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 научных исследований
О. Е. Нифантьев
6 июля 1995 г.

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

ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИЙНОЙ, МИКОПЛАЗМЕННЫХ И ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ МЕТОДОМ ЦЕПНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ РЕАКЦИИ

Методические рекомендации № 95-106

Москва — 1995

gost.e-ecolog.ru

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. Макаровым, канд. физ.-мат. наук С. Н. Щербо, Н. Ю. Земляной, Н. И. Воронцовой, С. П. Зайцевой.

АННОТАЦИЯ

Методические рекомендации содержат характеристику и описание метода цепной полимеразной реакции для диагностики заболеваний, вызываемых Chlamydia trachomatis, Micoplasma hominis, Ureaplasma urealiticum, Herpes symplex, Cytomegalovirus.

Диагностика хламидийной, микоплазменной и герпесвирусной инфекций является актуальной для акушерско-гинекологической практики, неонатологии, педиатрии, урологии, венерологии, нефрологии, пульмонологии, офтальмологии, неврологии и определяется политропизмом 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 вирусоносительство. 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 патогенны возбудители, для которых не разработаны или затруднены методы культивирования.

РЕАЛИЗАЦИЮ данного предложения рекомендуетс осуществлять на всех уровнях учреждений практического здравоохранения и клиниках НИИ медицинского профиля.

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

щихся 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 эппендорф. пробирку (на 1,5 мл).

2. Пробирку тщательно закрыть и перенести на хранение на —20° С 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 водяную баню при 95° С.

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° С).

5. Проведение амплификации и оценка результатов.

1. Приготовить пронумерованные маленькие эппендорфы (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.

Таблица

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 эппендорфы.

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°С — 1,0 мин, 62°С — 1,0 мин, 72°С — 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 элек- ретического 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 микропипеток состоит из двух высокоточных микродозаторов, 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. Taq-полимераза.
8. TBE-буфер состава: 0,89 М трис, 0,89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH—7,5.
9. BFB-краска состава: 0,25% бромфеноловый синий, 40% сахароза.
10. Агароза.
11. PBS-буфер состава: 150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5.
12. BE-краска — 1% этидиум 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 поставку:

1. Наборов реактивов для ПЦР-диагностики
   ХЛАМИДИИ ТРАХОМАТИС — «ХламАм».
   МИКОПЛАЗМЫ ГОМИНИС — «МикгАм».
   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

gost.e-ecolog.ru