МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач государственного учреждения
«Республиканский центр гигиены,
эпидемиологии и общественного здоровья»
_____ А.Л. Скуранович
«15» ____11____ 2024 г.

Инструкция по применению
Тест-системы 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»

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

ИНСТРУКЦИЯ

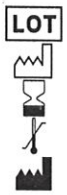
по применению тест-системы для генотипирования и выявления мутаций резистентности вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) к антиретровирусным препаратам в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием продуктов амплификации

«Бел ВИЧ-1-резистентность-генотип»

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ	- вирус иммунодефицита человека
ВИЧ-1	- вирус иммунодефицита человека первого типа
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ОТ	- обратная транскрипция
кДНК	- комплементарная ДНК
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
п.н.	- пар нуклеотидов
РНК	- рибонуклеиновая кислота
К+	- положительный контроль
К-	- отрицательный контроль

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ



- серия
- дата изготовления (год-месяц-день)
- срок годности (год-месяц-день)
- условия хранения
- производитель

НАЗНАЧЕНИЕ

Тест-система «Бел ВИЧ-1-резистентность-генотип» предназначена 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. Для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ в участке гена *pol* ВИЧ-1 данный набор реагентов «Бел ВИЧ-1-резистентность-генотип» рекомендуется использовать, если концентрация РНК ВИЧ в плазме крови 10000 копий/мл. Также возможно использование исследуемых образцов с концентрацией вируса менее 10000 копий/мл при увеличении объема пробы для экстракции до 0,5-1мл. Чувствительность тест-системы 97%, специфичность 100%.

Последующий анализ исследуемых последовательностей выявляет мутации резистентности к антиретровирусным препаратам следующих групп:

- ингибиторы протеазы;
- нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы;
- ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы.

Тест-система рассчитана на исследование 48 образцов, включая положительный (К+) и отрицательный (К-) контрольные образцы.

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

Тест-система предназначена для проведения не более 4-х серий исследований.

ВНИМАНИЕ! Тест-система рекомендована для проведения исследования с использованием генетических анализаторов компании Applied Biosystems (США).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение мутаций резистентности ВИЧ к антиретровирусным препаратам с помощью тест-системы «Бел ВИЧ-1-резистентность-генотип» 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 и интерпретация результатов.

Таблица 1 – 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
5	«АГ»	Агароза	1,7 грамм	4 пакета
6	«ОЧИСТКА ПЦР»	Чистящий реагент	0,1	1 пробирка
7	«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
8	«ОЧИСТКА СЕКВ»	Формамид	2,0	2 пробирки
		Ацетат натрия	0,4	1 пробирка
		Этанол 96%	20,0	2 флакона

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Все перечисленные ниже материалы и оборудование могут быть от любого производителя.

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

ЗОНА 1. Экстракция РНК ВИЧ

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

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

ЗОНА 2. Проведение реакции обратной транскрипции, ПЦР и секвенирующей ПЦР

1. Одноразовые пробирки для ПЦР с плоской крышкой объемом 0,2 мл;
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10, 20, 100 и/или 200мкл;
3. Дозаторы переменного объема;
4. Штативы для наконечников и пробирок объемом 0,2мл;
5. ПЦР-бокс;
6. Программируемый амплификатор с активным терморегулированием для пробирок объемом 0,2мл
7. Морозильная камера от -25 до -15°С

ЗОНА 3. Электрофоретическая детекция продуктов ПЦР-амплификации и секвенирование

1. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 0,5л;
2. Источник постоянного тока с регулируемым напряжением в диапазоне 150-450V;
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор;
4. Видеосистема регистрации гелей;
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 10 и 20мкл;
6. Дозаторы переменного объема;
7. Микроволновая печь для плавления агарозы;
8. Термостойкая колба объемом 200-250мл;
9. Мерный цилиндр объемом 1л;
10. Термическая рукавица.

ЗОНА 4. Очистка продуктов амплификации после ПЦР и секвенирующей ПЦР

1. Одноразовые пробирки типа Эппендорф объемом 1,5мл;
2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром объемом 20, 100 (или 200)мкл и 1мл;
3. Дозаторы переменного объема;
4. ПЦР-бокс;
5. Программируемая центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с активным охлаждением до 4°С и максимальной скоростью центрифугирования не менее 12000g;
6. Холодильник бытовой с морозильной камерой;
7. Микровстряхиватель для пробирок;
8. Термостат для пробирок типа Эппендорф с диапазоном температур от +25-95°С;
9. Программируемый амплификатор с активным терморегулированием для пробирок объемом 0,2мл.

ЧИСТАЯ ЗОНА. Биоинформационный анализ

1. Персональный компьютер с выходом в интернет с установленным программным обеспечением для анализа данных.

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

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внимание! Отрицательный контрольный образец (К-) должен проходить этапы 1-5 включительно, вместе с исследуемыми образцами. Положительный контрольный образец (К+) используется в этапах 3-5 включительно.

Этап 1. Выделение РНК ВИЧ из биологического материала

Зона 1

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-)

Этап 2. Обратная транскрипция

Зона 2 Набор реагентов – «ОТ», «КОНТРОЛЬ»

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

Внимание! Во время работы все реактивы и исследуемые образцы должны храниться на льду (используйте хладоэлементы).

<table>
<tr><td>1</td><td>Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2мл.</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Подготовить исследуемые образцы РНК ВИЧ и отрицательный контроль (К-).
Разморозить необходимые реактивы:
• ОТ-смесь
Извлечь из морозильной камеры:
• обратную транскриптазу
• ингибитор РНКаз</td></tr>
<tr><td>3</td><td>Приготовить ОТ-смесь для исследуемых образцов. Для этого в отдельной пробирке объемом не менее 0,6мл смешать:
<table>
<tr><th>Компонент</th><th>1 образец, мкл</th><th>12 образцов, мкл</th></tr>
<tr><td>ОТ-смесь</td><td>7,5</td><td>97,5</td></tr>
<tr><td>обратная транскриптаза</td><td>2</td><td>26</td></tr>
<tr><td>ингибитор РНКаз</td><td>0,5</td><td>13</td></tr>
</table>
Внимание! При исследовании количества образцов, отличного от 12, ОТ-смесь необходимо готовить из расчета на (n+1) образец.
Внимание! Готовую ОТ-смесь хранить не более 15мин.</td></tr>
<tr><td>4</td><td>Добавить в промаркированные пробирки объемом 0,2мл по 10мкл приготовленной ОТ-смеси.</td></tr>
<tr><td>5</td><td>Добавить в каждую пробирку по 10мкл соответствующего исследуемого образца.
Кратко осадить пробирки в течение 2-4 сек.</td></tr>
<tr><td>6</td><td>Поместить пробирки в амплификатор. Программа амплификации для проведения ОТ:</td></tr>
</table>

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

	37°С – 60мин 70°С – 10мин 10°С – хранение (не более 1 часа)
7	Полученная кДНК готова к использованию в 1-м раунде ПЦР. Хранить кДНК при температуре не выше -18°С не более 1 недели.

Этап 3. Первый раунд ПЦР

Зона 2 Набор реагентов – «ПЦР», «КОНТРОЛЬ»

Внимание! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Внимание! Во время работы все реактивы и кДНК должны храниться на льду (используйте хладоэлементы).

<table>
<tr><td>1</td><td>Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2мл.</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Подготовить исследуемые образцы РНК ВИЧ и отрицательный контроль (К-).
Разморозить необходимые реактивы:
• ПЦР-смесь-1
Извлечь из морозильной камеры:
• ДНК-полимеразу
Внимание! Начиная с данного этапа, необходимо использовать положительный контроль (К+).</td></tr>
<tr><td>3</td><td>Приготовить ПЦР-смесь для исследуемых образцов. Для этого в отдельной пробирке объемом не менее 0,6мл смешать:
<table>
<tr><th>Компонент</th><th>1 образец, мкл</th><th>12 образцов, мкл</th></tr>
<tr><td>ПЦР-смесь-1</td><td>23,88</td><td>310,4</td></tr>
<tr><td>ДНК-полимераза</td><td>0,125</td><td>1,6</td></tr>
</table>
Внимание! При исследовании количества образцов, отличного от 12, ПЦР-смесь необходимо готовить из расчета на (n+1) образец.
Внимание! Готовую ПЦР-смесь хранить не более 15 мин.</td></tr>
<tr><td>4</td><td>Добавить в промаркированные пробирки объемом 0,2мл по 24мкл приготовленной ПЦР-смеси.</td></tr>
<tr><td>5</td><td>Добавить в каждую пробирку по 1мкл соответствующей кДНК исследуемых образцов.
Кратко осадить пробирки в течение 2-4 сек.</td></tr>
<tr><td>6</td><td>Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 25мкл.
Программа амплификации:
<table>
<tr><td>95°С</td><td>30 сек</td><td></td></tr>
<tr><td>95°С
51°С
68°С</td><td>30 сек
30 сек
90 сек</td><td>35 циклов</td></tr>
<tr><td>68°С</td><td>7 мин</td><td></td></tr>
<tr><td>10°С</td><td colspan="2">хранение (не более 24 часов)</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>7</td><td>Полученная ДНК готова к использованию во 2-м раунде ПЦР.
Хранить ДНК при температуре не выше -18°С не более 1 недели.</td></tr>
</table>

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

Этап 4. Второй раунд ПЦР

Зона 2 Набор реагентов – «ПЦР»

Внимание! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Внимание! Во время работы все реактивы и кДНК должны храниться на льду (используйте хладоэлементы).

<table>
<tr><td>1</td><td>Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2мл</td></tr>
<tr><td>2</td><td>Подготовить исследуемые образцы ДНК ВИЧ и контрольные образцы после первого раунда ПЦР.
Разморозить необходимые реактивы:
• ПЦР-смесь-2
Извлечь из морозильной камеры:
• ДНК-полимеразу</td></tr>
<tr><td>3</td><td>Приготовить ПЦР-смесь для исследуемых образцов. Для этого в отдельной пробирке объемом не менее 0.6 мл смешать:
<table>
<tr><th>Компонент</th><th>1 образец, мкл</th><th>12 образцов, мкл</th></tr>
<tr><td>ПЦР-смесь-2</td><td>37,8</td><td>491,4</td></tr>
<tr><td>ДНК-полимераза</td><td>0,2</td><td>2,6</td></tr>
</table>
Внимание! При исследовании количества образцов, отличного от 12, ПЦР-смесь необходимо готовить из расчета на (n+1) образец.
Внимание! Готовую ПЦР-смесь хранить не более 15мин.</td></tr>
<tr><td>4</td><td>Добавить в промаркированные пробирки объемом 0,2мл по 38мкл приготовленной ПЦР-смеси.</td></tr>
<tr><td>5</td><td>Добавить в каждую пробирку по 2мкл соответствующей ДНК ВИЧ.
Кратко осадить пробирки в течение 2-4 сек.</td></tr>
<tr><td>6</td><td>Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 40мкл. Программа амплификации:
<table>
<tr><td>95°C</td><td>30сек</td><td></td></tr>
<tr><td>95°C
45°C
68°C</td><td>30сек
30сек
90сек</td><td>35 циклов</td></tr>
<tr><td>68°C</td><td>7мин</td><td></td></tr>
<tr><td>10°C</td><td colspan="2">хранение (не более 24 часов)</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>7</td><td>Полученная ДНК готова к использованию во 2-м раунде ПЦР.
Хранить ДНК при температуре не выше -18°C не более 1 недели.</td></tr>
</table>

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

Этап 5. Электрофоретическая детекция продуктов амплификации

Зона 3. Набор реагентов – «ЭФ»

1. Приготовление рабочего раствор для электрофореза

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

2. Приготовление агарозного геля

1. В термическую колбу высыпать содержимое 1 пакета с агарозой.
2. Добавить 100мл приготовленный в п.1 рабочий раствор для электрофореза, закрыть колбу крышкой или бумагой (не герметично).
3. Поместить колбу в микроволновую печь и довести смесь до кипения.
4. Извлечь колбу из микроволновой печи, перемешать смесь помешиванием колбы. Повторить п. 2.3.
   ВНИМАНИЕ! При извлечении колбы из микроволновой печи использовать термическую рукавицу!
5. Извлечь колбу из микроволновой печи и охладить до ~60°С.
6. Добавить в расплавленную агарозу 10мкл бромистого этидия, перемешать помешиванием колбы.
7. Залить расплавленную агарозу на подложку для геля, вставить гребенку для лунок, оставить на 15-20мин до полного застывания геля.
8. После того как гель полностью застыл, аккуратно удалить гребенку и поместить гель в электрофоретическую камеру.
9. Добавить в электрофоретическую камеру достаточное количество рабочего раствора для электрофореза в прибор для электрофореза, чтобы гель был покрыт слоем буфера около 2 – 5мм.

3. Проведение электрофоретической детекции

1. Выставить исследуемые образцы в штатив.
2. Смешать отдельным наконечником 5мкл исследуемого образца с 1мкл загрузочного буфера и перенести всю смесь в лунку геля.
3. Повторить п.3.2 для всех исследуемых образцов, включая контроли.
4. Добавить в свободную лунку 5мкл маркера молекулярного веса.
5. Провести электрофорез (18мин – 240W, 400mA – 70,0W) и проанализировать полученные результаты, рисунок 1.

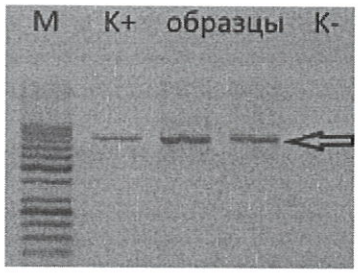


Рисунок 1 – Результаты электрофоретической детекции образцов по участку гена *pol* ВИЧ-1 (М – маркер, К+ - положительный контрольный образец, К- - отрицательный контрольный образец, образцы – исследуемые пробы); размер анализируемого фрагмента 1500п.н.

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

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.

Интерпретация результатов электрофоретической детекции продуктов амплификации

Во время электрофореза молекулы ДНК разделяются согласно их молекулярной массе. Бромид этидия включается в ДНК и в УФ-свете полосы ДНК флюоресцируют. Молекулярная масса продуктов ПЦР определяется согласно молекулярной массе ДНК-маркера.

Размеры амплифицируемых фрагментов должны соответствовать данным в таблице 2:

Таблица 2 – Интерпретация результатов электрофоретической детекции продуктов амплификации

Образец:	Полоса на уровне 1500 п.н.
Исследуемые образцы	есть / нет
Положительный контроль К+	есть
Отрицательный контроль К-	нет

В случае отсутствия полосы в исследуемом образце на уровне 1500 п.н. данный образец не подлежит дальнейшим исследованиям.

В случае отсутствия полосы в положительном контроле (К+) на уровне 1500 п.н. провести повторное исследование, начиная с реакции обратной транскрипции.

В случае присутствия полосы в отрицательном контроле (К-) данное исследование считается недействительным и все образцы подлежат отбраковке. Необходимо провести исследование заново, начиная с этапа выделения РНК.

Исследуемые образцы, у которых есть полоса ДНК на уровне 1500 п.н., далее переносятся в зону 4 для очистки перед секвенирующей ПЦР.

Этап 6. Чистка ПЦР-продукта

Зона 4

Набор реагентов – «ОЧИСТКА ПЦР»

1	Подготовить исследуемые образцы ДНК ВИЧ Извлечь из морозильной камеры: • **чистящий реагент**
2	Добавить во все исследуемые образцы по **2**мкл **чистящего реагента**
3	Поместить пробирки в амплификатор. Общий объем реакционной смеси – 37мкл. Программа чистки: 37°C 15мин 70°C 15мин 10°C хранение (не более 1 часа)
7	Очищенная ДНК готова к использованию в секвенирующей ПЦР. Хранить ДНК при температуре не выше -18°C не более 1 суток.

Этап 7. Секвенирующая ПЦР

Набор реагентов – «СЕКВ»

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

Перед постановкой секвенирующей ПЦР необходимо провести разведение ДНК в зависимости от интенсивности полосы на электрофорезе:

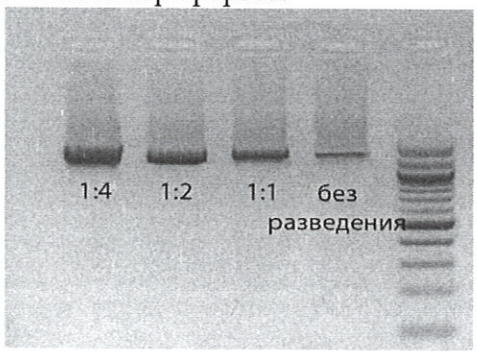


Рисунок 2 – Пример разведения ПЦР-продуктов, содержащих ДНК в разной концентрации

Таблица 2 – 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

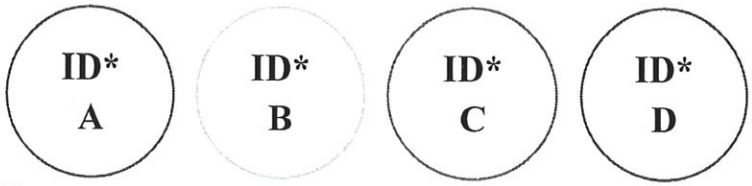
Проведение секвенирующей ПЦР

Внимание! При работе с ДНК необходимо использовать только одноразовые стерильные пластиковые расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

Внимание! Во время работы все реактивы и ДНК должны храниться на льду (используйте хладоэлементы).

1	Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл. Для каждого образца необходимо использовать 4 отдельных пробирки с каждым из четырех Секвенс-Миксов. Подготовить исследуемые образцы ДНК Разморозить необходимые реактивы: **Секвенс-Микс-A** **Секвенс-Микс-B** **Секвенс-Микс-C** **Секвенс-Микс-D**
2	Рекомендуется следующая маркировка пробирок для одного исследуемого образца:

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

	 *ID – имя или номер одного исследуемого образца A, B, C, D – название используемого Секвенс-Микса
3	Добавить в каждую промаркированную пробирку по 12мкл соответствующего Секвенс-Микса.
4	Добавить по 8мкл разведенной ДНК исследуемого образца в соответствующие пробирки с Секвенс-Миксами A, B, C и D. Кратко осадить пробирки в течение 2-4 сек.
5	Поместить пробирки в амплификатор. Установить объем смеси 20 мкл. Программа амплификации для секвенирующей ПЦР: 96°C 60сек 96°C 10сек 50°C 5сек 35 циклов 60°C 4мин 4°C хранение не более 24 часов

Этап 8. Очистка ПЦР-продукта после секвенирующей ПЦР

Зона 4
Набор реагентов – «ОЧИСТКА СЕКВ»

Перед началом работы необходимо приготовить 70% этанол из расчета 250мкл на 1 образец. Для этого смешать $105 \times (n + 2)$ мкл 96% этанола, входящего в состав набора, с $45 \times (n + 2)$ мкл дистиллированной воды,

где n – количество образцов для чистки после секвенирующей ПЦР.

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

Процедура очистки продуктов ПЦР:

1.	Промаркировать необходимое количество пробирок объемом 1,5мл
2.	Приготовить смесь холодного 96% этанола и ацетата натрия из расчета на 1 образец: этанол 96% - 50мкл (-15-25°C) ацетат натрия - 2мкл **Внимание**! Готовить смесь необходимо из расчета на 2 образца больше.
3.	Добавить 52мкл смеси этанола и ацетата натрия в маркированные пробирки.
4.	Кратким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок с ПЦР продуктом после секвенирующей ПЦР.
5.	Перенести весь ПЦР-продукт (20мкл) в пробирки со смесью этанола и ацетата натрия, перемешать на микровстряхивателе.

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

6.	Центрифугировать пробирки в центрифуге: обороты в мин: > 12000 g время: 20 мин температура: 4°С
7.	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.
8.	Добавить в пробирки по 250мкл холодного (-15-25°С) 70% этанола, перемешать на микровстряхивателе.
9.	Центрифугировать пробирки в центрифуге: обороты в мин: > 12000 g время: 10 мин температура: 18-25°С
10.	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.
11.	Высушить осадок при 95°С в течение 2мин. Крышки пробирок должны быть открыты.
12.	Добавить в пробирки по 20мкл формамида, перемешать на микровстряхивателе, кратким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.
13.	Прогреть пробирки при 95°С в течение 2мин.
14.	Пробы готовы для загрузки в генетический анализатор. Хранить образцы при температуре (-15-25°С) не более недели.

Этап 9. 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 10. Биоинформационный анализ

Для получения нуклеотидной последовательности одного исследуемого образца необходимо собрать четыре соответствующих электрофореграммы для данного образца.

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»

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

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.

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: https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/ 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.

СРОК ГОДНОСТИ

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

ТРАНСПОРТИРОВКА

Компоненты тест-системы необходимо транспортировать в соответствии с правилами хранения реагентов тест-системы.

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

ХРАНЕНИЕ

ВНИМАНИЕ! Тест-систему после получения необходимо разукомплектовать в соответствии с условиями хранения отдельных компонентов:

Наименование компонента	Условия хранения
«ОТ», «ПЦР», «КОНТРОЛЬ», «ОЧИСТКА ПЦР», «СЕКВ», «ОЧИСТКА СЕКВ»	-25 – -15°С
«ЭФ»	+2 – +8°С
«АГ»	+18 – +25 °С

РАЗРАБОТЧИК:

Заведующий лабораторией диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций
Государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» _____ Е.Л. Гасич
«25» 11 2024 г

Научный сотрудник лаборатории диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций
Государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» _____ А.С. Бунас
«25» 11 2024 г

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