1 Проведение контроля:

Контроль тест-системы включает в себя следующие этапы:

1. Выделение РНК ВИЧ;
2. Проведение реакции обратной транскрипции;
3. Первый раунд ПЦР;
4. Второй раунд ПЦР;
5. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации;
6. Очистка продуктов ПЦР;
7. Секвенирующая ПЦР;
8. Очистка преципитацией;
9. Секвенирование нуклеотидных последовательностей;
10. Биоинформационный анализ.

Этап 1.

Выделение РНК ВИЧ. Комплект реагентов для выделения РНК

Выделение РНК ВИЧ из биологического материала проводится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для экстракции РНК (любого производителя).

В дополнение к исследуемым образцам, необходимо использовать отрицательный контроль экстракции РНК (К-) – буфер для элюции или дистиллированную воду.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Этап 2.

Проведение реакции обратной транскрипции. Комплект реагентов – «ОТ»

Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2мл.

Подготовить исследуемые образцы РНК ВИЧ и отрицательный контроль.

Разморозить:

• ОТ-смесь

Извлечь из морозильной камеры:

• обратную транскриптазу

• ингибитор РНКаз

Приготовить ОТ-смесь для исследуемых образцов. Для этого в отдельной пробирке объемом не менее 0,6мл смешать из расчета на 1 исследуемый образец:

ОТ-смесь	7,5×(n+1)мкл
обратная транскриптаза	2×(n+1)мкл
ингибитор РНКаз	0,5×(n+1)мкл

*где n – количество исследуемых образцов

ОТ-смесь необходимо готовить на 1 образец больше. Готовую ОТ-смесь хранить не более 15 мин.

Добавить в промаркированные пробирки объемом 0,2мл по 10мкл приготовленной ОТ-смеси, добавить в каждую пробирку по 10мкл соответствующей РНК ВИЧ, кратко осадить пробирки в течение 2-4 сек.

Поместить пробирки в амплификатор. Программа амплификации для проведения ОТ:

37°С – 60мин

70°С – 10мин

10°С – хранение (не более 1 часа)

Полученная кДНК готова к использованию в 1-м раунде ПЦР.

При невозможности проведения обратной транскрипции РНК может храниться до 24 часов при температуре от +2°С до +8°С и до года при температуре не выше -16°С.

Этап 3.

Первый раунд ПЦР. Комплект реагентов – «ПЦР»

Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2мл.

Начиная с данного этапа, необходимо использовать положительный контроль (К+).

Подготовить исследуемые образцы кДНК ВИЧ и контрольные образцы.

Разморозить необходимые реактивы:

• ПЦР-смесь-1

Извлечь из морозильной камеры:

• ДНК-полимеразу

Приготовить ПЦР-мастер микс из расчета на (n+1) образец. Для этого в отдельной пробирке объемом не менее 0,6мл смешать:

ПЦР-смесь-1	23,88мкл
ДНК-полимераза	0,125мкл

Готовый ПЦР-микс хранить не более 15мин.

Добавить в промаркированные пробирки объемом 0,2мл по 24мкл приготовленного ПЦР-мастер микса.

Добавить в каждую пробирку по 1мкл соответствующей кДНК исследуемых образцов.

Кратко осадите пробирки в течение 2-4 сек.

Поместите пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 25мкл.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Программа амплификации:

95°С	30 сек	
95°С	30 сек	
51°С	30 сек	35 циклов
68°С	90 сек	
68°С	7 мин	
10°С	хранение (не более 24 часов)	

Полученная ДНК готова к использованию во 2-м раунде ПЦР.
Хранить ДНК при температуре не выше -18°С не более 1 недели.

Второй раунд ПЦР. Комплект реагентов – «ПЦР»

Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2мл.
Подготовить исследуемые образцы ДНК ВИЧ и контрольные образцы.
Разморозить необходимые реактивы:
• ПЦР-смесь-2
Извлечь из морозильной камеры:
• ДНК-полимеразу
Приготовить ПЦР-мастер микс из расчета (n+1) образец. Для этого в отдельной пробирке объемом не менее 0,6мл смешать:

ПЦР-смесь-2	37,8мкл
ДНК-полимераза	0,2мкл

ПЦР-мастер микс необходимо готовить из расчета (n+1) образец, готовый ПЦР-микс хранить не более 15 мин.

Добавить в промаркированные пробирки объемом 0,2мл по 48мкл приготовленного ПЦР-мастер микса.

Добавить в каждую пробирку по 2мкл соответствующей ДНК исследуемых и контрольных образцов.

Кратко осадить пробирки в течение 2-4 сек.

Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 40мкл.

Программа амплификации:

95°С	30 сек	
95°С	30 сек	
45°С	30 сек	35 циклов
68°С	90 сек	
68°С	7 мин	
10°С	хранение (не более 24 часов)	

Полученная ДНК готова к электрофоретической детекции.
Хранить ДНК при температуре не выше -18°С не более 1 недели.

Этап 4.

Электрофоретическая детекция продуктов амплификации. Комплект реагентов – «ЭФ»

Приготовление рабочего раствор для электрофореза

В мерный цилиндр добавить 10мл 20х Трис-боратный буфер (20хТБЕ).
Довести объем дистиллированной водой до 400мл.

Приготовление агарозного геля

В термическую колбу высыпать содержимое 1 пакета с агарозой и перемешать.

Добавить 100мл приготовленного рабочего раствора для электрофореза, закрыть колбу крышкой или бумагой (не герметично).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Поместить колбу в микроволновую печь и довести смесь до кипения (800W, 90 секунд).

Извлечь колбу из микроволновой печи, перемешать смесь помешиванием колбы, повторно поместить колбу в микроволновую печь и довести смесь до кипения (800W, 90 секунд).

ВНИМАНИЕ! При извлечении колбы из микроволновой печи использовать термическую рукавицу!

Извлечь колбу из микроволновой печи и охладить до ~60°С.

Добавить в расплавленную агарозу 10мкл бромистого этидия, перемешать помешиванием колбы.

Залить расплавленную агарозу на подложку для геля, вставить гребенку для лунок, оставить на 15-20 минут до полного застывания геля.

После того как гель полностью застыл, аккуратно удалить гребенку и поместить гель в электрофоретическую камеру.

Добавить в электрофоретическую камеру достаточное количество рабочего раствора для электрофореза в камеру для электрофореза, чтобы гель был покрыт слоем буфера около 2-5мм.

Проведение электрофоретической детекции

Поместить исследуемые образцы в штатив.

Смешать отдельным наконечником 5мкл исследуемого образца с 1мкл загрузочного буфера и перенести всю смесь в лунку геля. Повторить для всех исследуемых образцов, включая контроли.

Добавить в свободную лунку геля 5мкл маркера молекулярного веса.

Провести электрофорез (18 мин – 240W, 400mA – 70,0W) и проанализировать полученные результаты, рисунок 1.

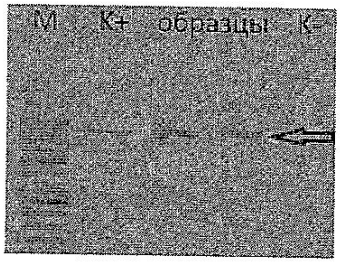


Рисунок 1 – Результаты электрофоретической детекции образцов по участку гена *pol* ВИЧ-1 (М – маркер, К+ - положительный контрольный образец, К- - отрицательный контрольный образец, образцы – исследуемые пробы); размер анализируемого фрагмента 1500п.н.

Для определения мутаций резистентности ВИЧ к препаратам ВААРТ методом секвенирования отбираются положительные образцы, имеющие размер ампликона 1500п.н., которые переносятся в зону 4 для дальнейшей работы.

Этап 5.

Очистка ПЦР-продукта. Комплект реагентов – «ОЧИСТКА ПЦР»

Извлечь из морозильной камеры:

• чистящий реагент

Добавить во все исследуемые образцы по 2мкл чистящего реагента.

Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 37мкл. Программа чистки:

37°С 15 мин

70°С 15 мин

10°С хранение (не более 1 часа)

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Очищенная ДНК готова к использованию в секвенирующей ПЦР.

Хранить ДНК при температуре не выше -18°С не более 1 суток. С подготовленными пробами выполняется секвенирующая ПЦР.

Этап 6.

Секвенирующая ПЦР. Комплект реагентов – «СЕКВ»

Перед постановкой секвенирующей ПЦР необходимо провести разведение ДНК в зависимости от интенсивности полосы на электрофорезе, рисунок 2. Схема разведения ДНК в зависимости от концентрации полученных фрагментов представлена в таблице 5:

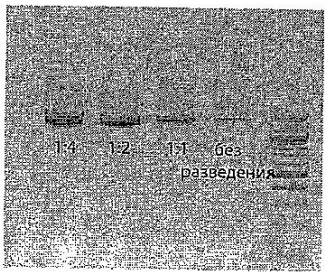


Рисунок 2 – Пример разведения ПЦР-продуктов, содержащих ДНК в разной концентрации

Таблица 5 – Схема разведения ДНК в зависимости от концентрации положительных образцов (рисунок 2)

Разведение ДНК	Образец, мкл	Вода, мкл
без разведения	37	0
1:1	20	20
1:2	15	30
1:4	10	30

Проведение секвенирующей ПЦР

Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2мл.

Для каждого образца необходимо использовать 4 отдельных пробирки с каждым из четырех Секвенс-Миксов.

Разморозить следующие реактивы:

- Секвенс-Микс-А
- Секвенс-Микс-В
- Секвенс-Микс-С
- Секвенс-Микс-D

Для каждого образца необходимо использовать 4 отдельных пробирки с каждым из четырех Секвенс-Миксов.

Добавить в каждую промаркированную пробирку по 12мкл Секвенс-Миксов А, В, С и D.

Добавить по 8мкл разведенной ДНК исследуемого образца в соответствующие пробирки с Секвенс-Миксами А, В, С и D.

Кратко осадить пробирки в течение 2-4 секунд, объем смеси – 20мкл.

Поместить пробирки в амплификатор.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Программа амплификации для секвенирующей ПЦР:

96°C	60 сек	
96°C	10 сек	
50°C	5 сек	35 циклов
60°C	4 мин	
10°C	хранение (не более 24 часов)	

Этап 7.

Чистка ПЦР-продукта после секвенирующей ПЦР. Комплект реагентов – «ОЧИСТКА-СЕКВ»

Перед началом работы необходимо приготовить 70% этанол из расчета 250мкл на 1 образец. Для этого смешать $105 \times (n + 1)$ мкл 96% этанола, входящего в состав набора,

с $45 \times (n + 1)$ мкл дистиллированной воды, где n – количество образцов для чистки после секвенирующей ПЦР.

Хранить при температуре (-15-25°°C) в морозильной камере.

Процедура чистки:

Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5мл.

Приготовить смесь холодного (-15-25°C) 96% этанола и ацетата натрия из расчета (n+2) образец:

этанол 96% - 50мкл

ацетат натрия - 2мкл

Добавить 52мкл смеси этанола и ацетата натрия в маркированные пробирки.

Кратким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок с ПЦР-продуктом после секвенирующей ПЦР.

Перенести весь ПЦР-продукт (20мкл) в пробирки со смесью этанола и ацетата натрия, перемешать на микровстряхивателе.

Центрифугировать пробирки в центрифуге:

обороты в мин: > 12000g, время: 20мин, температура: 4°C

По окончании центрифугирования аккуратно удалить надосадочную жидкость.

Внимание! Осадок может быть невидимым.

Внимание! При удалении надосадочной жидкости следуйте наконечником за поверхностью надосадочной жидкости, прижимая наконечник к стенке пробирки, противоположной осадку.

Добавить в пробирки по 250мкл холодного (-15-25°C) 70% этанола, перемешать на микровстряхивателе.

Центрифугировать пробирки в центрифуге:

обороты в мин: > 12000g, время: 10мин, температура: 18-25°C

По окончании центрифугирования аккуратно удалить надосадочную жидкость.

Внимание! Осадок может быть невидимым.

Внимание! При удалении надосадочной жидкости следуйте наконечником за поверхностью надосадочной жидкости, прижимая наконечник к стенке пробирки, противоположной осадку.

Высушить осадок при 95°C в течение 2мин. Крышки пробирок должны быть открыты.

Добавить в пробирки по 20мкл формамида, перемешать на микровстряхивателе, кратким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

Прогреть пробирки при 95°C в течение 2мин.

Пробы готовы для загрузки в генетический анализатор.

Хранить образцы при температуре -20°C не более одной недели.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Этап 8.

Секвенирование.

Для секвенирования нуклеотидных последовательностей исследуемых образцов необходимо использовать генетический анализатор (секвенатор) в соответствии с инструкцией к прибору. В процессе работы секвенатора проводится автоматическая детекция нуклеотидных последовательностей продуктов реакции секвенирования.

Этап 9.

Биоинформационный анализ

Для получения нуклеотидной последовательности одного исследуемого образца необходимо собрать контиг из четырех соответствующих электрофореграмм для каждого из образцов.

Этап 10.

Генотипирование исследуемого образца

Для установления субтипа вируса необходимо воспользоваться онлайн-утилитой **REGA HIV-1 & 2 Automated Subtyping Tool (Version 2.0)** для генотипирования ВИЧ. В интернет-браузере необходимо перейти по ссылке: http://bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghiv.html и вставить последовательность нуклеотидов в поле «Enter here your input data as FASTA format» в fasta формате. Нажать кнопку «Run».

ВНИМАНИЕ! Fasta формат имеет следующий вид:

>sequence_ID

agtcagtcagtcagtc…,

где sequence_ID – имя (или номер) исследуемого образца

agtcagtcagtcagtc… – последовательность нуклеотидов исследуемого образца

Программа выдаст результат с указанием генотипа исследуемого образца.

Этап 11.

Выявление мутаций резистентности в исследуемом образце

Для выявления мутаций резистентности ВИЧ у исследуемого образца к антиретровирусным препаратам необходимо воспользоваться онлайн-утилитой **HIVdb Program: Sequence Analysis** для выявления мутаций резистентности ВИЧ.

В интернет-браузере необходимо перейти по ссылке: http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra?action=sequenceInput и вставить последовательность нуклеотидов в поле «Text Input» в fasta формате или просто буквенную последовательность нуклеотидов. Нажать кнопку «Analyze».

Программа выдаст результат в виде списка основных антиретровирусных препаратов, применяемых при терапии ВИЧ-инфекции, и чувствительность исследуемого образца к каждому из препаратов.

4.7 Учет результатов.

4.7.1 Положительные образцы имеют размер полученной нуклеотидной последовательности 1500 п.н. участка гена *pol* ВИЧ-1.

4.8 Определение чувствительности.

Чувствительности тест-системы определяется по формуле (1):

$$Ч = \frac{ПР}{ЗПО} \times 100 \qquad (1)$$

где

Ч - чувствительность, %;

ПР - количества нуклеотидных последовательностей, полученных при использовании тест-системы;

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЗПО - общее количество заведомо положительных образцов, взятых в работу.

4.9 Определение специфичности.

Специфичность тест-системы определяется по формуле (2):

$$C = \frac{ОР}{ЗОО} \times 100 \qquad (2)$$

где

С -специфичность, %;

ОР – количество отрицательных результатов, полученных при использовании тест-системы;

ЗОО - общее количество заведомо отрицательных образцов, взятых в работу.

5. Транспортирование и хранение

5.1 Транспортирование компонентов тест-системы должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре, указанной на этикетке к компонентам тест-системы.

5.2 Хранение реагентов «ОТ», «ПЦР», «КОНТРОЛЬ», «ОЧИСТКА ПЦР», «СЕКВ», «ОЧИСТКА СЕКВ», должно производиться при температуре от -15-25°С.

5.3 Хранение реагентов «ЭФ» должно производиться при температуре от 2-8°С.

5.4 Хранение «АГ» должно производиться при температуре от 18-25 °С.

5.5 Хранение всех реагентов тест-системы должно производиться при температуре, указанной на этикетках к этим реагентам, на протяжении всего срока годности.

6. Указания по применению

6.1 Тест-система должна применяться согласно инструкции по применению, утвержденной в установленном порядке.

7. Гарантии изготовителя

7.1 Изготовитель гарантирует соответствие тест-системы требованиям настоящих ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения, установленных настоящим ТУ.

7.2 Срок годности тест-системы – 6 месяцев с даты изготовления. Датой изготовления считается дата приемки ОБК изготовителя.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ПРИЛОЖЕНИЕ А
(Обязательное)

ПЕРЕЧЕНЬ ССЫЛОЧНЫХ ТЕХНИЧЕСКИХ НОРМАТИВНЫХ ПРАВОВЫХ АКТОВ

Таблица А.1

Обозначения ТНПА	Номер раздела, пункта, в котором дана ссылка
ГОСТ 6709-72	п. 1.3.2
ГОСТ 5962-2013	п. 1.3.2
ТУ BY100626757.001-2003	п. 1.4.1
ГОСТ 7625	п. 1.5.1, п.1.5.2, п.1.5.3
СП 17-129 РБ2000	п. 2.2
СанПиН 2.1.7.14-20-2005	п. 2.3
ГОСТ 1770-74	п. 4.1

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Приложение Б

(Справочное)

[1] Постановление МЗ РБ №47 28.04.2010 г. «Инструкция о порядке проведения обязательных медицинских осмотров работающих».

[2] Постановление МЗ РБ №240 31.12.2008 г. Об утверждении санитарных норм, правил и гигиенических нормативов "Перечень регламентированных в воздухе рабочей зоны вредных веществ".

[3] Приказ Минздрава РБ №351 от 16.12.1998 г. О пересмотре ведомственных нормативных актов, регламентирующих вопросы по проблеме ВИЧ/СПИД.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

ЛИСТ РЕГИСТРАЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ

Номер изменения	Номер листа (страницы)				Номер документа	Подпись	Дата внесения изменения	Дата введения изменения
	Измененного	Замененного	Нового	Аннулированного				

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru