

МИНИСТЕРСТВО  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И МЕДИЦИНСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Московский научно-исследовательский институт  
педиатрии и детской хирургии  
Федеральный детский научно-практический центр  
противорадиационной защиты  
АОЗТ «Внедрение систем в медицину»

---

СОГЛАСОВАНО  
Начальник Управления науч-  
ных исследований  
О. Е. Нифантьев  
6 июля 1995 г.

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра  
Н. Н. Ваганов  
8 августа 1995 г.

ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИИНОЙ,  
МИКОПЛАЗМЕННЫХ И ГЕРПЕСВИРУСНЫХ  
ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ЦЕПНОЙ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ

Методические рекомендации № 95-106

Москва — 1995

По заказу Министерства здравоохранения и медицинской промышленности Российской Федерации в рамках реализации Федеральной программы «Дети Чернобыля».

Методические рекомендации разработаны сотрудниками Московского НИИ педиатрии и детской хирургии МЗМП РФ и Федерального детского научно-практического центра противорадиационной защиты: академиком РАМН Ю. Е. Вельтищевым, доктором мед. наук Л. С. Балевой, канд. биол. наук О. Д. Видута, канд. биол. наук Н. А. Федюшкиной и АОЗТ «Внедрение систем в медицину» канд. биол. наук В. Б. Макаровы, канд. физ.-мат. наук С. Н. Щербо, Н. Ю. Земляной, Н. И. Воронцовой, С. П. Зайцевой.

#### А И Н О Т А Ц И Я

Методические рекомендации содержат характеристику и описание метода цепной полимеразной реакции для диагностики заболеваний, вызываемых *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Herpes simplex*, *Cytomegalovirus*.

Диагностика хламидией, микоплазменной и герпесвирусной инфекций является актуальной для акушерско-гинекологической практики, неонатологии, педиатрии, урологии, венерологии, нефрологии, пульмонологии, офтальмологии, неврологии и определяется полигропизмом возбудителей к различным органам и тканям.

Реализацию данного предложения рекомендуется осуществлять в областных и городских многопрофильных больницах, диагностических центрах и клиниках НИИ медицинского профиля

## ВВЕДЕНИЕ

Серьезную проблему инфекционной патологии составляют персистентные инфекции, вызываемые герпесвирусами, хламидиями и микоплазмами. Важность проблемы обусловлена чрезвычайно широким их распространением, опасностью не только для заболевшего, но и его окружения, тяжелыми осложнениями и последствиями для здоровья населения и потомства. Для них характерна способность персистировать в организме с нерегулярной продукцией инфекционных частиц и обострениями хронической соматической патологии воспалительного характера. Инфекционный процесс может протекать как в тяжелой диссеминированной форме, так и в среднетяжелой и легкой. Наибольшее распространение имеет субклиническое течение инфекционного процесса и бессимптомное вирусносительство. Последние две формы особенно трудно диагностируются вследствие стертости клинической картины заболевания, невыраженности изменений показателей гуморального иммунитета и часто отрицательных результатов при использовании методов классической вирусологии и бактериологии.

Для правильного и своевременного лечения заболеваний, вызываемых различными инфекционными агентами, первой и важнейшей задачей является установление точного диагноза.

Для наиболее точного, правильного и быстрого определения инфекционного агента, определения новых типов (серотипов) патогенных агентов используются последние достижения медицинской и биологической науки, особенностью которых являются высокая чувствительность и специфичность диагностических приемов, особенно при хронических стадиях заболеваний. Этим требованиям отвечает лучше других метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), с помощью которого осуществляется увеличение количества копий детектируемого участка генома возбудителя, ограниченного последовательностями праймеров в миллионы раз с использованием фермента ДНК-полимеразы.

**СУЩНОСТЬ** ПЦР-диагностики заключается в выявлении возбудителя с помощью индикации специфичных участков генома. Метод обеспечивает самую высокую чувствительность и абсолютную специфичность определения инфекционного агента, начиная с самых ранних стадий развития инфекционного процесса.

**ОБЛАСТЬЮ ПРИМЕНЕНИЯ** ПЦР-диагностики хламидийной, микоплазменной и герпесвирусной инфекций является акушерско-гинекологическая практика, неонатология, педиатрия, урология, венерология, нефрология, пульмонология, офтальмология, неврология.

**НОВИЗНА** предлагаемой ПЦР-диагностики заключается в выявлении специфичных фрагментов геномов возбудителей с помощью созданной тест-системы. Разработан оригинальный метод выделения нуклеотидного материала из биологических проб пациентов. Высокая чувствительность диагностики хламидийной и микоплазменной инфекций определяется индикацией фрагментов плазмидной ДНК возбудителей за счет их высокой копийности. Специфичность выявления фрагментов генома герпесвирусов определяется тем, что амплифицируются наиболее консервативные участки уникальных последовательностей.

**ПРЕИМУЩЕСТВАМИ** данного метода диагностики являются возможность проведения **МАССОВЫХ** исследований, **САМАЯ ВЫСОКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И АБСОЛЮТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ**. Возможен анализ серонегативных пациентов **НАЧИНАЯ С САМЫХ РАННИХ** стадий инфекционного процесса, когда **ЛЕЧЕНИЕ НАИБОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНО**. Легко определяются патогенные возбудители, для которых не разработаны или затруднены методы культивирования.

**РЕАЛИЗАЦИЮ** данного предложения рекомендуется осуществлять на всех уровнях учреждений практического здравоохранения и клиниках **НИИ медицинского профилля**.

#### ОПИСАНИЕ МЕТОДА ПЦР

##### 1. Принцип метода ПЦР.

Полимеразная цепная реакция — это метод амплификации *in vitro*, с помощью которого в течение нескольких часов можно выделить и размножить определенную последовательность ДНК в количестве, превышающем исходную  $10^8$  раз. При амплификации с помощью ПЦР использую два олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующие участок ДНК, специфический для определяемого возбудителя. Процесс амплификации заключается в повторяю-

циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров ДНК-полимеразой. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними, удваивая количество копий этого участка ДНК. Амплифицированный участок именуют «ампликоном».

В результате происходит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента приблизительно по формуле  $2^n$ , где  $n$  — число прошедших циклов амплификации. Поскольку праймеры физически включаются в концы продуктов застройки, они детерминируют сам продукт реакции — фрагмент ДНК, равный по длине расстоянию между 5' — концами праймеров на исследуемом участке ДНК. Процесс амплификации идет эффективно, если использовать термостабильную ДНК-полимеразу, выделенную из бактерии *Thermus aquaticus* (Tag). К достоинствам указанной полимеразы относится то, что нет необходимости ее замены после каждого цикла, а также сравнительно высоком температурном оптимуме детерминируемой ею реакции (70—75° С), что значительно повышает специфичность, количественный выход и возможную длину синтезированных копий интересующей последовательности. Отметим, что температура достройки праймера 72° С очень близка к температуре, при которой Tag-полимераза проявляет максимальную активность. Считается, что Tag-полимераза синтезирует последовательность длиной 1000 нуклеотидов за 1 минуту.

Процесс подбора эффективных праймеров для ПЦР — процесс эмпирический, хотя созданы даже специальные компьютерные программы, основанные на термодинамических подходах. Праймеры для ПЦР обычно имеют длину 20 нуклеотидов. Можно синтезировать и более длинные затравки, но они редко бывают необходимы.

## 2. Биологические пробы.

Материалом для выявления вышеперечисленных возбудителей могут служить аспираты, носоглоточные смывы, соскобы из зева, моча, мазки из уретры, вагины и цервикального канала, соскобы клеток конъюнктивы и спинномозговая жидкость.

## 3. Подготовка клинических проб.

1. Чистым стерильным инструментом перенести мазок (соскоб) в 0,5 мл физиологического раствора в большую эплендорф. пробирку (на 1,5 мл).

2. Пробирку тщательно закрыть и перенести на хранение на  $-20^{\circ}\text{C}$  или сразу использовать для анализа.

#### 4. Обработка клинических проб перед проведением амплификации.

Соблюдение заданной последовательности операций и аккуратное выполнение подготовки клинического материала является обязательным условием, от которого зависит успешное выполнение всей работы.

1. Пробирку с пробой (свежая или размороженная после хранения) центрифугировать 10 мин. при 10 тыс. об/мин.

2. Осторожно отобрать супернатант, не задевая осадка. К осадку добавить 200 мкл PBS-буфера и слегка встряхнуть. При переходе от одной пробирки к другой обязательно менять наконечники.

3. Центрифугировать 10 мин. при 10 тыс. об/мин.

4. Осторожно отобрать супернатант и к осадку добавить 40 мкл буфера К и интенсивно перемешать пипетированием. Обязательно менять наконечники при переходе от пробы к пробе.

5. Тщательно закрыть пробирку и перенести на 10 мин. в водянную баню при  $95^{\circ}\text{C}$ .

6. Центрифугировать пробирку в течение 30 сек. при 4 тыс. об/мин.

Полученный супернатант готов для проведения амплификации в течение суток (хранить в морозильнике при  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

#### 5. Проведение амплификации и оценка результатов.

1. Приготовить пронумерованные маленькие эпендорфы (0,5 мл) для проведения реакции. Количество маленьких пробирок соответствует количеству анализируемых проб плюс две пробирки для отрицательного и положительного контролей.

2. Непосредственно перед реакцией развести полимеразу в 10 раз в ПЦР-буфере, в свою очередь, разбавленном в 10 раз водой.

**ВНИМАНИЕ!** Работу с полимеразой следует проводить, помещая пробирки в лед! Разведенную полимеразу не хранить!

3. Приготовление супермиксов представлено в таблице.

Г а б л и ц а

Количество пробирок	ПЦР-буфер, мкл	dNTP, мкл	Праймеры, мкл	Полимераза разв., мкл
4	20	20	20	4
8	40	40	40	8
12	60	60	60	12
16	80	80	80	16
20	100	100	100	20
24	120	120	120	24

Для выявления каждого конкретного возбудителя используется своя пара праймеров, фланкирующих участок ДНК, специфический для определенного возбудителя.

При переходе от одного компонента к другому обязательно сбрасывать наконечники!

4. Приготовленный супермикс разлить по 20 мкл в маленькие эпендорфы.

5. В отрицательный контроль добавить 5 мкл дистиллированной воды.

6. В анализируемые пробы добавить 5 мкл приготовленных клинических образцов. При переходе от одной пробирки к другой обязательно менять наконечник.

7. Добавить по 2 капли масла во все пробирки, тщательно закрыть.

8. В положительный контроль (под масло) добавить 5 мкл контрольной ДНК. Сбросить наконечник!

9. Поставить пробирки на амплификацию.

10. Провести амплификацию, используя следующую программу: 94°C — 1,0 мин, 60°C — 1,0 мин, 72°C — 1,5 мин. Количество циклов — 30.

11. Выявление продуктов амплификации осуществляется с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Идентификация амплификата проводится в УФ-свете по положению полосы в анализируемой пробе строго на уровне положительного контроля.

12. В зависимости от интенсивности свечения полосы в анализируемых пробах относительно положительного контроля можно давать визуальную оценку положительной реакции — слабая или сильная.

## ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Лабораторное оборудование и тест-системы для проведения ПЦР-диагностики разработаны и внедрены АОЗТ «Внедрение систем в медицину».

1. Программируемый термостат — прибор для проведения амплификации (умножения) детектируемого участка генома возбудителя заболеваний. Прибор рассчитан на одновременный анализ 24 образцов (из которых один положительный и один отрицательный контроль) клинического материала.

2. Микроцентрифуга предназначена для подготовки проб исследуемого клинического материала. Обеспечивает максимальную частоту вращения ротора 11000 об/мин.

3. Источник тока — лабораторный, предназначен для подачи постоянного напряжения в пределах от 20 до 200 В при токе нагрузки до 100 мА. Источник тока предназначен для проведения электрофореза и соединяется с камерой для электрофореза.

Камера для электрофореза предназначена для электротического анализа исследуемых клинических образцов.

5. Трансиллюминатор (источник ультрафиолетового излучения) предназначен для создания светового потока в УФ-области спектра и анализа агарозных гелей.

### ВНИМАНИЕ!

При работе с трансиллюминатором ОСТЕРЕГАЙТЕСЬ воздействия облучения на глаза (необходимо применять защитное стекло) и кожу рук и лица.

Во избежание растрескивания стекла остерегайтесь попадания на разогретое стекло каких-либо жидкостей.

6. Набор микропитеток состоит из двух высокоточных микродохаторов, обеспечивающих забор жидкостей в диапазонах от 0,5 до 10 мкл и от 40 до 200 мкл.

## РЕАКТИВЫ

1. К-буфер — собственная разработка, предмет изобретения.

2. PCR-буфер — собственная разработка, предмет изобретения.

3. dNTP — смесь: 1 мМ дезоксиАТФ, дезоксиГТФ, дезокси ТТФ, дезоксиЦТФ.

4. ДНК-контрольная.

5. Праймеры — собственная разработка, предмет изобретения.

6. Бидистиллированная вода.
7. Таф-полимераза.
8. ТВЕ-буфер состава: 0,89 М триц, 0,89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH—7,5.
9. ВФВ-краска состава: 0,25% бромфеноловый синий, 40% сахароза.
10. Агароза.
11. PBS-буфер состава: 150 мМ NaCl, 10 мМ триц-HCl, pH 7,5.
12. ВЕ-краска — 1% этидийм бромид.
13. Вазелиновое масло.

#### **ожидаемый эффект от внедрения**

Внедрение метода ПЦР обеспечит высокое качество диагностики инфекционных заболеваний благодаря высокой чувствительности, специфичности, быстроте постановки диагноза (6—8 часов), а также позволит проводить массовый скрининг населения. Надежность анализа определяется его защищенностью от ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Возможен анализ серонегативных пациентов на самых ранних стадиях инфекционного процесса, когда лечение наиболее эффективно.

Возможно определение патогенных возбудителей, для которых не разработана или затруднены методы культивирования и нет диагностических приемов.

#### **Показания и противопоказания к использованию ПЦР-диагностики**

Показанием к использованию метода ПЦР является диагностика заболеваний, вызываемых инфекционными агентами.

Противопоказаний к использованию ПЦР-диагностики нет.

АОЗТ «Внедрение систем в медицину» обеспечивает по-  
ставку:

1. Наборов реактивов для ПЦР-диагностики  
ХЛАМИДИИ ТРАХОМАТИС — «ХламАм».  
МИКОПЛАЗМЫ ГОМИНИС — «МикрАм».  
УРЕАПЛАЗМЫ УРЕАЛИТИКУМ — «УреАм».  
ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА — «ГерАм».  
ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА — «ЦитАм».
2. Лабораторного оборудования для ПЦР-диагностики.
3. Проводит обучение специалистов.

Телефон (факс) (095) 125-50-00

Зак. 526

Объем 0,75 п. л.

Тир. 200

---

Типография Минздравмедпрома РФ