

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
23.12.2013
Регистрационный № 007-1013

**МЕТОД ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ДНК
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КОКЛЮША (*BORDETELLA PERTUSSIS*),
ПАРАКОКЛЮША (*BORDETELLA PARAPERTUSSIS*)
В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук В.Л. Колодкина, В.С. Мартынов

Минск 2013

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, использование которого повысит эффективность лабораторной диагностики коклюшной и паракоклюшной инфекций в Республике Беларусь.

Инструкция предназначена для врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-лабораторной диагностики, врачей-инфекционистов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Автоматические дозаторы переменного объема (0,1–10; 20–200; 100–1000 мкл).
2. Вортекс.
3. Компьютер с программным обеспечением для управления прибором ПЦР в режиме реального времени, хранения данных и анализа.
4. Ламинарный бокс с бактерицидной лампой.
5. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13 тыс. об./мин.
6. Морозильник.
7. Набор реагентов для выделения ДНК из клинических образцов.
8. Набор олигонуклеотидов (праймеров и проб).
9. Одноразовые наконечники с фильтром до 10; 100; 200; 1000 мкл.
10. Одноразовые пластиковые микропробирки на 0,2; 0,5; 1,5 мл.
11. Одноразовая пластиковая посуда для постановки ПЦР в режиме реального времени: микропробирки, стрипы, 96-луночные плашки (посуда должна подходить к прибору, на котором ставится РТ-ПЦР).
12. Реактивы для проведения ПЦР: фермент *Taq* ДНК-полимераза (5 ед./мкл); 10×буфер для *Taq* полимеразы без $MgCl_2$; 10 мМ смесь дНТФ; 25 мМ раствор $MgCl_2$; ДМСО 25%.
13. Твердотельный термостат для микропробирок на 1,5 и 0,5 мл.
14. Термоциклер для проведения ПЦР в режиме реального времени.
15. Холодильник.
16. Штативы для микропробирок, автоматических пипеток и наконечников к автоматическим пипеткам.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Необходимость выявления и дифференциации возбудителей коклюша и паракоклюша у кашляющих пациентов.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Подготовка клинических образцов для исследования

1.1. Клинический материал:

- мазки со слизистой задней стенки ротоглотки;
- секционный материал (трахеи и легких);
- культуры микроорганизмов.

К мазку, взятому сухим ватным тампоном и помещенному в стерильную пластиковую пробирку (1,5–2 мл), добавляют 300 мкл стерильной бидистиллированной воды и тщательно перемешивают на вортексе. Тампон аккуратно удаляют из пробирки стерильным пинцетом, отжав его о стенки пробирки. Полученный смыв с тампона используют для выделения ДНК.

Хранение мазков: мазки анализируются немедленно после поступления или приготовленный смыв с тампона хранится при -20°C .

Секционный материал гомогенизируют в лизирующем буфере, прилагаемом к набору для выделения ДНК, и полученную суспензию используют для выделения ДНК.

Культуры микроорганизмов: колонию микроорганизмов ресуспендируют в 1 мл 0,9% раствора натрия хлорида или 0,01 М калий-фосфатном буфере, рН 7,0. Полученную суспензию используют для выделения ДНК.

1.2. Выделение ДНК

Экстракцию ДНК возбудителей коклюша, паракоклюша из образцов клинического материала осуществляют стандартным методом с использованием коммерческого набора для выделения ДНК в соответствии с прилагаемой инструкцией. Выделенные образцы ДНК хранят при -20°C .

2. Мультиплексная TaqMan ПЦР в режиме реального времени

Таблица 1 — Нуклеотидная последовательность и концентрация праймеров и проб для РТ-ПЦР

Возбудитель/ мишень	Праймер/ проба	Последовательность нуклеотидов (5'- 3')	Длина ПЦР продукта (п.н.)	Оптимальная концентрация, nM
<i>B. pertussis</i> IS481	Прямой обратный проба	ATCAAGCACCGCTTTACCC TGAGCGTAAGCCCCTCAC FAM-ACCGCCCACAGACCAATGGC- BHQ1	95	450 450 450
<i>B. parapertussis</i> IS1001	Прямой обратный проба	AAACCCGATGACTCGTATGC ATCTGGGAGATCGCATGAAC FAM- TGCCGTATGGGTTCAGATTGGGA- BHQ1	118	300 300 300
<i>B. parapertussis</i> IS1001	Прямой обратный проба	ACAGGCGGAGATCGTCTATG ATCCTGGCGTAGTTGATTGG Cy-5- ACGAGAGGTCATTGATCGGGTGC- BHQ2	103	150 150 150
Ген человека GAPDH (glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase)	Прямой обратный проба	GGCTCCCTTGGGTATATGGT TTGATTTTGGAGGGATCTCG TAMRA- ACCTTGTGTCCCTCAATATGGTCCT -BHQ2	120	200 200 200

Все олигонуклеотиды синтезируют под заказ в высушенном виде. Каждый олигонуклеотид растворяют отдельно в бидистиллированной воде. Для удобства

готовят растворы праймеров и проб с конечной концентрацией равной 75 мкМ. Разведения готовят по формуле: $V [H_2O] = n [праймера / пробы] / C [раствора]$.

Пример: если количество (n) высушенного праймера/пробы в пробирке равно 27,5 нмоль, то для приготовления раствора с концентрацией [C], равной 75 мкМ, необходимо добавить H₂O в объеме (V) 366 мкл.

Полученные растворы могут храниться длительное время при -20°C. Однако следует избегать многократного их размораживания и замораживания.

Для удобства из растворов праймеров/проб с концентрацией 75 мкМ готовят две рабочие двадцатипятикратные (25x) смеси.

Смесь № 1 включает набор праймеров и пробы к мишени IS481 и набор праймеров и пробы к мишени IS1001.

Смесь № 2 включает набор праймеров и пробы к тиолазному гену и набор праймеров и пробы к гену GAPDH человека.

Концентрация праймеров и проб в смесях №№ 1 и 2 в 25 раз выше конечной концентрации праймеров и проб в реакционной смеси для ПЦР.

Объем каждого праймера и пробы для приготовления 25x смеси рассчитывается по формуле:

$$V = C_k * V_k / C_{и},$$

где V — необходимый объем праймера/пробы;

C_к — конечная концентрация праймера/пробы;

V_к — конечный объем смеси;

C_и — исходная концентрация праймера.

Таблица 2 — Приготовление 25x смеси № 1

Объем смеси № 1, мкл	Объем прямого, обратного праймеров и пробы к IS 481, мкл	Объем прямого, обратного праймеров и пробы к IS 1001, мкл	Объем H ₂ O (мкл)
100	15 × 3	5 × 3	40
200	31,3 × 3	10 × 3	131,6
300	45 × 3	15 × 3	120
400	60 × 3	20 × 3	160
500	75 × 3	25 × 3	200

Таблица 3 — Приготовление 25х смеси № 2

Объем смеси № 2, мкл	Объем прямого, обратного праймеров и пробы к гену тиолазы, мкл	Объем прямого, обратного праймеров и пробы к гену человека, мкл	Объем H ₂ O (мкл)
100	10 × 3	6,7 × 3	49,9
200	20 × 3	13,3 × 3	135,6
300	30 × 3	22,5 × 3	142,5
400	40 × 3	26,7 × 3	199,9
500	50 × 3	33,3 × 3	250,1

Общий пул приготовленной 25-кратной смеси праймеров и проб разливают в пробирки по 20 или 50 мкл и хранят при -20°C, избегая многократного размораживания и замораживания растворов. Смесь размораживается непосредственно перед постановкой ПЦР. Для постановки РТ-ПЦР готовят параллельно две реакционные смеси, которые отличаются только смесью праймеров и проб. В первую смесь добавляют 25х смесь праймеров и проб № 1, во вторую — 25х смесь праймеров и проб № 2.

Таблица 4 — Реакционная смесь для ПЦР №№ 1 и 2

Реагенты	Концентрация	Объем на одну реакцию, мкл	Объем на N реакций, мкл	Конечная концентрация в реакционной смеси
ПЦР буфер	10х	2,5	2,5·(N+1)	1х
MgCl ₂	50 мМ	2	2·(N+1)	4 мМ
дНТФ	10 мМ	0,5	0,5·(N+1)	0,2 мМ
Смесь праймеров и проб № 1 или № 2	25х	1	1·(N+1)	1х
ДМСО	25%	2,5	2,5·(N+1)	2,5%
Тақ-полимераза	5 ед./мкл	0,4	0,4·(N+1)	2 ед./реакцию
H ₂ O деионизированая		11,1	11,1·(N+1)	
Вся смесь		20	20·(N+1)	

Приготовленные реакционные смеси разливают в лунки планшета или пробирки для РТ-ПЦР по 20 мкл так, чтобы на каждый образец и контроли приходилось по две лунки со смесью № 1 и по две лунки со смесью № 2. По 5 мкл ДНК-образца добавляют в соответствующие лунки со смесью № 1 и параллельно в

лунки со смесью № 2. Положительный контроль в объеме 5 мкл добавляют в лунки в последнюю очередь. В качестве положительного контроля используют смесь ДНК *B. pertussis*, *B. parapertussis* (по 100 копий геномной ДНК на реакцию) и ДНК человека (50 пг на реакцию). В качестве отрицательного контроля используют 5 мкл H₂O.

Приготовление реакционных смесей, раскапывание их в лунки планшета или пробирки и добавление ДНК-образцов проводится на льду. Перед постановкой в амплификатор следует осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на центрифуге/вортексе (1–3 с) или встряхиванием планшета.

2.1. Амплификация с детекцией в режиме реального времени

Запрограммировать прибор (амплификатор с системой детекции в режиме реального времени) для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала (таблица 5).

Таблица 5 — Программа амплификации ДНК

Температура, °С	Время	Кол-во циклов
95	5 мин	1
95	10 с	40
60	1 мин детекция флуоресцентного сигнала	

Детекция флуоресцентного сигнала проводится по каналам для флюорофоров FAM/Green и Cy5/Red для проб с реакционной смесью № 1 и для флюорофоров FAM/Green и TAMRA/Orange для проб с реакционной смесью № 2.

Установить планшет или пробирки в ячейки реакционного модуля прибора.

Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала.

По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

3. Результаты

3.1. Определение

C_T -значение — номер цикла в котором сигнал флюоресценции пересекает пороговую линию (threshold).

Threshold — пороговый уровень флюоресценции.

Примечание — Величина Threshold устанавливается вручную на уровне 10% (FAM, TAMRA, Cy5) от максимального уровня флюоресценции положительного контрольного образца (ПКО) в последнем цикле амплификации. При этом кривая флюоресценции ПКО должна пересекать пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флюоресценции, переходящего в линейный подъем.

3.2. Анализ и интерпретация результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты интерпретируются на основании наличия (или отсутствия)

пересечения кривой флуоресценции на каждом из используемых каналов с установленной на соответствующем уровне пороговой линией, что определяет наличие (или отсутствие) для данной пробы ДНК значения порогового цикла C_T .

Таблица 6 — Гены-мишени и их каналы детекции

№ реакции/ реакционной смеси	№ 1		№ 2	
	Канал детекции	FAM/Green	Cy5/Red	FAM/Green
Ген-мишень	IS 481	IS 1001	ген тиолазы	ген GAPDH человека

Принцип анализа результатов амплификации следующий: анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по четырем каналам.

Результат амплификации по каналу считается **положительным**, если кривая флуоресценции имеет типичный для ПЦР в режиме реального времени S-образную форму, однократно пересекается с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции, и значение порогового цикла C_T для данного канала менее граничного значения, **отрицательным** — в случае отсутствия кривой типичной формы, не пересекающейся с пороговой линией (нет значения C_T) или если определено значение порогового цикла C_T , превышающее указанное граничное значение.

Образец считается положительным на ДНК *B. pertussis*, если сигнал продуцируется в двух каналах: FAM/Green на IS481 и FAM/Green на ген тиолазы и значение C_T ниже 40 для обеих мишеней, или сигнал продуцируется дважды только в канале FAM/Green на IS481 при повторном исследовании новой аликвоты.

Образец считается положительным на ДНК *B. parapertussis* если сигнал продуцируется в канале Cy5/Red на IS1001 и значение C_T ниже 40.

Образец считается отрицательным, если сигнал флуоресценции отсутствует в каналах FAM/Green на мишень IS481, FAM/Green на тиолазный ген и Cy5/Red на IS1001 или значение C_T сигнала флуоресценции равно или выше 40, но при этом сигнал присутствует в канале TAMRA/Orange на ген GAPDH человека и значение C_T ниже 40.

3.3. Достоверность результатов ПЦР

Результаты реакции считаются достоверными, если в положительном контроле сигнал флуоресценции присутствует по всем четырем каналам, а в негативном контроле сигнал флуоресценции отсутствует по всем четырем каналам.

Если в лунках с клиническим образцом отсутствует сигнал флуоресценции по всем четырем каналам, включая канал TAMRA/Orange на ген GAPDH человека, то результат по данному клиническому образцу считается недостоверным.

Если сигнал флуоресценции в лунках с клиническим образцом присутствует в канале FAM/Green на ген тиолазы и отсутствует в канале FAM/Green на IS481, то результат по данному клиническому образцу считается недостоверным в независимости от результатов по другим каналам.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Проблемы	Возможные причины	Способы решения
1. В пробе положительного контроля значение порогового цикла C_T по соответствующему каналу отсутствует или превышает граничное значение	ДНК в положительном контроле разрушилась; разрушились пробы, меченные флуоресцентным красителем, или праймеры	Повторить амплификацию для всех отрицательных клинических образцов с использованием нового положительного контроля и (или) новых наборов праймеров и проб; соблюдать правила их транспортировки и хранения
2. Кривая флуоресценции в клинических образцах пересекает пороговое значение, но не имеет типичной S-образной формы	Наличие примесей в клинических образцах	Более тщательная очистка при выделении ДНК из клинических образцов
3. В пробе отрицательного контроля по любому из каналов FAM, Cy5, FAM, TAMRA зафиксировано значение порогового цикла C_T	Загрязнение отрицательного контроля	Повторить исследование для всех положительных образцов с использованием нового отрицательного контроля; предпринять меры по выявлению и ликвидации источника возможной контаминации