**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ**
**РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра здравоохранения

_____ В.В. Колбанов

13 мая 2005 г.
Регистрационный № 56–0405

# АНАЛИЗ НАЛИЧИЯ ДНК CHLAMYDIA TRACHOMATIS, MYCOPLASMA HOMINIS И UREAPLASMA UREALYTICUM МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ НА ОСНОВАНИИ ОЦЕНКИ НА ЭТАПЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА РАЗМЕРА, ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕЧЕНИЯ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ ФРАГМЕНТА МОЛЕКУЛЫ ДНК

Инструкция по применению

***Учреждение-разработчик:*** Белорусская медицинская академия последипломного образования

***Авторы:*** канд. мед. наук С.А. Костюк, д-р мед. наук, проф. Г.Я. Хулуп

## 1. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Проведение дифференциальной диагностики при идентификации ДНК возбудителей *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической схемой детекции.

2. Снижение числа ложноположительных результатов при проведении исследований методом ПЦР с электрофоретической схемой детекции.

## 2. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ И МАТЕРИАЛОВ

1. Амплификатор.
2. УФ-трансиллюминатор.
3. Видеокамера для регистрации гелей и компьютер.
4. Камера для горизонтального электрофореза.
5. Микроцентрифуги-вортексы.
6. Микротермостаты.
7. Микропробирки 1,5 и 0,5 мл.
8. Морозильник с рабочей температурой –20 °С.
9. Холодильник с рабочей температурой +2–8 °С.
10. СВЧ-печь.
11. Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, переменным объемом 0,5–10 мкл, 5–50 мкл, 50–200 мкл, 200–1000 мкл.
12. Одноразовые полипропиленовые микроцентрифужные пробирки с плотно закрывающимися крышками объемом 1,5 и 0,5 мл.
13. Одноразовые наконечники до 300 мкл и до 1000 мкл.
14. Штативы для микропробирок и наконечников.
15. Физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.
16. Перчатки резиновые хирургические.
17. Состав и концентрации компонентов на проведение 100 выделений ДНК:

17.1. Лизирующий раствор — 6 М раствор гуанидина изотиоцианата в объеме 30 мл.

17.2. Промывочный раствор — 96% этанол, содержащий 100 ммоль ацетат натрия (pH 4,8) в объеме 10 мл.

17.3. Промывочный раствор — 70% этанол, содержащий 100 ммоль ацетат натрия (pH 4,8) в объеме 200 мл.

17.4. Сорбент — суспензия $SiO_2$ 1000 мкл.

17.5. ТЕ буфер — на 1 л буфера: 0,04 моль Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты), 0,002 моль ЭДТА (100 мл 0,5 моль ЭДТА pH 8,0) — 5 мл.

18. Состав и концентрации компонентов смеси ПЦР в объеме 100 мкл:

18.1. ПЦР-буфер ×10 (десятикратный) 10 мкл.

18.2. Раствор 4-дезоксинуклеозидтрифосфатов (ДНТФ):

– дАТФ (дезоксиаденозинтрифосфат) — 10 ммоль — 8 мкл;

– дГТФ (дезоксигуанозинтрифосфат) — 10 ммоль — 8 мкл;

– дЦТФ (дезоксицатидинтрифосфат) — 10 ммоль — 8 мкл;

– дТТФ (дезоксицимидинтрифосфат) — 10 ммоль — 8 мкл.

18.3. Праймер 1 (5 нмоль в 200 мкл) — 1–5 мкл.

18.4. Праймер 2 (5 нмоль в 200 мкл) — 1–5 мкл.

18.5. Taq-ДНК-полимераза 5,0 ед/1 мкл — 0,5 мкл.

18.6. MgCL (25 ммоль) — 4–16 мкл.

18.7. Амплифицируемая ДНК-матрица (не более 1 мкг на пробирку (конечный объем 100 мкл)).

19. Дистиллированная вода.

20. Агароза.

21. 50× ТАЕ буфера для электрофореза.

22. 10 мкл 1% раствора бромистого этидия.

## 3. ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

### 3.1. Выделение ДНК — подготовка исследуемой пробы для амплификации

3.1.1. К 100 мкл физиологического раствора, содержащего клинический материал в пробирке объемом 1,5 мл, добавляют 300 мкл раствора I (лизирующего, 6 М раствор гуанидина изотиоцианата) и 10 мкл суспензии сорбента ($SiO_2$).

3.1.2. Пробы инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре, 1–2 раза перемешивая на микроцентрифуге при 1500 об./мин.

3.1.3. Пробы центрифугируют в течение 15 с на микроцентрифуге при 12 000 об./мин, супернатант удаляют.

3.1.4. К осадку добавляют 100 мкл раствора II (промывочного, 96% этанол, содержащий 100 ммоль ацетат натрия (pH 4,8)), встряхивают и центрифугируют.

3.1.5. Процедуру отмывки повторяют 2 раза с использованием раствора III (промывочного, 70% этанол).

3.1.6. Пробирки помещают в микротермостат и подсушивают пробы 5 мин при температуре 50 °С, оставляя пробирки открытыми.

3.1.7. К осадку добавляют 50 мкл ТЕ-буфера (на 1 л буфера: 0,04 моль Трис-ацетат (242 г Трис, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты), 0,002 моль ЭДТА (100 мл 0,5 моль ЭДТА pH 8,0)) и инкубируют в течение 5 мин при 50 °С.

3.1.8. Пробирки центрифугируют в течение 15 с при 12 000 об./мин.

3.1.9. Водную фазу используют в качестве исследуемого образца ДНК для постановки реакции амплификации.

**3.2. Проведение амплификации**

3.2.1. Подготовка к проведению ПЦР.

3.2.1.1. Перед началом работы вынуть из морозильника комплект реагентов для ПЦР-амплификации (за исключением Taq-полимеразы), разморозить содержимое пробирок при комнатной температуре (+18–25 °С), тщательно перемешать и поместить все пробирки в ледяную баню.

3.2.1.2. Промаркировать соответствующим образом необходимое количество амплификационных пробирок вместимостью 0,5 мл для анализируемого биоматериала, а также по одной пробирке положительного контроля для каждого возбудителя — *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* и отрицательного контрольного образца — деионизированная вода.

3.2.1.3. В отдельных пластиковых пробирках приготовить реакционную смесь с праймерами и внутренним контролем (из расчета на 1 пробу) для амплификации ДНК возбудителей: 20 мкл амплификационной смеси, состоящей из 17,5 мкл деионизированной воды, 2,5 мкл реакционной смеси и 0,2 мкл Taq-полимеразы.

При приготовлении этой смеси расчет проводится по количеству анализируемых проб (N) с запасом на 1 пробу (N+1).

Смеси перемешивают на микроцентрифуге-вортексе (3000 об./мин 30 с).

### 3.3. Собственно проведение ПЦР

3.3.1. Во все амплификационные пробирки внести по 20 мкл реакционной смеси с праймерами, ферментом и внутренним контролем, тщательно перемешанной на микроценитрифуге-вортексе в течение 5 с при 1500 об./мин.

3.3.2. В пробирки положительных контролей *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* внести по 5 мкл стандарта контрольных ДНК возбудителей, в пробирку отрицательного контроля — 5 мкл деионизированной дистилированной воды.

3.3.3. Во все амплификационные пробирки добавить по 5 мкл выделенной ДНК из биологических проб, тщательно перемешать на микроцентрифуге-вортексе в течение 5 с при 1500 об./мин для осаждения исследуемой ДНК.

3.3.4. В каждую пробирку наслоить по 20 мкл (1 капля) минерального масла.

3.3.5. Установить все пробирки в блок программируемого амплификатора и провести ПЦР в следующем режиме, с учетом объема реакционной смеси, равного 20 мкл :

I. Начальный этап — +93 °С 30 с.

II. Основной этап:

1. Расплетание двойной спирали ДНК (денатурация ДНК) +93 °С 10 с.

2. Присоединение (отжиг) праймеров +60 °С 10 с — 30 циклов.

3. Комплементарное достраивание цепей ДНК (синтез фрагмента ДНК) +72 °С 10 с.

Режим амплификации включает 35 циклов основного этапа.

III. Заключительный этап — +72 °С 60 с.

### 3.4. Электрофоретическая детекция продукта ПЦР

3.4.1. Подготовка камеры и буферных растворов.

3.4.1.1. Приготовление 2% агарозного геля: к 2,0 г агарозы добавить 2 мл 50х ТАЕ буфера для электрофореза и 98 мл дистиллированной воды. Смесь в термостойкой колбе нагревать в СВЧ-печи, пока агароза не расплавится, охлаждают до +50 °С, добавляют

10 мкл 1% раствора бромистого этидия, перемешивают и выливают, при этом образуется слой агарозы высотой 4 мм. С помощью специальной гребенки на анодном конце геля сформировать лунки для нанесения проб. Между дном лунок и основанием геля должен оставаться слой агарозы 0,5–1,0 мм.

3.4.1.2. Приготовление буферного раствора для электрофореза: смешать 20 мл 50х ТАЕ буфера с 980 мл дистиллированной воды. Хранить раствор при +4 °С в течение 10 дней. Допустимо повторное использование 4–5 раз.

3.4.2. Проведение электрофоретического разделения продуктов амплификации.

3.4.2.1. Буферные емкости заполнить буферным раствором для электрофореза в количестве 500 мл, при этом он покроет гель слоем 4–5 мм.

3.4.2.2. По окончании амплификации по 10–15 мкл смеси внести в лунки геля под буферный раствор для электрофореза.

3.4.2.3. С помощью источника тока с фиксированным напряжением 150 В провести электрофорез при градиенте напряжения 10–15 В/см в течение 20–30 мин, пока краситель не пройдет от анодного конца геля 2–3 см.

### 3.5. Идентификация результатов

3.5.1. Вынуть гель из камеры для электрофореза и перенести на стекло УФ-трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254–310 нм).

3.5.2. Анализ результатов проводить с использованием видеосистемы для регистрации гелей с документированием результатов электрофореза фотографированием геля.

3.5.3. Идентификацию результатов осуществлять по следующим критериям (см. табл.):

– выявление в биологических пробах специфического ПЦР-продукта;

– соответствие размера ДНК-продукта в клиническом образце размеру ДНК-продукта контрольной пробы;

– соответствие молекулярной массы ДНК-продукта в клиническом образце размеру ДНК-продукта контрольной пробы;

– соответствие интенсивности свечения ДНК-продукта в клиническом образце размеру ДНК-продукта контрольной пробы.

При анализе биологические пробы считать положительными, если:

– молекулярные характеристики ДНК-продукта в клиническом образце соответствуют молекулярным характеристикам ДНК-продукта контрольной пробы.

Результаты анализа биологического материала от пациентов считать отрицательными, если:

– в пробе, содержащей клинический образец, специфических ДНК-продуктов не обнаружено или он выявлен, но его молекулярные характеристики ДНК не соответствуют молекулярным характеристикам фрагмента молекулы контрольной ДНК возбудителя (см. табл.).

При получении фрагмента ДНК с молекулярной массой от 35 000 до 40 000 о. е. размером 465–475 пар нуклеотидов и интенсивностью свечения 70–90 о.е. судят о наличии в исследуемом биологическом материале *Chlamydia trachomatis*. При получении фрагмента ДНК с молекулярной массой от 75 000 до 80 000 о.е. размером 950–960 пар нуклеотидов и интенсивностью свечения 110–130 о.е. судят о наличии *Mycoplasma hominis*, а при получении фрагмента ДНК с молекулярной массой от 52 000 до 57 000 о.е. размером 650–660 пар нуклеотидов и интенсивностью свечения 60–80 о.е. судят о наличии *Ureaplasma urealyticum*.

**Молекулярные характеристики контрольных ДНК Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis и Ureaplasma urealyticum — молекулярная масса, число пар нуклеотидов и интенсивность свечения**

| **Полосы фрагментов ДНК микроорганизмов** | **К+** | **К–** | **ДНК Chlamydia trachomatis** | **ДНК Mycoplasma hominis** | **ДНК Ureaplasma urealyticum** |
|---|---|---|---|---|---|
| Молекулярная масса | + | – | от 35 000 до 40 000 о.е. | от 75 000 до 80 000 о.е. | от 52 000 до 57 000 о.е. |
| Число пар нуклеотидов | + | – | 465–475 | 950–960 | 650–660 |
| Интенсивность свечения | + | – | 70–90 о.е. | 110–130 о.е. | 60–80 о.е. |
| Интерпретация | Методика анализа соблюдена | | Присутствие *Chlamydia trachomatis* | Присутствие *Mycoplasma hominis* | Присутствие *Ureaplasma urealyticum* |

## 4. ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Нарушение технологии выполнения ПЦР-анализа.

2. Нарушение требований к организации и правилам работы ПЦР-лаборатории.

3. Нарушение правил хранения реактивов.

4. Нарушение требований к проведению дезинфекции, обеззараживанию биологического материала и лабораторного оборудования.

5. Неправильное расположение планшетки с агарозным гелем в камере электрофореза.

**Пути устранения ошибок:**

1. Соблюдение последовательности операций и аккуратное выделение ДНК из анализируемого биологического материала является обязательным.

2. Все этапы проведения ПЦР выполняются в стерильных условиях в трех рабочих зонах:

– зона 1 — выделение ДНК возбудителей в биологических пробах;

– зона 2 — проведение синтеза ДНК или собственно амплификации;

– зона 3 — детекция и анализ результатов исследований.

Пробы из зоны 3 не следует переносить в зоны 1 и 2 во избежание контаминации ДНК-матрицей.

Работа должна проводиться в лабораторной одежде, сменяемой при переходе из одного помещения в другое, и в одноразовых перчатках, так как анализируемые биологические пробы являются потенциально опасным инфицированным материалом. Обработка одежды из разных помещений должна производиться отдельно. На разных этапах проведения ПЦР-анализа работать должны различные сотрудники.

Следует использовать отдельные наборы полуавтоматических пипеток, предназначенные для различных стадий анализа и непереносимые из одного помещения в другое.

3. Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы должны хранить-

ся и использоваться в небольших порциях. Клинические образцы следует хранить отдельно от реагентов.

4. Обязательно необходимо менять наконечники при переходе от пробы к пробе, желательно использовать наконечники с фильтром — аэрозольным барьером для предотвращения попадания микрокапель раствора в пипетку.

Использованные пробирки и наконечники должны сбрасываться в специальные контейнеры или емкости, содержащие дезинфицирующий раствор (1 Н соляная кислота, 10% гипохлорит натрия или 10% хлорная известь).

Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм. Облучение необходимо проводить в течение 1 ч до начала работы и в течение 1 ч после окончания работы.

5. Планшетку с лунки необходимо располагать от катода к аноду, то есть от «–», или черного электрода, к «+», или к красному электроду.