

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

От _____ 200 г. № _____

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для обнаружения ДНК
вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 в биологических пробах
методом полимеразной цепной реакции

(ВИПАПОЛ 31/33)

Рекомендована к утверждению экспертной комиссией
по наборам реагентов для иммуноферментного
(неинфекционные), радиоиммунологического и других
видов иммунохимического анализа

(Протокол № 3 от 19 апреля 2004 года)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ВИПАПОЛ 31/33 предназначен для качественного обнаружения ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 в биологическом материале (соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала или уретры у женщин, из уретры у мужчин) методом полимеразной цепной реакции.

1.2. Набор реагентов ВИПАПОЛ 31/33 может быть использован в клинической диагностике носительства вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52, а также для оценки эффективности терапии папилломатоза.

Инструкция составлена: зам. директора НПФ "ЛИТЕХ" при НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, д.б.н. Говоруном В.М.; ст.научным сотрудником, к.б.н. Ильиной Е.Н. – сотрудником НПФ "ЛИТЕХ" при НИИ физико-химической медицины МЗ РФ; директором ЦНИКВИ, д.м.н., проф., акад. РАМН Кубановой А.А

1.3. Набор рассчитан на проведение 50, или 100, или 200 определений в зависимости от комплектации набора.

Набор на 50 определений рассчитан на проведение анализа 44 неизвестных образцов, 3 проб положительного контрольного образца ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 и 3 проб отрицательного контрольного образца.

Набор на 100 определений рассчитан на проведение анализа 90 неизвестных образцов, 5 проб положительного контрольного образца ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 и 5 проб отрицательного контрольного образца.

Набор на 200 определений рассчитан на проведение анализа 180 неизвестных образцов, 10 проб положительного контрольного образца ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 и 10 проб отрицательного контрольного образца.

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

2.1. Набор реагентов основан на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения специфических участков ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 путем накопления (амплификации) специфических фрагментов.

В результате многократно повторяющихся циклов синтеза новых цепей ДНК, гомологичных специфической области ДНК-мишени, происходит накопление фрагментов ДНК в количестве, достаточном для детекции методом электрофореза в агарозном геле.

Анализ с использованием метода ПЦР включает 3 этапа:

1. Обработка биологической пробы (выделение ДНК).
2. Амплификация.
3. Детекция продуктов амплификации (электрофоретическое разделение в агарозном геле).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

Специфичность определяется олигонуклеотидными затравками (праймерами), подобранными к гомологичным участкам L1 области геномной ДНК вируса папилломы человека.

3.2. Чувствительность анализа

С помощью набора ВИНАПОЛ 31/33 можно обнаружить 80 и более геном-эквивалентов ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 в 5 мкл прошедшей обработку (выделение ДНК) пробе.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. Меры предосторожности - соблюдение "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с анализируемым биоматериалом следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. биологический материал человека может являться источником инфекционных или вирусных заболеваний.

5. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора, рассчитанного на проведение 50, или 100, или 200 определений, входят:

Реагент в пробирках для выделения ДНК из биопроб с целью последующего анализа методом полимеразной цепной реакции (ДНК-ЭКСПРЕСС), 200 мкл (1 пробирка)

Готовый к применению реагент.

Хранить при температуре +2 – 8°C

Комплект на 50 реакций	(50 пробирок)
Комплект на 100 реакций	(100 пробирок)
Комплект на 200 реакций	(200 пробирок)

Комплект реагентов для проведения амплификации:

готовые к применению реагенты.

Хранить при температуре -18 -20°C

№	Реагенты комплекта	Объемы реагентов на 50 определений	Объемы реагентов на 100 определений	Объемы реагентов на 200 определений
1.	Реакционная смесь, содержащая внутренний контроль	140 мкл (1 пробирка)	275 мкл (1 пробирка)	550 мкл (1 пробирка)
2.	Тaq-полимераза (5 ед/мкл)	13 мкл (1 пробирка)	25 мкл (1 пробирка)	50 мкл (1 пробирка)
3.	Разбавитель	2,0 мл (1 пробирка)	2,0 мл (1 пробирка)	4,0 мл (2 пробирки по 2,0 мл)
4.	Масло минеральное	2,2 мл (1 пробирка)	2,2 мл (1 пробирка)	4,4 мл (2 пробирки по 2,2 мл)
5.	Образец ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 положительный контрольный	30 мкл (1 пробирка)	30 мкл (1 пробирка)	60 мкл (1 пробирка)

Комплект реагентов для детекции (для всех комплектаций набора)

Хранить при комнатной температуре (+18 – 25° C)

1) Агароза	4 г (2 пробирки по 2 г)
2) 50- кратный ТАЕ-буфер (50хТАЕ)	25 мл (1 флакон)
3) Раствор бромистого этидия, 1%	30 мкл (1 пробирка)

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

- термостат программируемый (ДНК амплификатор);
- камера для горизонтального электрофореза;
- источник питания;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру +95 -99 °C;
- трансиллюминатор ультрафиолетовый;
- микроцентрифуга, развивающая ускорение 12000 – 16000 g (8000 – 12000 об/мин)

для пробирок вместимостью 1,5 мл;

- микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (типа "Вортекс");
- СВЧ-печь, или электрическая плитка, или водяная баня, поддерживающая температуру +95-100°С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,5-10, 5-50, 20-200, 100-1000 мкл;
- колба коническая термостойкая вместимостью 250 мл;
- колба коническая вместимостью 1000 мл;
- пробирки пластиковые вместимостью 1,5 мл и 0,5 мл;
- штативы для пробирок;
- наконечники стерильные к полуавтоматическим пипеткам на 1-250 мкл;
- наконечники стерильные к полуавтоматическим пипеткам на 250-1000 мкл;
- пробирки стерильные пластиковые вместимостью 1,5 мл;
- пробирки стерильные пластиковые вместимостью 0,5 мл для амплификации;
- зонды универсальные стерильные для забора клинического материала;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК из клинического материала.

7.1.1. Взятие клинического материала для анализа.

Исследуемый материал (соскоб эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала или уретры), полученный с помощью одноразовых стерильных зондов, перенести в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, содержащую 200 мкл реагента ДНК-ЭКСПРЕСС, перемешать, зонд извлечь (выбросить), пробирку плотно закрыть. Приготовленную таким образом пробу использовать для выделения ДНК не позднее 2 ч или заморозить и хранить при температуре – 18-20°С не более 2 недель.

Пробы должны быть доставлены в лабораторию для анализа не позднее 6 ч после взятия в термосе или термоконтейнере при температуре не выше 0°С.

7.1.2. Обработка проб перед проведением амплификации (выделение ДНК).

7.1.2.1. Пробирки, содержащие анализируемый материал (см п. 7.1.1), тщательно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе в течение 10 сек, поместить пробирку в предварительно прогретый до температуры +98°С твердотельный термостат и инкубировать при температуре +98°С в течение 10 мин.

ВНИМАНИЕ! Перед тем, как поместить пробирки в термостат, необходимо убедиться, что во всех пробирках зашелкнул замочек на крышках.

7.1.2.2 Пробирки центрифугировать в течение 15 секунд при 12000 – 16000g (8000 – 12000 об/мин) при комнатной температуре (+18–25°С), супернатант использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации.

Обработанные таким образом пробы можно хранить при температуре +2-8°С не более одной недели или при температуре -18-20°С не более 6 мес.

7.2. Проведение амплификации

7.2.1. Приготовить и пронумеровать пробирки вместимостью 0,5 мл для проведения амплификации, включая пробирки для положительного контрольного образца ДНК и отрицательного контрольного образца.

7.2.2. За 20-30 мин до приготовления амплификационной смеси извлечь комплект реагентов для амплификации из морозильника, разморозить содержимое (желательно поместить пробирку с Taq-полимеразой в ледяную баню). Пробирку с реакционной смесью тщательно встряхнуть для перемешивания содержимого.

7.2.3. Приготовить амплификационную смесь согласно приведенной таблице:

Кол-во пробирок	Разбавитель, мкл	Реакционная смесь, мкл	Taq-полимераза, мкл
5	83	12,5	1
10	175	25	2
15	263	37,5	3
20	350	50	4
25	438	62,5	5

ВНИМАНИЕ! При приготовлении амплификационной смеси необходимо все компоненты добавлять отдельными наконечниками.

Амплификационная смесь хранению не подлежит.

7.2.4. После добавления Taq-полимеразы, которое производится в последнюю очередь, необходимо тщательно перемешать смесь пипетированием.

7.2.5. Внести по 20 мкл амплификационной смеси во все пробирки, подготовленные для амплификации.

7.2.6. Добавить во все пробирки по 20 мкл минерального масла.

7.2.7. Внести 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см п. 7.1.2.2) в соответствующую пробирку с амплификационной смесью под слой масла.

7.2.8. Внести в пробирку для положительного контрольного образца ДНК 5 мкл положительного контрольного образца ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35, 52, а в пробирку для отрицательного контрольного образца – 5 мкл разбавителя.

7.2.9. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 2250 – 4000g (1500-3000 об/мин) при комнатной температуре (+18 – 25°C) на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.10. Перенести пробирки в прогретый до температуры +93°C программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

+93°C – 60 сек

+93°C – 30 сек

+55°C – 30 сек

+72°C – 10 сек

количество циклов 40

+72°C – 1 мин

Примечание. Приведенная программа отработана для постановки реакции на амплификаторе модели МС 2 «Терцик», имеющем режим активного регулирования. По вопросу адаптации программ для использования на других моделях амплификаторов обращаться к производителю Набора реагентов ВИПАПОЛ 31/33.

7. 3. Детекция продуктов амплификации

7.3.1. Проведение электрофореза

7.3.1.1. Заполнить камеру для электрофореза 1хТАЕ буфером, приготовленным на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ буфера в 50 раз.

7.3.1.2. К 2 г агарозы добавить 2 мл 50хТАЕ буфера и 100 мл дистиллированной воды.

7.3.1.3. Расплавить агарозу на электрической плитке, или на водяной бане, или в СВЧ-печи. Добавить к 100 мл раствора агарозы 10 мкл 1% раствора бромистого этидия, перемешать.

7.3.1.4. Охладить агарозу до температуры +50 – 60°C при комнатной температуре (+18 – 25°C) и залить в планшет для заливки гелей. Для получения карманов в агарозном геле установить гребенку на планшет, используя зажим типа "бульдог". После застывания агарозы

осторожно вынуть гребенку из геля и перенести планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза.

7.3.1.5. Нанести в карманы геля по 10-15 мкл продукта амплификации в последовательности, соответствующей нумерации проб.

7.3.1.6. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/см длины геля. Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+). Контроль за электрофоретическим разделением осуществлять визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя должна пройти от старта не менее 1,5-2 см.

7.3.2. Регистрация результатов электрофореза

7.3.2.1. Вынуть гель из планшета и перенести гель на стекло ультрафиолетового трансиллюминатора.

ВНИМАНИЕ! С гелем агарозы следует работать в перчатках. Бромистый этидий является сильным мутагеном.

7.3.2.2. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся полос оранжево-красного цвета.

ВНИМАНИЕ! Просмотр геля следует проводить только через защитный экран или защитные очки, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги и вреден для глаз.

7.3.2.3. Полученные результаты можно документировать фотографированием гелей с использованием оранжевого или интерференционного (594 нм) светофильтра.

8. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отрицательном контрольном образце должна выявляться одна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю (ВК) для вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 размером 700 п.н. Появление второй полосы на уровне положительного контрольного образца ДНК свидетельствует о контаминации (загрязнении) компонентов набора.

В положительном контрольном образце ДНК должны выявляться две полосы:

1) полоса оранжево-красного цвета размером 410 п.н., соответствующая положительному контрольному образцу ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52;

2) полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю (ВК), размером 700 п.н.

Анализируемые пробы. Отсутствие полосы оранжево-красного цвета строго на уровне положительного контрольного образца ДНК (410 п.н.) свидетельствует об отсутствии ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 в анализируемой пробе. Наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контрольному образцу ДНК (410 п.н.), свидетельствует о присутствии ДНК вируса папилломы человека типов 31, 33, 35 и 52 в анализируемой пробе.

Во всех отрицательных образцах должна выявляться полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю (ВК) вируса папилломы человека размером 700 п.н.

Если в анализируемом образце отсутствует как полоса, соответствующая по подвижности положительному контрольному образцу ДНК, так и полоса внутреннего контроля, это означает, что реакция амплификации не прошла (возможные причины: проба содержит вещества, ингибирующие ПЦР; неадекватная работа амплификатора; ошибка выполнения процедуры проведения анализа). В этом случае необходимо провести повторный анализ, начиная со стадии выделения ДНК.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Комплект «ДНК-ЭКСПРЕСС» для выделения ДНК из анализируемых проб должен храниться при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора.

9.2. Комплект реагентов для проведения амплификации должен храниться при температуре $-18-20^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности набора. Допускается хранение этого комплекта при температуре 0°C не более 1,5 сут.

9.3. Комплект реагентов для детекции может храниться при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в течение всего срока годности набора.

9.4. Срок годности набора - 6 мес.

9.5. Обработанные (прошедшие выделение ДНК) пробы можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более одной недели или при температуре $-18-20^{\circ}\text{C}$ не более 6 мес.

9.6. Амплификационная смесь хранению не подлежит.

9.7. 1хТАЕ буфер можно хранить при комнатной температуре не более 1 недели.

9.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора ВИПАПОЛ 31/33, следует обращаться в НПФ «ЛИТЕХ» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1 стр.3, телефон/факс: (495)246-45-01, или (e.mail) info@lytech.ru

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» ФС НЗСР по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14 а, тел: (095)120-60-95; 120-60-96.

Директор ООО НПФ «Литех»



ГОВОРУН Т.Л.