

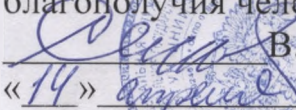
УТВЕРЖДЕНА

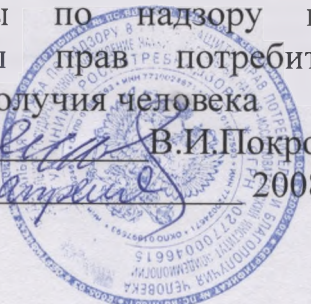
Приказом Росздравнадзора

от _____ № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

/ Директор Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека


В.И.Покровский
«14» _____ 2008 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 31, 33, 35; 18, 39, 45,

59 и 52, 56, 58, 66 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле

«АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-ЕPh»

**Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации**

« » 2008 г.

№

по применению набора реагентов

для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 31, 33, 35; 18, 39, 45, 59 и 52, 56, 58, 66 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле

«АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-ЕРh»

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича

Роспотребнадзора

Н.В.Медуницын

« 14 »

апреля

2008 г.



ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Набор реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает комплекты реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 50, «ПЦР-комплект» вариант 50 F, «ЭФ» вариант генотип-300.

Форма 2 включает комплект реагентов «ПЦР-комплект» вариант 50 F.

ВНИМАНИЕ! Заявленные аналитические характеристики набора реагентов при работе с формой 2 гарантируется только в случае применения дополнительных комплектов реагентов «ДНК-сорб-АМ» (ТУ 9398-036-01897593-2007) и «ЭФ» (ТУ 9398-070-01897593-2008) вариант генотип производства Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора).

СОСТАВ.

Комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» вариант 50 – комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость*	15	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	1 пробирка
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из 50 проб, включая контроли.

* При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» (ТУ 9398-048-01897593-2008) вариант 50 F – комплект реагентов для ПЦР-амплификации и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 31, 33, 35; 18, 39, 45, 59 и 52, 56, 58, 66 типов **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПЦР-смесь-1 ВПЧ 16/35	Прозрачная бесцветная жидкость	0,275	1 пробирка
ПЦР-смесь-1 ВПЧ 18/59	Прозрачная бесцветная жидкость	0,275	1 пробирка
ПЦР-смесь-1 ВПЧ 52/66	Прозрачная бесцветная жидкость	0,275	1 пробирка

2,5x ПЦР-буфер red	Прозрачная жидкость красного цвета	0,6	3 пробирки
Полимераза (TaqF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,09	1 пробирка
Минеральное масло для ПЦР	Бесцветная вязкая жидкость	8,0	1 флакон
ПКО ДНК человека	Прозрачная бесцветная жидкость	0,2	1 пробирка
ДНК-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	1 пробирка

Комплект реагентов рассчитан на проведение 165 реакций амплификации (всего 55 тестов), включая контроли.

Дополнительно к комплекту реагентов прилагается отрицательный контрольный образец (ОКО) этапа выделения:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	1 пробирка

Дополнительно к комплекту реагентов прилагается панель положительных контрольных образцов (ПКО) ДНК «ВПЧ ВКР генотип»:

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл)</i>	<i>Кол-во</i>
ПКО ДНК ВПЧ 16 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 31 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 33 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 35 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 18 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 45 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 39 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 59 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 52 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 56 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 58 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка
ПКО ДНК ВПЧ 66 типа	Прозрачная бесцветная жидкость	0,15	1 пробирка

Комплект реагентов «ЭФ» вариант генотип-300 – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле **включает:**

<i>Реактив</i>	<i>Описание</i>	<i>Объем (мл), Масса (г)</i>	<i>Кол-во</i>
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	75 мл	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК с высоким разрешением	Порошок белого цвета	3,0 г	3 пробирки

Комплект реагентов рассчитан на электрофоретический анализ 216 образцов (из расчета 100 мл геля – 3 ряда по 24 лунки).

НАЗНАЧЕНИЕ.

Набор реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-ЕPh» предназначен для выявления и дифференциации ДНК вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 31, 33, 35; 18, 39, 45, 59 и 52, 56, 58, 66 типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле.

Форма комплектации 1 предназначена для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала, проведения ПЦР-амплификации и детекции продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Форма комплектации 2 предназначена для проведения ПЦР-амплификации. Для полного анализа необходимо дополнительно использовать комплект реагентов «ДНК-сорб-АМ» для выделения ДНК из клинического материала и комплект реагентов «ЭФ» вариант генотип для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора.

ПРИНЦИП МЕТОДА.

Метод основан на одновременной амплификации (мультиплекс-ПЦР) в одной пробирке участков ДНК четырех типов ВПЧ и участка ДНК β -глобинового гена, используемого в качестве внутреннего контроля. ПЦР-анализ на наличие ДНК двенадцати типов ВПЧ проводится в трех пробирках. Все амплифицируемые фрагменты имеют разную длину, что позволяет не только выявлять, но и определять генотип обнаруженного вируса папилломы человека высокого риска малигнизации. ДНК-мишень, выбранная в качестве внутреннего контроля, является участком генома человека и должна всегда присутствовать в образце (цервикальный соскоб) в достаточном количестве, эквивалентном количеству клеток в мазке (10^3 – 10^5 геномов). В случаях, если мазок/соскоб взят неправильно (большое количество слизи и маленькое количество эпителиальных клеток) полоса амплификации β -глобинового гена будет отсутствовать на фореграмме.

ВЗЯТИЕ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА. ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ПРОБ.

Для проведения анализа используется следующий клинический материал:

У женщин: образцы эпителия забирают так же, как для цитологического исследования:

Первый способ – используется комплект для взятия образцов, содержащий одну/две цервикальные цитощетки и пробирку на 2 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта женщин» в объеме 0,5 мл.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), взятый одной цервикальной цитощеткой, и/или соскоб эпителия с поверхности шейки матки (экзоцервикс), взятый второй цервикальной цитощеткой, поместить в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть цитощеток обломить и оставить в пробирке с транспортной средой.

Второй способ – используется комплект для взятия образцов фирмы «Digene» (США), содержащий цервикальную цитощетку и пробирку с транспортной средой «Digene» в объеме 1,0 мл.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс), взятый цервикальной цитощеткой, поместить в пробирку с транспортной средой «Digene».

Третий способ – используется комплект для взятия образцов, содержащий комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эндо-/экзо-цервикса и пробирку на 5 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта женщин» в объеме 2,0 мл.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс) и поверхности шейки матки (экзоцервикс), поместить в пробирку с транспортной средой. Рабочую часть зонда обломить и оставить в пробирке с транспортной средой.

Четвертый способ – используется комплект для взятия образцов, содержащий комбинированный гинекологический зонд для одновременного взятия эпителия из эндо-/экзо-цервикса и банку с транспортно-фиксирующей средой фирмы «CytoScreen» (Италия) или фирмы «PreservCyt» (США) для жидкостной цитологии.

Соскоб эпителия цервикального канала (эндоцервикс) и поверхности шейки матки (экзоцервикс), поместить в пробирку с транспортно-фиксирующей средой. Рабочую часть зонда обломить и оставить в банке с транспортной средой.

У мужчин: соскоб эпителия уретры взятый универсальным зондом, поместить в пробирку на 2 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта мужчин» в объеме 0,5 мл.

Условия хранения проб:

- при температуре от 18 до 25 °С – не более 5 сут;
- при температуре от 2 до 8 °С – не более 20 сут;

- при температуре не выше минус 16 °С – в течение года. Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

В транспортно-фиксирующей среде для жидкостной цитологии материал хранится при комнатной температуре в течение года.

Для обработки взятого клинического материала используются следующие комплекты реагентов производства ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора:

- **ДНК-сорб-А»** (ТУ 9398-002-01897593-2006) или **«ДНК-сорб-АМ»** - для клинического материала, полученного первым, вторым и третьим способом. Так же для указанного материала допускается использование комплекта реагентов **«ДНК-сорб-В»** (ТУ 9398-003-01897593-2006);
- **«ДНК-сорб-С»** (ТУ 9398-075-01897593-2008) – для биоптатов слизистой;
- **«ДНК-сорб-Д»** (ТУ 9398-077-01897593-2008) – для обработки образцов жидкостной цитологии.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

1. Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.
2. Анализ проводится согласно МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».
3. Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовая пластиковая посуда (пробирки, наконечники) должна сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т или др. (см. МУ 1.3.1888-04).
4. Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое. Персонал, работающий в помещении для детекции продуктов ПЦР-амплификации (зона 3), не должен посещать помещения для обработки клинического материала (зона 1) и проведения ПЦР-амплификации (зона 2). Смена верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофоретического анализа.
5. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом в течение 30 мин.
6. При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным

экраном или защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги лица и слизистой глаз.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-АНАЛИЗА.

(с указанием фирм-производителей / поставщиков):

ЗОНА 1.

Для выделения ДНК из проб требуются:

1. Ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия, класс биологической безопасности II тип А).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс об/мин (например, «MiniSpin», «Eppendorf», Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл (например, «Ахуген», США).
8. Штативы для микропробирок на 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (например, «Ахуген», США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
12. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
13. Емкость с дезинфицирующим раствором.

ЗОНА 2.

Для проведения ПЦР-амплификации требуются:

1. Амплификатор для микропробирок 0,5 мл (например, «Терцик», «ДНК-Технология», Россия, или эквивалентный); для микропробирок 0,2 мл (например, «Palm-Cycler», «Corbett Research», Австралия, или эквивалентный).
2. ПЦР-бокс (например, «БАВ-ПЦР-«Ламинар-С», «Ламинарные системы», Россия).
3. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).

4. Набор электронных или механических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
5. Одноразовые наконечники с аэрозольным барьером до 200 мкл (например, «Ахуген», США).
6. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 (0,2) мл (например, «Ахуген», США).
7. Штативы для наконечников (например, «Ахуген», США) и микропробирок на 0,5 (0,2) мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
8. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой не выше минус 16 °С.
9. Отдельный халат и одноразовые перчатки.
10. Емкость для сброса наконечников.

ЗОНА 3.

Для детекции продуктов ПЦР-амплификации методом электрофореза в агарозном геле требуются:

1. Камера для горизонтального электрофореза объемом не более 400 мл (например, «SE-2», «Хеликон», Россия).
2. Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В (например, «Эльф-4», «ДНК-Технология», Россия).
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Латвия).
4. Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов («Биотест-1», ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Россия; «BioRad», США).
5. Аквадистиллятор.
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Микроволновая печь для плавления агарозы.
8. Колба коническая из термостойкого стекла (ГОСТ 21400-75) для плавления агарозы на 250 мл.
9. Мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770-74).
10. Штатив для микропробирок на 0,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
11. Отдельный дозатор объемом 10-40 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
12. Одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе (например, «Ахуген», США).
13. Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.
14. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АНАЛИЗА.

ЭТАП 1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПРОБ.

(проводится в ЗОНЕ 1 - помещении для обработки исследуемого материала).

Объем пробы, необходимый для выделения ДНК, – 0,1 мл.

Порядок работы.

1. Лизирующий раствор (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть, перемешивая при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

2. Добавление реагентов.

Способ 1:

- отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль выделения).
- ресуспендировать **сорбент универсальный** до гомогенной консистенции, внести в каждую пробирку по **20 мкл сорбента универсального** и по **300 мкл лизирующего раствора**, используя наконечники с аэрозольным барьером. Промаркировать пробирки.

Способ 2:

- перед началом работы во флакон с лизирующим раствором добавить весь объем (1 мл на 15 мл лизирующего раствора) предварительно гомогенизированного сорбента универсального и перемешать. Допускается хранение полученной смеси в течение 2 сут при комнатной температуре. Перед применением тщательно перемешать.
 - отобрать необходимое количество одноразовых пробирок **1,5 мл** (включая отрицательный контроль выделения) и, используя наконечник с аэрозольным барьером, внести в каждую пробирку по **320 мкл** подготовленной смеси **лизирующего раствора и сорбента универсального**. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки согласно маркировке внести по **100 мкл** пробы, используя для каждой пробы отдельный наконечник с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля (ОК) выделения внести **100 мкл ОКО**, используя наконечник с аэрозольным барьером.
4. Содержимое пробирок тщательно перемешать на вортексе и инкубировать **5 мин при температуре 65 °С** в термостате. После окончания инкубации перемешать на вортексе и поставить в штатив на **2 мин**.
5. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при **10 тыс об/мин в течение 30 с**. Не захватывая сорбент универсальный, удалить надосадочную жидкость в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя, используя для каждой пробы отдельный наконечник без аэрозольного барьера.
6. Добавить в пробы по **1 мл отмывочного раствора**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального.
7. Повторить п. 5.

8. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °C** на **5-10 мин** для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
9. В пробирки добавить по **100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Поместить в термостат с температурой **65 °C** на **5 мин**.
10. Перемешать на вортексе Центрифугировать пробирки при **12 тыс об/мин** в течение **1 мин** на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК (ДНК-проба).
Указанный материал готов к постановке ПЦР.

ДНК-пробы можно хранить в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °C и в течение года при температуре не выше минус 16 °C.

Пробирки с ДНК-пробами переносят в зону ПЦР-амплификации.

ЭТАП 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ.

(проводится в ЗОНЕ 2 - помещении для проведения ПЦР-амплификации).

Общий объем реакции – 25 мкл, объем ДНК-пробы – 10 мкл.

В комплекте реагентов применяется «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы (TaqF), которая активируется при прогреве реакционной смеси при 95 °C в течение 15 мин.

Порядок работы.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Подготовить реакционную смесь. При расчете следует учитывать, что постановка сопровождается постановкой шести контрольных точек (**отрицательного и пяти положительных контролей**). Кроме того, необходимо брать реагенты с запасом: рассчитывать на одну реакцию больше. Для проведения N реакций с ПЦР-смесью-1 ВПЧ 16/35 смешать в отдельной пробирке **5*(N+1) мкл ПЦР-смеси-1 ВПЧ 16/35**, **10*(N+1) мкл 2,5x ПЦР-буфер red** и **0,5*(N+1) мкл полимеразы (TaqF)**.
2. Перемешать амплификационную смесь на вортексе и раскапать по **15 мкл** в пробирки для проведения ПЦР.
3. Сверху раскапать по капле **минерального масла для ПЦР**. При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой, минеральное масло можно не добавлять.
4. Аналогично п. п. 1-3 подготовить пробирки с **ПЦР-смесью-1 ВПЧ 18/59** и **ПЦР-смесью-1 ВПЧ 52/66***.
5. Выставить в штатив «рабочее место» в три ряда.

* **амплификационную смесь «16-35»** следует раскапать в голубые пробирки, **«18-59»** – в розовые, а **«52-66»** – в зеленые.

Б. Проведение амплификации.

1. Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на масло, используя наконечники с аэрозольными барьерами, внести по **10 мкл ДНК-проб**, выделенных из исследуемых или контрольных проб этапа выделения ДНК (ОКО). Каждую ДНК-пробу добавлять в три ряда пробирок с амплификационной смесью.
2. Поставить **контрольные реакции амплификации**:
- а) **отрицательный контроль (К-)** – вместо ДНК-пробы внести в пробирку **10 мкл ДНК-буфера**;
 - б) **положительный контроль ДНК человека (К_ч)** – внести в пробирку **10 мкл ПКО ДНК человека**;
 - в) **положительные контроли**:
 - амплификационной смеси «16-35» (К₁₆, К₃₁, К₃₃, К₃₅) – в четыре голубые пробирки внести по **10 мкл ПКО ДНК ВПЧ 16 типа, ПКО ДНК ВПЧ 31 типа, ПКО ДНК ВПЧ 33 типа и ПКО ДНК ВПЧ 35 типа**;
 - амплификационной смеси «18-59» (К₁₈, К₃₉, К₄₅, К₅₉) – в четыре розовые пробирки внести по **10 мкл ПКО ДНК ВПЧ 18 типа, ПКО ДНК ВПЧ 39 типа, ПКО ДНК ВПЧ 45 типа и ПКО ДНК ВПЧ 59 типа**;
 - амплификационной смеси «52-66» (К₅₂, К₅₆, К₅₈, К₆₆) – в четыре зеленые пробирки внести по **10 мкл ПКО ДНК ВПЧ 52 типа, ПКО ДНК ВПЧ 56 типа, ПКО ДНК ВПЧ 58 типа и ПКО ДНК ВПЧ 66 типа**.
3. Запустить на амплификаторе программу (см. табл. 1). Когда температура в ячейках достигнет 95 °С, поставить программу на паузу, поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы.

Таблица 1.

Программа амплификации ДНК ВПЧ ВКР 16, 31, 33, 35; 18, 39, 45, 59 и 52, 56, 58, 66 типов

	Амплификаторы с регулированием температуры по матрице: «PTC-100» («MJ Research»), «Palm-Cycler» («Corbett Research»)			Амплификаторы с активным регулированием (по раствору в пробирке): «GeneAmp PCR System 2700» («Applied Biosystems»), «Терцик» («ДНК-Технология»)		
цикл	температура	время	циклов	температура	время	циклов
1	95 °С	15 мин	1	95 °С	15 мин	1
2	95 °С	30 с	42	95 °С	30 с	42
	63 °С	40 с		63 °С	30 с	
	72 °С	50 с		72 °С	40 с	
3	72 °С	1 мин	1	72 °С	1 мин	1
4	10 °С	хранение		10 °С	хранение	

4. Время амплификации на амплификаторе с регулированием температур по матрице примерно 2 ч 30 мин, на амплификаторе с активным регулированием – 1 ч 50 мин.
5. После окончания реакции собрать пробирки в штатив и отправить в помещение для

детекции продуктов ПЦР-амплификации (ЗОНУ 3).

Пробы после амплификации можно хранить в течение 16 ч при комнатной температуре, в течение 1 нед при температуре от 2 до 8 °С и длительно при температуре не выше минус 16 °С (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

Параметры геля должны быть следующие:

3 % гель из агарозы с высоким разрешением.

Длина геля – не менее 5 см (для камеры «SE-2», нужно поставить 3 гребенки вместо шести (т.е. через одну)).

Лидирующий краситель (крезоловый красный), необходимо разогнать до 2/3 длины гелевой пластины (т.е. на 3,5 см).

ЭТАП 3. ДЕТЕКЦИЯ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ.

(проводится в ЗОНЕ 3 - помещении для детекции продуктов ПЦР-амплификации).

ВНИМАНИЕ! РАБОТА С АМПЛИФИЦИРОВАННОЙ ДНК ДОЛЖНА ПРОВОДИТЬСЯ В ОТДЕЛЬНОЙ КОМНАТЕ СОТРУДНИКОМ ЛАБОРАТОРИИ, НЕ ПРОИЗВОДЯЩИМ МАНИПУЛЯЦИЙ В ЗОНЕ 1 И ЗОНЕ 2.

Приготовление рабочих растворов и агарозного геля.

1. Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести дистиллированной водой до **500 мл**, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Бромид этидия – канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Все реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке (см. раздел «Обеззараживание»).

2. Агарозу для электрофореза ДНК с высоким разрешением из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин.

Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать,

вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С.

3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры для горизонтального электрофореза. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее **5 см** друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.
4. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеры для горизонтального электрофореза, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду (ДНК будет двигаться к положительному). Залить в камеру для горизонтального электрофореза готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Порядок работы.

1. Приготовить **контроли этапа электрофоретического анализа (КФ 16-35, КФ 18-59, КФ 52-66)**. Отобрать пробирки с амплифицированными ДНК контрольной панели. Смешать содержимое пробирок одного цвета в одной чистой пробирке. Например, чтобы получить **КФ 16-35** необходимо смешать содержимое пробирок **К 16, К 31, К 33, К 35**. Аналогично получают **КФ 18-59**, и **КФ 52-66**. Полученные контроли этапа электрофоретического анализа являются ДНК-маркерами специфически-амплифицированных участков ДНК ВПЧ.
2. Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла по **10–15 мкл** образцов и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждого образца). Первым и последним в ряду амплифицированных ДНК каждого цвета наносить соответствующий КФ.
3. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры «SE-2» («Хеликон») и источника питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 40 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.
4. По завершении времени электрофореза (краситель крезоловый красный в исследуемых пробирках при этом пройдет примерно 2/3 длины геля – 3,0 - 3,5 см), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены специальной маской или стеклянной пластиной!

УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Учёт результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК (см. табл. 2).

В пробирке с ПЦР-смесью-1 ВПЧ 16/35 находятся праймеры для амплификации ДНК ВПЧ 16, 31, 33, 35 типов, в пробирке с ПЦР-смесью-1 ВПЧ 18/59 – праймеры для амплификации ДНК ВПЧ 18, 39, 45, 59 типов и в пробирке с ПЦР-смесью-1 ВПЧ 52/66 – праймеры для амплификации ДНК ВПЧ 52, 56, 58, 66 типов. Также в каждой пробирке находятся праймеры для амплификации ДНК участка генома человека (β-глобинового гена).

Таблица 2.

Длина специфических полос амплифицированных фрагментов ДНК

ПЦР-смесь-1 ВПЧ 16/35			ПЦР-смесь-1 ВПЧ 18/59			ПЦР-смесь-1 ВПЧ 52/66		
Генотип вируса	Длина специфического фрагмента	Длина внутреннего контроля	Генотип вируса	Длина специфического фрагмента	Длина внутреннего контроля	Генотип вируса	Длина специфического фрагмента	Длина внутреннего контроля
ВПЧ 16	325 п.н.	723 п.н.	ВПЧ 18	425 п.н.	723 п.н.	ВПЧ 52	360 п.н.	723 п.н.
ВПЧ 31	520 п.н.		ВПЧ 45	475 п.н.		ВПЧ 56	325 п.н.	
ВПЧ 33	227 п.н.		ВПЧ 39	340 п.н.		ВПЧ 58	240 п.н.	
ВПЧ 35	280 п.н.		ВПЧ 59	395 п.н.		ВПЧ 66	304 п.н.	

1. В дорожке, соответствующей отрицательному контролю этапа ПЦР (К-), не должно быть никаких полос.
2. В дорожке, соответствующей положительному контролю амплификации ДНК человека (К ч), должна быть полоса на уровне 723 п.н.
3. Отрицательными считаются образцы, которые содержат только полосу внутреннего контроля – 723 п.н.
4. В дорожках, соответствующих контролям этапа электрофоретического анализа (КФ) должно быть по четыре полосы специфически-амплифицированных ДНК, соответствующей длины. Кроме специфических полос в дорожках может присутствовать полоса внутреннего контроля – 723 п.н..
5. Положительными считаются образцы, которые содержат одну или несколько специфических полос на уровне:
 - 325, 520, 227 или 280 п.н. – при амплификации со смесью «16-35» (голубые пробирки);
 - 425, 475, 340 или 455 п.н. – при амплификации со смесью «18-59» (розовые пробирки);
 - 360, 325, 240 или 304 п.н. – при амплификации со смесью «52-66» (зеленые пробирки);
 - и полосу внутреннего контроля – 723 п.н. – во всех пробирках независимо от цвета.
6. Для того чтобы точно определить тип ВПЧ, необходимо на электрофореграмме провести линии, соединяющие соответствующие полосы амплифицированной ДНК в КФ+ (см. приложение 1).
7. Кроме специфических полос в дорожках могут наблюдаться нечеткие размытые полосы праймер-димеров, которые располагаются ниже уровня 100 нуклеотидных пар.

Результаты анализа не подлежат учету в следующих случаях:

1. Если результаты анализа контрольных точек (К-, КФ+) не соответствуют должным.
2. В случае отсутствия в какой либо из трех лунок нанесения клинического образца полосы внутреннего контроля (**723 п.н.**) результат считается невалидным, что требует перестановки ПЦР.
3. В случае отсутствия полосы внутреннего контроля (**723 п.н.**) во всех трех лунках нанесения данного клинического образца результат также считается невалидным, но в данном случае необходимо провести повторное выделение ДНК из клинического образца. В случае повторного получения такого результата необходимо провести повторное взятие клинического материала.
4. В дорожках появляются неспецифические полосы на разных уровнях. Возможные причины: отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.
5. Если в отрицательном контроле (К-) выявляются специфические полосы, значит, произошла контаминация реактивов или образцов. Результаты анализа считают недействительными. Требуется повторить анализ образцов, а также предпринять меры по выявлению источника контаминации.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

1. Обеззараживание биоматериалов и реактивов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду (пробирки, наконечники), колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 20-24 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующий 0,2 % раствор ДП-2Т.
2. Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. На 1 л обезвреживаемых реактивов добавляют 1 л 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 л 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 ч. Для нейтрализации добавляют 1 л 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Нейтрализованные реактивы сбрасывают в канализацию. Отработанный буфер можно дезактивировать с помощью стеклянной колонки емкостью на 1-2 л, заполненной активированным углем. Отработанный буфер пропускать через нее небольшими порциями. Дезактивированный раствор можно сливать в канализацию.

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.

Срок годности. 6 мес. Набор реактивов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Набор реактивов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

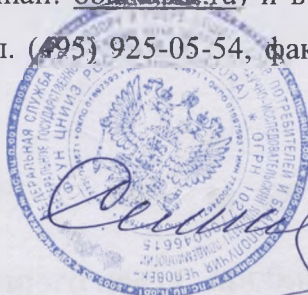
Хранение. Комплект реактивов «ДНК-сорб-АМ» хранить при температуре от 2 до 25 °С.

Комплект реагентов «ПЦР-комплект» (кроме полимеразы (TaqF)) хранить при температуре от 2 до 8 °С. Полимеразу (TaqF) хранить при температуре не выше минус 16 °С. Комплект реагентов «ЭФ» хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество набора реагентов «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-ЕРh» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (495) 241-39-22, факс (495) 241-92-38) и в адрес предприятия-изготовителя ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-39-39, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис» (тел. (495) 925-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

/ Директор ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора



В.И. Покровский

/ Руководитель Государственных испытаний

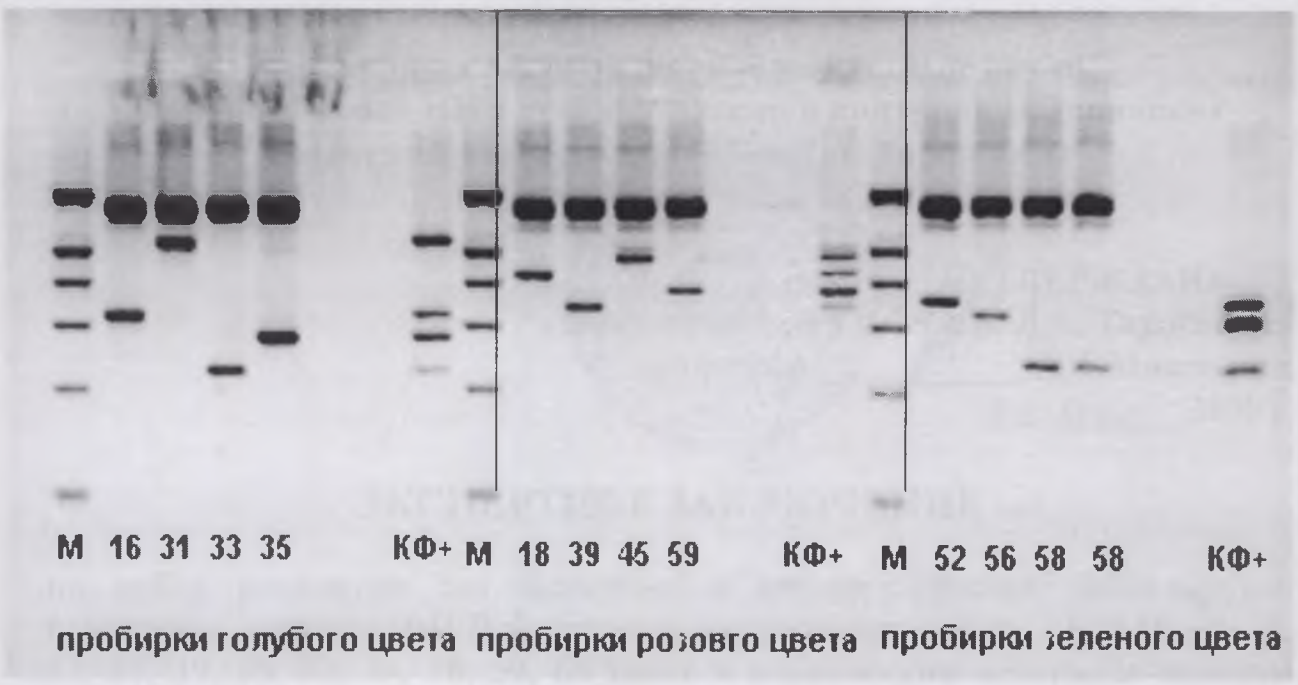
Заведующая лабораторией СиК МБП

против арбовирусов, риккетсиозов,

и СПИД ФГУН ГИСК им. Тарасевича Роспотребнадзора

М.С.Воробьева

Электрофореграмма результатов тестирования образцов контрольной панели.



Обозначения:

- М – тмаркер молекулярных масс ДНК (100, 200, 300, 400, 500, 800 п.н.)
- КФ+ – контроль этапа электрофоретического анализа – смесь продуктов амплификации контрольной панели ДНК ВПЧ соответствующих типов.
- 16, 18, ... – исследуемые образцы, содержащие 16, 18, ... тип ДНК ВПЧ.