

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

“ _____ ” _____ 2014г.

Регистрационный №250-1213

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОВ/ТИПОВ
ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА
ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА**

инструкция по применению

Учреждение-разработчик:

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический
центр эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ:

д.м.н. В.Ф. Еремин, к.б.н. Е.Л. Гасич, к.м.н. Вергейчик Г.И., Сосинович
С.В., Шишкин Е.А., Нестеровская Е.А., Домнич М.В.

Минск, 2014

В настоящей инструкции по применению (далее-инструкция) представлен метод определения вида/типа вирусов папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска и филогенетических связей между вирусами.

Инструкция предназначена для врачей-вирусологов, врачей-гинекологов, врачей-онкологов, врачей-эпидемиологов, врачей-иммунологов.

1. КОНТИНГЕНТЫ, ПОДЛЕЖАЩИЕ МОНИТОРИНГУ

1. Впервые выявленные случаи ВПЧ-инфекции (CIN 2-3, рак *in situ*, микроинвазивный рак).
2. ВПЧ-инфекция у пациентов с рецидивом после противовирусной терапии, хирургического вмешательства;
3. Дети и взрослые до вакцинации против ВПЧ высокого онкогенного риска;
4. Дети и взрослые после вакцинации против ВПЧ высокого онкогенного риска;

2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ:

1. Пробирки с транспортной средой для взятия урогенитальных соскобов;
2. Морозильная камера, в которой поддерживается температура не ниже -20°C;
3. Прилавок с температурой -70°C;
4. Специальные термоконтейнеры, термосы для хранения и транспортировки пробирок с биологическим материалом;
5. Твердофазный термостат для пробирок объемом 1.5 мл, 25-100°C;
6. Микроцентрифуги (5000-12000 об/мин) под пробирки объемом 0.5, 1.5 мл – 2 шт.
7. Центрифуга/вортекс (1500-3000 об/мин), под пробирки объемом 0.5, 1.5 мл – 2 шт.;
8. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема – 3 комплекта;

9. Амплификатор (программируемый микротермостат с термостатируемой крышкой);
10. УФ трансиллюминатор с видеокамерой для регистрации гелей с программным обеспечением;
11. Камера для горизонтального электрофореза с источником питания;
12. Специализированные ПЦР боксы (ламинарные шкафы) с бактерицидной лампой;
13. Халаты и одноразовые резиновые перчатки;
14. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5, 0,5 и 0,2 мл.
15. Штативы для микропробирок и наконечников.
16. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема до 10, 100, 200 и 1000 мкл;
17. Одноразовые наконечники с аэрозольным фильтром для пипеток переменного объема до 10, 100, 200 и 1000 мкл;
18. Холодильники с рабочей температурой +2-8⁰С с морозильной камерой;
19. Емкости с дезинфицирующим раствором;
20. Наборы для выделения ДНК;
21. Агароза;
22. 50 x TAE буфер;
23. Дистиллированная вода;
24. 1% раствор бромистого этидия;
25. Генетический анализатор;
26. Программное обеспечение для оценки и учета результатов секвенирования;
27. Персональный компьютер (2);
28. Ацетат натрия;
29. Этиловый спирт;

3. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

3.1. Забор материала и его транспортировка в ПЦР-лабораторию.

Материал у женщин забирается цитощеткой в пробирку объемом 2 мл с «Транспортной средой для клинического материала из урогенитального тракта женщин» в 0.5 мл среды. Соскоб эпителия делается из цервикального канала и с поверхности шейки матки двумя разными цитощетками. Рабочую поверхность цитощетки необходимо тщательно обмыть в транспортной среде и оставить в пробирке.

У мужчин соскоб эпителия делается универсальным зондом из уретры. Материал помещается в пробирку на 2 мл с транспортной средой в объеме 0.5 мл.

3.1.1 Правила транспортировки и хранения материала

Пробирки с биологическим материалом должны быть доставлены в ПЦР-лабораторию при возможности непосредственно в день забора материала. Хранить биологический материал можно не более 1 недели при температуре от 18 до 25 °С и в течение 20 суток – при температуре +2 - 8 °С и до года при температуре -16 – 24°С.

Транспортировка клинического материала должна осуществляться в соответствии с требованиями по перевозке биологического материала в специальных термоконтейнерах с охлаждающими элементами или термосах со льдом в течение 1 суток. Каждый образец, для исключения взаимной контаминации, хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

3.2 Основные правила безопасности

3.2.1 Сотрудники допускаются к работе только после проведения инструктажа по соблюдению требований биологической безопасности.

3.2.2 Все работы проводятся в изолированных помещениях (зонах), аккредитованных для работы методом ПЦР. Посторонние лица в лабораторию не допускаются. Во время работы двери боксов и

предбоксов должны быть закрыты; выход из бокса во время проведения работы запрещается.

3.2.3 При работе обязательно использование сменных медицинских халатов, сменной обуви, защитных масок и перчаток. Запрещается выходить из рабочих помещений в специальной одежде.

3.2.4 Работа с ДНК должна проводиться в ламинарных шкафах при строжайшем соблюдении правил асептики.

3.2.5 При работе с патогенным материалом следует четко выполнять санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности» (постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь 27.07.2000 № 40).

3.2.6 Все исследования проводятся в зонированных изолированных помещениях:

Зона 1 – выделение ДНК;

Зона 2 – проведение ПЦР;

Зона 3 – очистка полученных фрагментов и проведение секвенирующей ПЦР;

Зона 4 – секвенирование полученных фрагментов.

Каждая зона содержит свой набор оборудования и расходных материалов. При переходе из одной зоны в другую следует менять халаты, перчатки. Потенциально основной источник контаминации РНКазми – руки исследователя. Необходимо одевать и менять перчатки.

3.2.7 Всю лабораторную посуду, предназначенную для работы с ДНК, следует прожечь при 180°C в течение 8 часов (пипетки, цилиндры, флаконы, пробирки и т.д.) для предотвращения контаминации РНКазми. Всю пластиковую посуду простерилизовать.

3.2.8 После работы использованный материал погружают в емкость для инфекционного материала и обеззараживают 2 часа в 2% растворе полидеза (6% растворе перекиси водорода или другого подходящего дезинфектанта),

затем автоклавируют при 132°C 60 минут, после чего утилизируют в общем порядке.

3.2.9 Уборка производственных помещений лаборатории должна проводиться влажным способом с использованием дезинфицирующих растворов и моющих средств. После уборки производственные помещения облучают бактерицидными лампами в течение 60 минут.

Перед началом работы проводят обработку пола, стен, мебели боксового помещения дезинфицирующими средствами и облучение ультрафиолетом за 1 час до начала работы в течение не менее 30 минут. Рабочее пространство ламинарного шкафа и автоматические дозаторы перед работой обрабатывают с использованием спиртосодержащих антисептиков и ультрафиолетовых облучателей в течение не менее 30 минут.

4. Получение фрагментов ДНК ВПЧ для последующего секвенирования и филогенетического анализа.

4.1. Выделение ДНК ВПЧ. Для выделения ДНК ВПГ используются коммерческие наборы РНК/ДНК-сорб, РИБО-сорб, производства ЦНИИ эпидемиологии, г. Москва. Выделение проводят согласно инструкции, прилагаемой к набору. Допускается использование наборов других производителей, предназначенных для выделения ДНК вирусов.

4.2. Проведение реакции. Определение вида/типа ВПЧ-16 ген L1

Пары праймеров-температура отжига (L1L/L1R):

L1 L : ttgcctcctgtcccagtatc; - 60.5°C

L1 R : aatggctgaccacgacctac - 60.5°C

ПЦР проводится в конечном объеме 25 мкл в следующем режиме:

95 ⁰ - 3:00	}	35 циклов
95 ⁰ - 0:20		
59 ⁰ - 0:20		
72 ⁰ - 0:45		
72 ⁰ - 2:00		
10 ⁰ - хранение		

	ПЦР	Мастер-микст	х1	х4	
бдН ₂ О			15,8	63,2	
х 10 буфер	1 х	10 х	2,5	10	
MgCl ₂	2	25	2	8	mM
дНТПs		10	0,5	2	mM
Прямой праймер			0,5	2	pmol/мкл
Обратный праймер			0,5	2	pmol/мкл
Taq полимераза	1 U	5 U/μl	0,2	0,8	
Всего, мкл			22	88	
ДНК	3				

4.3 Учет результатов амплификации проводят в 2% агарозном геле.

Учет результатов проводится визуально. Молекулярная масса продуктов ПЦР определяется согласно молекулярной массе ДНК-маркера.

Специфический продукт ДНК при проведении ПЦР для L1 фрагмента ВПЧ-16 равен 330 пар нуклеотидов (рисунок 1).

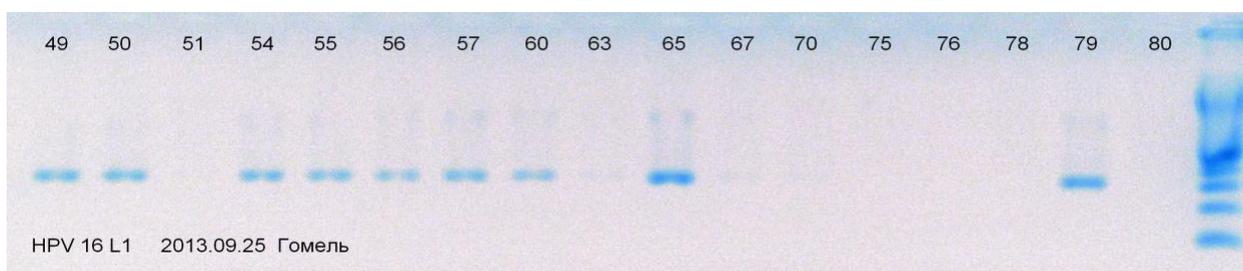


Рисунок 1 Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК ВПЧ-16 по участку гена L1, где номерами обозначены исследуемые образцы.

Определение вида/типа ВПЧ-18

Пары праймеров – температура отжига:

MY11, GCMCAGGGWCATAAAYAATGG -59°C

N0253, ¹⁵¹TCAGGTAGCTTGTAGGGTCCCGT¹²⁸ 68.5 C

LPCR3, ⁷⁴⁷³GGCAACCGAAATCGGTTGCAC⁷⁴⁵³ 63.2 C

ПЦР проводится в конечном объеме 25 мкл по следующему протоколу:

95°C – 5.00

95°C – 0.20

58°C – 0.20

72°C – 1.30

72°C – 5.00

10°C - хранение

} 35 циклов

4.4 Очистка полученных фрагментов проводится по стандартной методике с использованием микроконцентраторных пробирок YM 100.

4.5 Секвенирующая ПЦР, проводится по стандартной схеме:

В конечном объеме =20мкл.

А. ДНК (в рабочем разведении) – 4 мкл;

Б. праймер (прямой и обратный) – 4мкл

В. 5x буфер –4мкл

Г. BigDye терминатор – 4мкл

Л. дН₂О – 4мкл

96°C – 1 мин;

96°C – 10 сек

50°C – 5 сек

60°C – 4 мин

4°C – хранение

} 30 циклов

5. Проведение анализа полученных результатов и построение филогенетического дерева

Для анализа полученных секвенсов и определения филогенетических связей между проанализированными образцами

используются стандартные компьютерные программы: SeqScape, BioEdit, MEGA 6 (рисунок 2).

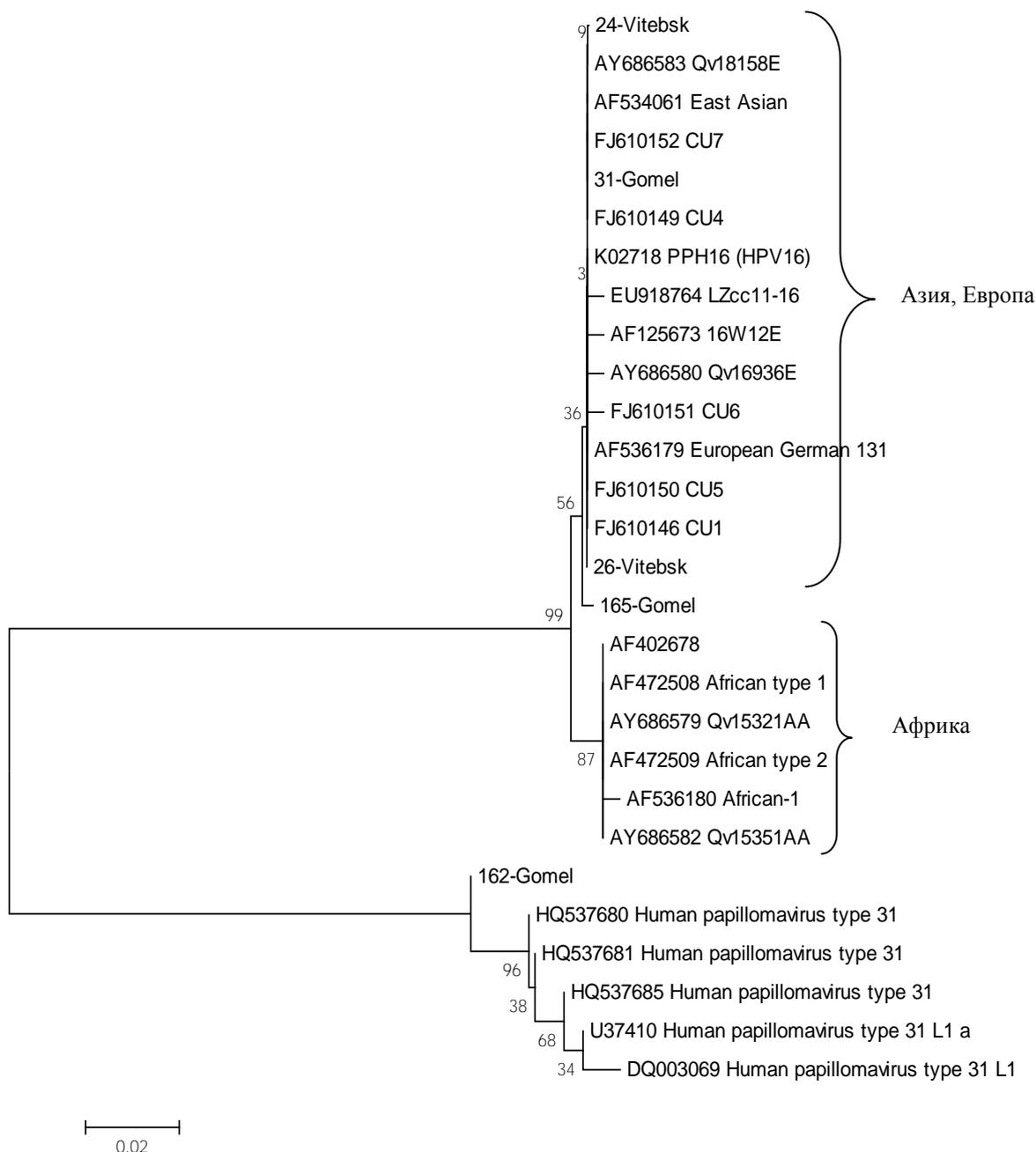


Рисунок. 2. Филогенетический анализ образцов ВПЧ-16 и ВПЧ-31 по фрагменту гена L1

6 Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения

Риск возникновения осложнений отсутствует, поскольку все исследования проводятся *in vitro*.