

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Департамента
государственного контроля качества,
эффективности, безопасности
лекарственных средств и медицин-
ской техники Минздрава
Российской Федерации



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для обнаружения
Гарднереллы (*Gardnerella vaginalis*)
методом полимеразной цепной реакции

ГАРДПОЛ

Рекомендована к утверждению экспертной комиссией по наборам реагентов для иммуноферментного (неинфекционные), радиоиммунологического и других видов иммунохимического анализа Комитета по новой медицинской технике Министерства здравоохранения Российской Федерации

(Протокол No 9 от 23 октября 2000 года)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов ГАРДПОЛ предназначен для качественного определения ДНК Гарднереллы (*Gardnerella vaginalis*) в биологическом материале (соскобы из цервикального канала и уретры) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Инструкция составлена: д.б.н. Говоруном В.М.- ведущим научным сотрудником НПФ "ЛИТЕХ" при НИИ физико-химической медицины МЗ РФ.

Медицинский соисполнитель: член - корр. РАМН Сергиенко В.И.- зам. директора НИИ ФХМ МЗ РФ.

Набор предназначен для применения только *in vitro*.

Набор реагентов ГАРДПОЛ может быть использован в клинической диагностике носительства Гарднереллы (*Gardnerella vaginalis*), а также для оценки эффективности терапии гарднереллеза.

Набор рассчитан на проведение анализа 100 неизвестных образцов, 10 проб положительного контрольного образца и 10 проб отрицательного контрольного образца (всего 120 определений).

2. ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор реагентов ГАРДПОЛ основан на использовании процесса амплификации ДНК методом полимеразной цепной реакции.

Полимеразная цепная реакция представляет собой многократно повторяющиеся циклы синтеза (амплификацию) специфической области ДНК-мишени в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ), соответствующего солевого буфера и олигонуклеотидных затравок - праймеров, определяющих границы амплифицируемого участка ДНК-мишени.

Каждый цикл состоит из трех стадий с различными температурными режимами. На первой стадии при температуре +93°C происходит разделение цепей ДНК, затем при температуре +57°C - присоединение (отжиг) праймеров к гомологичным последовательностям на ДНК-мишени, после чего при температуре +68°C протекает синтез новых цепей ДНК путем удлинения праймера в направлении 5'-3'. В каждом цикле происходит удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет за 25 циклов наработать фрагмент ДНК, ограниченный парой выбранных праймеров, в количестве, достаточном для ее детекции с помощью электрофореза.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Специфичность анализа.

В образцах, содержащих ДНК Гарднереллы, должна выявляться полоса оранжево-красного цвета размером 370 пар нуклеотидов (п.н.), соответствующая по подвижности фрагменту генома Гарднереллы, а также полоса оранжево-красного цвета размером 275 п.н., соответствующая по подвижности внутреннему контролю.

В образцах, не содержащих ДНК Гарднереллы, должна выявляться только полоса оранжево-красного цвета размером 275 п.н., соответствующая по подвижности внутреннему контролю.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.2. 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.).

4.3. ПЦР-диагностика связана с проблемой контаминации, что обусловлено высокой чувствительностью метода. Вследствие этого при проведении работ с использованием методов амплификации ДНК или РНК пользователям диагностических наборов реагентов необходимо выполнять следующие правила работы:

- 1) Территориально разделить различные стадии анализа, размещая их в отдельных помещениях:
 - а) помещение для пробоподготовки;
 - б) помещение для постановки реакции амплификации;
 - в) помещение для регистрации результатов анализа.
- 2) Работа должна проводиться в лабораторной одежде, сменяемой при переходе из одного помещения в другое, и в одноразовых резиновых или пластиковых перчатках, так как компоненты набора и анализируемый биологический материал являются потенциально инфицированным материалом.
- 3) Следует использовать отдельные наборы полуавтоматических пипеток, предназначенных для различных стадий анализа и не переносимых из одного помещения в другое.
- 4) Все этапы работы следует проводить только с использованием одноразовых расходных материалов: наконечники для пипеток, пробирки и др.

4.4. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

5. СОСТАВ НАБОРА

В состав набора, рассчитанного на проведение 120 определений, входят:

5.1. Комплект для выделения ДНК из анализируемых проб (на 100 образцов):

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

- | | |
|----------------|-----------------------|
| 1) Раствор I | 32 мл (1 флакон) |
| 2) Раствор II | 11 мл (1 флакон) |
| 3) Раствор III | 215 мл (1 флакон) |
| 4) Сорбент | 1050 мкл (1 пробирка) |
| 5) TE буфер | 6 мл (3 пробирки) |

5.2. Комплект для проведения полимеразной цепной реакции (на 120 определений)

Хранить при температуре -20°C

- | | |
|--|----------------------|
| 1) Реакционная смесь, содержащая внутренний контроль | 305 мкл (1 пробирка) |
| 2) Таq-полимераза (5 ед/мл) | 25 мкл (1 пробирка) |
| 3) Вода деионизованная | 2 мл (1 пробирка) |
| 4) Минеральное масло | 2 мл (1 пробирка) |
| 5) Положительный контрольный образец ДНК | 55 мкл (1 пробирка) |

5.3. Комплект реагентов для детекции

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

- | | |
|--|----------------------|
| 1) Агароза | 1,5 г (1 флакон) |
| 2) 50- кратный TAE-буфер (50xTAE)
(2М Трис-ацетат pH 8,2, 0,05М ЭДТА) | 25 мл (1 флакон) |
| 3) Раствор бромистого этидия, 1% | 100 мкл (1 пробирка) |

6. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ:

- Термостат программируемый (ДНК амплификатор);
- Прибор для горизонтального электрофореза;
- Термостат, поддерживающий температуру +45-55 °C;
- Трансillюминатор ультрафиолетовый;
- Микроцентрифуга на 8-12000об/мин для 1,5 и 0,5 мл пробирок;
- Встряхиватель для микропробирок (типа "Вортекс");
- СВЧ-печь или водяная баня, поддерживающая температуру +95-100° C;
- Насос водоструйный или вакуумный с колбой - ловушкой;
- Микропипетки полуавтоматические, позволяющие отбирать объемы жидкости 1-10, 5-40, 40-200, 200-1000 мкл;
- Колба коническая термостойкая вместимостью 250 мл;
- Колба коническая вместимостью 1000 мл;
- Микропробирки пластиковые вместимостью 1,5 мл и 0,5 мл;
- Штативы для микропробирок;
- Стерильные наконечники 1-200 мкл;
- Стерильные пластиковые пробирки вместимостью 1,5 мл;
- Стерильные пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл для амплификации;
- Стерильный физиологический раствор (0,9 % NaCl);
- Универсальные стерильные зонды для забора клинического материала;
- Перчатки резиновые или пластиковые одноразовые;
- Вода дистиллированная.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК из образца.

7.1.1. Забор клинического материала.

Исследуемый материал (соскоб эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала или уретры) перенести в полипропиленовую пробирку вместимостью 1,5 мл, в которую предварительно внести 100 мкл физиологического раствора, с помощью одноразовых стерильных зондов для соскоба эпителия. Для этого взятый у пациента материал на зонде опустить в физиологический раствор, перемешать, зонд извлечь (выбросить), а приготовленную таким образом пробу использовать в тот же день для выделения ДНК или хранить при температуре - 20°С не более 2 недель.

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

7.1.2.1. К 100 мкл физиологического раствора, содержащего анализируемый материал в пробирке вместимостью 1,5 мл, добавить 300 мкл раствора I и 10 мкл суспензии сорбента. Пробы инкубировать в течение 10 мин при комнатной температуре (+18-25°C), 1-2 раза перемешав на вортексе.

7.1.2.2. Пробы центрифугировать в течение 15 сек на центрифуге при 12000-16000g (8 - 12000 об/мин) при комнатной температуре. Супернатант отбросить.

7.1.2.3. К осадку добавить 100 мкл раствора II и встряхнуть его на вортексе. Сорбент осадить центрифугированием при 12000-16000g (8 - 12000 об/мин) при комнатной температуре в течение 15 сек. Супернатант отбросить.

7.1.2.4. Процедуру отмывки повторить еще два раза с использованием 1,0 мл раствора III, так, как это описано в п. 7.1.2.3.

7.1.2.5. Дополнительным центрифугированием при 12000-16000g (8 - 12000 об/мин) при комнатной температуре с последующим отбрасыванием супернатанта убрать остатки раствора III. Пробы подсушить в течение 5 мин в термостате при температуре +45 -55°C, оставляя пробирки открытыми.

ВНИМАНИЕ! На всех стадиях обработки анализируемого материала удаление супернатанта производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи водоструйного насоса в колбу-ловушку, содержащую дезинфицирующий раствор (3% хлорамин или 5% перекись водорода).

7.1.2.6. В пробирки с сорбентом добавить 50 мкл ТЕ буфера, закрыть их, перемешать на вортексе и инкубировать в течение 5 мин при температуре +45-55°C.

7.1.2.7. Пробирки центрифугировать в течение 15 сек при 12000-16000g (8 - 12000 об/мин) при комнатной температуре, водную фазу (супернатант) использовать в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации.

Обработанные таким образом пробы можно хранить при температуре +2-8°C в течение одной недели или при температуре -20°C в течение 6 мес.

7.2. Проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1. Приготовить пробирки для проведения амплификации, пронумеровав их и расположив соответствующим образом в штативе. Подготовить также пробирки для положительного и отрицательного контрольных образцов.

7.2.2. Перенести 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (см. п. 7.1.2.7) в соответствующую пробирку для проведения амплификации.

7.2.3. Внести в пробирку для положительного контрольного образца 5 мкл положительного контрольного образца ДНК, а в пробирку для отрицательного контрольного образца - 5 мкл деионизованной воды.

7.2.4. Извлечь комплект для проведения полимеразной цепной реакции из морозильника, разморозить содержимое и перенести пробирки в ледяную баню.

7.2.5. Приготовить амплификационную смесь согласно приведенной таблице:

Количество пробирок	Вода деионизованная, мкл	Реакционная смесь, мкл	Taq-полимераза, мкл
4	70	10	0,8
8	140	20	1,6
16	280	40	3,2
24	420	60	4,8
32	560	80	6,4
42	737	105	8,4

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

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

7.2.7. Добавить в каждую пробирку по 20 мкл амплификационной смеси.

7.2.8. Добавить во все пробирки по 20 мкл (1 капля) минерального масла, используя пипетку вместимостью 1,0 мл.

7.2.9. Пробирки закрыть и центрифугировать в течение 3-5 сек при 12000-16000g (8-12000 об/мин) при комнатной температуре (+18-25°C).

7.2.10. Перенести пробирки в программируемый термостат (амплификатор) и провести амплификацию по следующей программе:

+93°C - 40 сек

+57°C - 20 сек количество циклов 25

+68°C - 40 сек

8. ПРОВЕДЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

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

8.2. К 1,5 г агарозы добавить 2 мл 50xTAE буфера и 100 мл дистиллированной воды.

8.3. Расплавить агарозу на электрической плите или в СВЧ-печи. Полученный раствор агарозы должен быть прозрачным и не содержать нерасплавленных частиц. Добавить к 100 мл раствора агарозы 10 мкл раствора бромистого этидия, перемешать.

8.4. Залить агарозный гель согласно инструкции к аппарату для горизонтального электрофореза.

Для заливки агарозного геля удобно использовать крышки для иммунологических планшетов подходящих размеров. Для получения карманов в агарозном геле установить гребенку на планшет, используя зажим типа "бульдог". Охладить агарозу до температуры +50-60°C при комнатной температуре (+18-25°C) и налить на планшет.

После застывания агарозы осторожно вынуть гребенку из геля и перенести его в камеру для проведения электрофореза.

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

8.6. Подключить электрофоретическую камеру к источнику питания и задать напряжение, соответствующее напряженности электрического поля 10-15 В/См. Провести электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+) в течение 30-45 мин.

8.7. Вынуть гель из камеры и перенести его на стекло трансиллюминатора.

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

8.8. Включить трансиллюминатор и проанализировать результаты анализа. Фрагменты анализируемой ДНК проявляются в виде светящихся оранжево-красных полос.

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

9. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

В отрицательном контрольном образце должна выявляться одна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю, размером 275 п.н.

В положительном контрольном образце должны выявляться одна полоса оранжево-красного цвета размером 370 п.н, а также одна полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю, размером 275 п.н.

Анализируемые пробы: отсутствие полосы оранжево-красного цвета строго на уровне положительного контрольного образца свидетельствует об отрицательном ответе на присутствие Гарднереллы; наличие полосы, соответствующей по электрофоретической подвижности положительному контрольному образцу – о присутствии Гарднереллы в анализируемой пробе. Во всех случаях должна выявляться полоса оранжево-красного цвета, соответствующая внутреннему контролю, размером 275 п.н.

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Комплект для выделения ДНК из анализируемых проб должен храниться при комнатной температуре (+18-25°C) в течение всего срока годности набора.

После вскрытия комплект для выделения ДНК из анализируемых проб может храниться при температуре +2-8°C в течение всего срока годности набора.

10.2. Комплект для проведения ПЦР должен храниться при температуре -20°C в течение всего срока годности набора. Допускается хранение этого комплекта при температуре 0°C не более 1 сут.

После вскрытия комплект для проведения ПЦР может храниться при температуре -20°C в течение всего срока годности набора.

10.3. Амплификационная смесь хранению не подлежит.

10.4. Допускается хранение 1хТАЕ буфера при температуре +2-8°C в течение 1 недели.

10.5. После вскрытия раствор бромистого этидия может храниться при комнатной температуре (+18-25°C) в течение всего срока годности набора.

10.6. Срок годности набора - 6 мес.

10.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества набора ГАРДПОЛ, следует обращаться в НПФ «Литех» по адресу:

119828, г. Москва, ул. Малая Пироговская 1а,
телефон/факс: (095)246-45-01, или (e.mail) pcr@lytech.msk.ru

и в Институт государственного контроля лекарственных средств НЦ ЭГКЛС МЗ РФ по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д.14 а,
тел: (095)120-60-95; 120-60-96.

Ведущий научный сотрудник
НПФ "ЛИТЕХ" при НИИ ФХМ
МЗ РФ, д.б.н.



ГОВОРУН В.М.

Зам. директора НИИ ФХМ МЗ РФ,
член - корр. РАМН



СЕРГИЕНКО В.И.