

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
УКРАИНЫ  
ОДЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА  
ТОКСИГЕННОСТИ  
ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ НА  
ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ  
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

*(Методические рекомендации)*

**Одесса-1995**

Методические рекомендации разработаны коллективом сотрудников Одесского государственного медицинского университета в соответствии с выполняемыми госбюджетными НИР, финансируемыми ГКНТ и МЗ Украины (соответственно №№ госрегистрации 0193 U 039622 и 0194 U 019980).

Авторы:

чл. корр АНТК Украины., д.м.н., проф. Бажора Ю.И.;  
д.м.н., проф. Соколовский В.С.;  
академик АНТК Украины., з.д.н.т., д.м.н., проф. Кресюн В.И.,  
д.б.н., проф. Носкин Л.А.,  
к.м.н. Сервецкий К.Л.,  
асс. Николаевский В.В..

Рецензенты:

академик АНТК Украины., з.д.н.т., д.м.н., проф. Макулькин Р.Ф.,  
д.м.н., проф. Целух А.В.

Ответственный за выпуск:

ректор ОГМУ академик Запорожан В.Н.

Спонсор издания:

МП "Кислородмаш-Полюс"

Методические рекомендации рекомендованы к изданию  
Ученым Советом ОГМУ 23.12.1993 г. (протокол N 5).

Методические рекомендации рассчитаны на врачей, научных работников и студентов.

## Введение

В настоящее время для идентификации и определения токсигенности возбудителя дифтерии применяются главным образом бактериологические методы, основанные на выделении культуры возбудителя на кровяно-теллуриновом агаре и последующем определении его биохимических характеристик и токсигенности методом преципитации в агаре. Однако применение указанных методов не в полной мере обеспечивает надежную, быструю и точную дифференцировку выделенных культур, что объясняется возможными погрешностями при подготовке сред и реактивов, низкой чувствительностью методик и длительным временем их выполнения. Кроме того, только само выделение культуры возбудителя занимает от 24 до 48 часов. Немаловажное значение имеет и то, что многие необходимые реактивы и среды в настоящее время в Украине не производятся. Следствием этого нередко является позднее получение и невысокая надежность результатов лабораторных исследований, что в конечном итоге влияет на диагностику и выбор адекватного метода терапии, а самое главное - эпидемиологических мероприятий.

В последние годы в мире все более широкое применение находят молекулярно-биологические методы исследования, среди которых особое место занимает метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий обнаружить и идентифицировать искомые фрагменты в молекуле ДНК любого живого организма. Данные методические рекомендации имеют целью вооружить практических врачей и научных работников новой технологией экспресс-диагностики токсигенности возбудителя дифтерии на основании современных достижений молекулярной генетики.

Это позволит на современном уровне быстро, доступно, с высокой степенью достоверности и надежности, и, самое главное, с низкой себестоимостью определить токсигенные штаммы возбудителя дифтерии.

### 1. Общие положения

ПЦР и его разновидности позволяют провести дифференцировку и идентификацию ДНК исследуемого организма путем направленного размножения участка его генома. Таким образом, ПЦР позволяет избежать многих длительных и дорогостоящих операций при клонировании фрагментов генома. Одна из разновидностей ПЦР - амплификация фрагмента ДНК с парой специфических олигонуклеотидов (праймеров) особенно пригодна для целей различных отраслей практической медицины. При этом искомый фрагмент ДНК многократно ре-

лицируется при помощи фермента - термостабильной полимеразы и присутствующих в реакционной смеси нуклеотидов (мономеров ДНК). Таким образом, исследователь имеет возможность выявить наличие или отсутствие определенного фрагмента ДНК в исследуемом материале, что прямо указывает на присутствие определенного вида или разновидности микроорганизма (или вируса) в организме человека. Данный метод находит также широкое применение в диагностике наследственных заболеваний, в медицинской генетике, иммунологии и судебной медицине.

Схема и принцип полимеразной цепной реакции представлены на рис. 1.

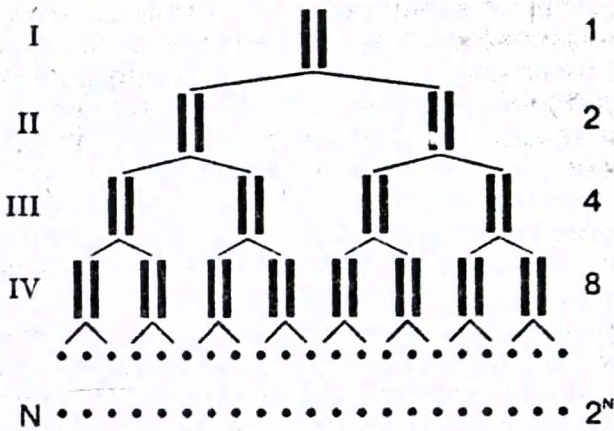


Рис. 1. Схема полимеразной цепной реакции.

I-IV...N - циклы амплификации; 1-8... $2^N$  - число копий амплифицированного участка ДНК.

Все вышеизложенное обуславливает главное преимущество применения метода ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний. Сам принцип ПЦР является высокоточным специфичным исследованием, значительно превосходит аналогичные бактериологические параметры, современные иммунохимические методы (иммуоферментный анализ, применение моноклональных антител).

Кроме того, к существенным достоинствам данного метода следует отнести быстроту получения результатов (2-4 часа), возможность проведения нескольких десятков анализов параллельно, относительную простоту подготовки образцов к исследованиям (в качестве ДНК-матрицы можно использовать малоочищенные препараты ДНК без ухудшения специфичности).

Важно и то, что в настоящее время в Украине налажен вы-

пуск аппаратуры и комплектуются наборы реактивов, необходимых для постановки указанного метода (Региональный центр доклинической диагностики). Таким образом, могут быть решены задачи своевременной поставки всех необходимых компонентов для выполнения диагностических исследований методом ПЦР.

Как известно, токсигенность *C. diphtheriae* определяется присутствием в цитоплазме бактерий умеренного фага  $\beta$ , ДНК которого несет в себе ген, при определенных условиях включающий процесс выработки дифтерийного токсина. Таким образом, определение наличия такого гена в ДНК исследуемого микроорганизма позволит выявить его способность (в том числе и потенциальную) к синтезу дифтерийного токсина, что важно для целей диагностики и эпидемиологии.

Настоящий метод выявления токсигенных штаммов дифтерии основан на избирательной амплификации фрагмента гена токсигенности, локализованного в геноме умеренного фага. С помощью пары специфических праймеров, которые "отыскивают" указанный ген, происходит многократное увеличение числа копий этого фрагмента, после чего становится возможным выявление этого фрагмента с помощью ДНК-электрофореза.

Цель настоящих методических рекомендаций - унифицировать технологию забора материала у пациентов, его хранения, транспортировки и подготовки для исследования методом ПЦР, а также технологию производства анализа токсигенности возбудителей дифтерии указанным методом. Методические рекомендации могут быть использованы при проведении анализа ротоглоточных смывов и выделенных культур возбудителя дифтерии на токсигенность в клинических лабораториях больниц и поликлиник и в экспериментальных лабораториях биологического и медицинского профиля.

## **2. Оборудование, инструментарий и реактивы**

### **2.1 Стандартное оборудование.**

- амплификатор автоматический (типа ААГ-56 или аналогичный);
- центрифуга настольная для пробирок типа "Эппендорф", частота вращения ротора не менее 120 с<sup>-1</sup>;
- термостат суховоздушный ТС-80М (или аналогичный);
- термостат водяной 1ТЖ (или аналогичный);
- камера для горизонтального электрофореза в агарозном геле;
- блок питания для электрофореза (типа ПЭФА или аналогичный);
- трансиллюминатор;

- бытовой холодильник с морозильной камерой;
  - набор автоматических регулируемых микропипеток (отечественного либо зарубежного производства) объемами:
    - 1...20 мкл;
    - 20...200 мкл;
    - 200...1000 мкл;
  - фотоаппарат зеркальный типа "Зенит" с насадочными кольцами для макросъемки;
  - штатив фотографический;
  - пробирки типа "Эппендорф" емкостью 1,5 и 0,5 мл (в дальнейшем - эппендорфы);
  - наконечники к микропипеткам;
  - химическая лабораторная посуда:
    - чашки Петри;
    - колбы и стаканы различной емкости;
    - пробирки;
  - плитка электрическая или горелка Бунзена;
  - эксикаторы или кристаллизаторы емкостью 3-5 л.
- 2.2. Нестандартное оборудование.
- стеклограф или фломастер для надписей по стеклу и пластмассе;
  - резиновые перчатки;
  - штативы для эппендорфов (в качестве штативов могут также применяться использованные планшеты для иммунологических исследований);
  - фольга алюминиевая;
  - кюветы для фотореактивов.
- 2.3. Расходные материалы и реактивы:
- пленка фотографическая типа "Микрат-300";
  - фотобумага любого типа;
  - реактивы для фоторабот: проявитель и фиксаж;
  - набор реактивов для проведения исследования методом ПЦР;
  - буфер для ПЦР x10 (десятикратный);
  - раствор дезоксинуклеотидтрифосфатов (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) x10 (десятикратный);
  - олигонуклеотиды (праймеры) на ген токсигенности прямой и обратный;
  - термостабильная полимераза Tth;
  - вода бидистиллированная стерильная;
  - масло вазелиновое стерильно;
  - спирт этиловый 96%;
  - раствор гидроксида натрия NaOH 2M;
  - раствор трис - HCl 2M (pH=7,6);
  - хромовая смесь,
  - фенол перегнанный, насыщенный водой, с 8-оксихинолином;
  - хлороформ;

- агароза;
- буфер трис-ацетатный для электрофореза;
- раствор бромистого этидия;
- буфер для нанесения проб;
- синтетическое моющее средство.

2.4. Комплект материалов и оборудования.

Для сокращения затрат труда и времени на проведение исследований методом ПЦР целесообразно готовить комплекты материалов и оборудования.

**Таблица 1.**

Комплект материалов многократного использования

№п/п	Наименование	Един.	Кол.
1.	Микропипетки автоматические объемом: 1...20 мкл; 20...200 мкл; 200...1000 мкл.	шт.	1
		шт.	1
		шт.	1
2.	Пинцет хирургический	шт.	1
3.	Чашка Петри	шт.	2
4.	Штативы для эппендорфов	шт.	3
5.	Стеклограф	шт.	1
6.	Резиновые перчатки	пара	1

**Таблица 2.**

Комплект материалов и реактивов одноразового использования для исследования 100 образцов.

№п/п	Наименование	Един.	Кол.
1.	Наконечники к микропипеткам	шт.	200
2.	Эппендорфы емкостью: 1,5 мл; 0,5 мл.	шт.	100
		шт.	100
3.	Набор реактивов для ПЦР: - буфер x10; - нуклеотиды x10; - полимераза; - праймеры.	мл.	3
		мл.	3
		ед.	100
		мкл.	100
4.	Вода бидистиллированная	мл.	10
5.	Масло вазелиновое	мл.	5
6.	Раствор NaOH 2M	мл.	5
7.	Раствор трис-HCl 2M	мл.	10
8.	Фенол перегнаный	мл.	50
9.	Хлороформ	мл.	50
10.	Агароза	г.	50
11.	Этидий бромистый раствор	мл.	3
12.	Буфер TAE x50	мл.	10
13.	Буфер для нанесения проб	мл.	5
14.	Бумага фотографическая	лист	100
15.	Пленка "Микрат-300"	м.	3

### 3. Подготовка инструментария, материалов и посуды к работе

#### 3.1. Подготовка эппендорфов.

Для проведения исследований методом ПЦР, приготовления реактивов и растворов могут применяться новые или использованные эппендорфы, но только стерильные.

Для постановки реакции с использованием амплификатора типа ААГ-56 применяются эппендорфы емкостью 0,5 мл. Они являются предметами одноразового применения из-за невозможности достаточно тщательной их очистки. После использования подлежат уничтожению. Таким образом, непосредственно для постановки ПЦР всегда используются новые эппендорфы. При условии хранения в запечатанной заводской упаковке они никакой предварительной подготовки не требуют.

Для хранения реактивов и приготовления растворов могут использоваться эппендорфы емкостью 1,5 мл. Если применяются ранее бывшие в употреблении эппендорфы, то последние предварительно замачиваются в растворе синтетического моющего средства (1 стол. ложка на 3 л. воды) на 1 сутки. Затем их необходимо тщательно промыть внутри и снаружи, для чего используется подходящего размера кисточка для рисования с жесткой щетиной. Кисточкой удаляются все видимые загрязнения. После этого эппендорфы прополаскиваются не менее 3-х раз под проточной водой и помещаются в емкость (например, эксикатор) с хромовой смесью, где выдерживаются около 1 часа. Затем эппендорфы извлекают с помощью пинцета, не менее 3-х раз промывают под проточной водой и помещают их в химический термостойкий стакан с дистиллированной водой, где кипятят в течение 20-30 минут. Воду сливают, а эппендорфы высушивают в сушильном шкафу на подложке из фольги при температуре не более 90 °С, после чего аккуратно пинцетом перекадывают в чистую сухую посуду с крышкой.

Стерилизация эппендорфов производится путем их автоклавирования, для чего эппендорфы помещают в химический стакан или колбу достаточно большой емкости (0,5-1 л), плотно закрывают алюминиевой фольгой, тщательно обжимают ее пальцами и автоклавируют при температуре 126 °С и давлении 1,2 атм в течение 30 мин. После автоклавирования эппендорфы сохраняют в этой же посуде до использования.

#### 3.2. Подготовка и использование автоматических микропипеток.

Автоматические микропипетки используются для отмеривания точных объемов растворов и реактивов. Они являются



высокоточными инструментами, требующими бережного обращения.

В процессе работы автоматические микропипетки не соприкасаются непосредственно с используемыми реактивами. Для набора проб служат сменные пластиковые наконечники. Для пипеток объемом 1-20 и 20-200 мкл применяются наконечники меньшего размера, для пипеток емкостью 200-1000 мкл - наконечники большего размера.

Последовательность работы с микропипетками изложена в разделе 5.

Обычно для постановки ПЦР используются новые наконечники. Однако при тщательном соблюдении правил их подготовки к работе могут использоваться и бывшие в употреблении наконечники. Порядок их подготовки к работе аналогичен правилам обработки эппендорфов емкостью 1,5 мл, изложенным в разделе 3.1. (**Особое внимание обращать на тщательное соблюдение условий стерилизации**). При мытье наконечников необходимо внимательно следить за тем, чтобы вода попадала внутрь наконечника. После автоклавирования наконечники сохраняют до использования в этой же посуде. Извлекать их допускается только с помощью пинцета. Особенно важно избегать прикосновения рабочего конца наконечника к рукам (из-за возможности загрязнения нуклеазами).

### 3.3. Приготовление реактивов.

Все реактивы и растворы для постановки ПЦР используются только в стерильном виде.

Растворы NaOH и трис-HCl необходимо готовить на дистиллированной воде. Подробная методика приготовления раствора триса изложена в литературе (Маниатис Т. и соавт., 1986).

Приготовленные растворы разливаются в стеклянные флаконы по небольшим аликвотам (до 10 мл), закрываются крышечками из фольги и автоклавируются при условиях, указанных для стерилизации посуды (см. раздел 3.1). Растворы сохраняются до 1 месяца при +4 °С в плотно закрытой посуде.

Набор реактивов для постановки ПЦР поставляется фирмой-изготовителем в готовом для использования виде. Буфер, раствор нуклеотидов и праймер необходимо хранить при температуре -15 °С, а полимеразу при +4 °С. **Недопустимо длительное размораживание реактивов и их загрязнение!**

Для постановки ПЦР желательно использовать стерильную бидистиллированную деионизированную воду (например, полученную при помощи установки "Millipor", США). При ее отсутствии бидистиллированная вода автоклавируется при вышеуказанных условиях и сохраняется не более 10 дней в холодильнике при +4 °С.

Приготовление фенола и хлороформа, а также реактивов для электрофореза (буфера трисацетатного ТАЕ, агарозного геля, буфера для нанесения проб с бромтимоловым синим и бромистого этидия) подробно изложено в литературе (Маниатис Т. и соавт., 1986).

Хромовая смесь готовится по методике, изложенной в литературе (Любина и соавт., 1988)

#### **4. Забор материала и его подготовка к исследованию**

Определение токсигенности возбудителя дифтерии может производиться как непосредственно на материале ротоглоточных смывов, так и с использованием колоний коринебактерий. Поэтому возможно скоростное определение токсигенности присутствующих в смыве микроорганизмов и последующий (при необходимости) анализ культуры микроорганизма, выделенной от больного.

4.1. Взятие ротоглоточных смывов и подготовка материала к исследованию.

Забор материала производится при помощи сухих стерильных ватных тампонов, смонтированных на металлических стержнях. Материал для исследования (налеты, пленки, слизь) собирается на границе здоровой и пораженной ткани миндалин и зева. Тампон помещают в пробирку или эппендорф емкостью 1,5 мл, куда предварительно налито 500 мкл 50% этилового спирта, после чего вращательными движениями смывают материал. Подготовленный таким образом образец готов для исследования, может использоваться непосредственно после приготовления или сохраняться при температуре  $-12^{\circ}\text{C}$  не более 6 мес.

4.2. Взятие и подготовка к исследованию материала культур микроорганизмов. При исследовании токсигенности выделенных культур микроорганизмов поступают следующим образом:

4.2.1. Небольшой участок выделенной культуры *S. diphtheriae* снимают с агара и помещают в эппендорф емкостью 0,5-1,5 мл или подходящую пробирку с плотно закрывающейся крышкой, куда предварительно наливают 0,5 мл 50%-го этилового спирта. Крышку закрывают и многократным встряхиванием тщательно суспендируют имеющийся в пробирке участок колонии микроорганизмов. Этим достигается гибель микроорганизмов и возможность последующей работы с культурой без соблюдения специальных мер предосторожности.

4.2.2. Эппендорф или пробирку с приготовленным таким способом материалом маркируют, указывая номер выделенного штамма и историю болезни пациента.

Приготовленный вышеуказанным способом материал может сохраняться в течение нескольких месяцев при температуре  $-12^{\circ}\text{C}$  или использоваться непосредственно после приготовления.

Таким образом, материал для ПЦР-исследований токсигенности возбудителей дифтерии представляет собой взвесь микроорганизмов в 50%-ом этиловом спирте. Он не представляет инфекционной опасности и не требует специальных мер предосторожности при работе с ним.

## **5. Проведение исследования токсигенности возбудителей дифтерии методом полимеразной цепной реакции**

Необходимым условием успешной работы является чистота рабочего места, оборудования и посуды. При выполнении молекулярно-генетических исследований следует работать в резиновых перчатках. На рабочем столе должно быть достаточное количество стерильных эппендорфов, наконечников для микропипеток, штативов, контейнеры для использованных наконечников и эппендорфов. Реактивы для проведения ПЦР необходимо извлечь из морозильной камеры непосредственно перед началом работы и поместить их обратно сразу же после отбора требуемого их количества.

5.1. Проведение экспресс-анализа на присутствие токсинообразующих микроорганизмов в ротоглоточном смыве.

В ротоглоточном смыве присутствует значительное количество различных микроорганизмов. В ходе исследования решается вопрос о наличии в изучаемом материале токсигенных возбудителей дифтерии. Положительный результат анализа свидетельствует о присутствии в смыве токсигенных возбудителей дифтерии, независимо от их принадлежности к различным био- и сероварам и фактически является основанием для постановки диагноза "дифтерия".

5.1.1. Подготовка материала к исследованию.

Эппендорфы с образцами помещаются в штатив. Если используются хранившиеся в морозильной камере образцы, их необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 30 мин. Одновременно возможно исследовать до 50 образцов.

В течение 15 мин. эппендорфы с образцами центрифугируют при 8000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок подсушивают в течение нескольких минут при комнатной температуре в перевернутых пробирках.

Затем проводят щелочной лизис пробы, для чего к осадку прибавляют 20 мкл 2 М раствора NaOH и 180 мкл воды. Тщатель-

тельно встряхивают пробирку, ресуспендируя осадок.

**Для отмеривания необходимых объемов реактивов пользуются автоматическими микропипетками. При отборе пробы нажимают поршень пипетки до первого упора и вносят рабочий конец наконечника в раствор. Затем плавно отжимают поршень, при этом необходимый объем жидкости оказывается в наконечнике. Выпуск набранного раствора осуществляется плавным нажатием поршня вначале до первого, а затем до второго упора.**

**Всякий раз при смене отмеряемой жидкости необходимо менять наконечник. Использованные наконечники помещаются в специальный контейнер. При установке очередного чистого наконечника разрешается дотрагиваться до него только там, где он не будет соприкасаться с рабочим раствором.**

Пробу нейтрализуют, добавляя в каждый эппендорф 50 мкл 2М р-ра трис-HCl, pH=7.6, после чего снова тщательно встряхивают пробирку.

Для депротеинизации пробы к жидкости в эппендорфе добавляют равный объем фенола, встряхивают и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования аккуратно отбирают верхнюю фазу жидкости и переносят в чистый эппендорф. При отборе верхней фазы недопустимо попадание в наконечник нижней фазы, поэтому удобнее пользоваться наконечником с обрезанным носиком.

В эппендорф с отобранной верхней фазой помещают равный объем хлороформа, встряхивают и центрифугируют при вышеуказанных условиях, после чего отбирают верхнюю фазу в чистый эппендорф, соблюдая те же правила. После фенол-хлороформной обработки жидкость представляет собой препарат ДНК, пригодный для использования в качестве матрицы в ПЦР.

**Вышеуказанную процедуру желательно проводить в вытяжном шкафу!**

#### 5.1.2. Постановка реакции.

Перед работой следует внимательно изучить инструкцию по эксплуатации амплификатора, проверить соответствие установленных значений температурных и временных режимов амплификатора паспортным и при необходимости переустановить их.

После этого следует включить амплификатор и водяной термостат. Приборы перед установкой эппендорфов должны проработать вхолостую 5-7 циклов для окончательной установки всех требуемых параметров.

Подготовить необходимое количество (по числу исследуемых проб) новых эппендорфов емкостью 0,5 мл. Ножница-

ми обрезать их верхнюю часть с крышечкой на 1,5 см. Оставшиеся эппендорфы без крышечек промаркировать порядковыми номерами. Записать соответствие порядковых номеров и номеров исследуемых образцов в рабочий журнал.

Реакция амплификации ставится в объеме 30 мкл, из которых:

- 3 мкл -буфер x10;
- 3 мкл -раствор нуклеотидов x10;
- 1 мкл -полимераза Tth;
- по 1 мкл прямого и обратного праймеров;
- 0,5 мкл матрицы ДНК (приготовленного как описано выше препарата ДНК);
- 20,5 мкл стерильной воды.

Перед работой необходимо посчитать количество образцов и рассчитать необходимые общие объемы всех реактивов.

В один из эппендорфов поочередно внести:

- рассчитанный для всех проб общий объем воды;
- рассчитанный для всех проб общий объем буфера;
- рассчитанный для всех проб общий объем полимеразы;
- рассчитанный для всех проб общий объем праймеров.

**Категорически запрещается использовать один и тот же наконечник для различных реактивов, для прямого и обратного праймеров!**

С помощью автоматической пипетки разнести полученную смесь реактивов по подготовленным эппендорфам, после чего в каждый эппендорф добавить по 0,5 мкл матрицы в соответствии с надписями на них, используя для каждого образца новый наконечник. Встряхнуть эппендорфы.

Наслоить на поверхность жидкости в эппендорфах по капле стерильного вазелинового масла.

Подготовленные таким образом эппендорфы с образцами готовы для амплификации.

Дождаться переключения амплификатора со 2-й стадии на 3-ю (плавление ДНК). Переключить амплификатор в режим "Пауза" и установить эппендорфы в гнезда прибора. Через 2-3 мин переключить амплификатор в рабочий режим.

Через 30-33 цикла (по счетчику) на стадии 2 (синтез) переключить амплификатор в режим "пауза" и через 3-4 мин. перенести эппендорфы в штатив. Амплификатор и водяной термостат выключить.

В эппендорфах содержатся продукты амплификации ДНК с парой специфических праймеров. Для анализа продуктов амплификации необходимо провести электрофорез в агарозном геле.

### 5.1.3. Проведение электрофореза.

Для выявления амплифицированного участка ДНК прово-

дится электрофорез продуктов амплификации в 1,8%-ом агарозном геле. Для этого в лунки приготовленного геля вносят по 6-8 мкл жидкости из эппендорфа, предварительно смешанной с каплей буфера для нанесения проб. Каждая лунка соответствует определенному образцу. При нанесении проб наконечник каждый раз можно не менять, а промывать его в буфере и использовать для нанесения очередного образца. После нанесения всех образцов крышку кюветы для электрофореза закрывают и включают ток. Обычно используют напряжение около 100 В при силе тока 10 мА. При этих параметрах длительность электрофореза составляет около 45 мин. Окончание электрофореза определяется по нахождению фронта лидирующего красителя (бромтимолового синего). При подходе окрашенных полос синего цвета к аноду электрофорез прекращают.

#### 5.1.4. Выявление амплифицированных фрагментов.

После проведения электрофореза гель вынимают из кюветы и кладут на стекло трансиллюминатора. В ультрафиолетовом свете должны отчетливо просматриваться фрагменты рестрицированной ДНК фага  $\lambda$  (маркера молекулярной массы) и, возможно, другие полосы ярко-оранжевого цвета в нижней части геля. Наличие полосы на уровне 5-6 фрагмента маркера на участке геля, соответствующем данному образцу, свидетельствует о присутствии искомого фрагмента и учитывается как положительный результат. Диффузное оранжевое свечение в нижней части геля обусловлено присутствием нуклеотидов и положительным результатом не считается.

При необходимости документального хранения результатов анализов гель может быть сфотографирован при помощи зеркальной фотокамеры типа "зенит" с кольцами для макросъемки. Фотографирование производится через красный светофильтр Кх8 на пленку "Микрат-300". Ориентировочная выдержка около 3 мин. Подробно методика обработки пленки изложена в литературе (Гороховский Ю.Н., Баранова В.П.; 1970).

На рис. 2 приведена фореграмма продуктов амплификации при помощи праймера на ген дифтерийного токсина.

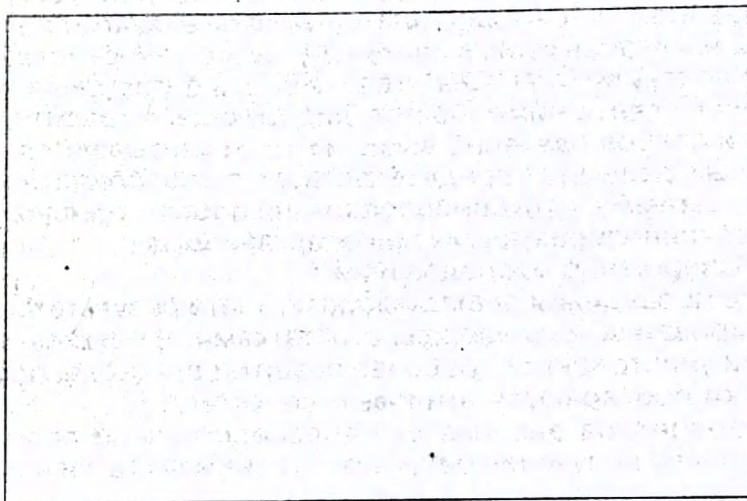


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *Corinebacterium diphtheriae*, выделенной из культур и ротоглоточных смывов. Цифрами обозначены номера дорожек.

1. ДНК из культуры *C. diphtheriae* var. *Gravis tox*;
2. ДНК из культуры *C. diphtheriae* var. *Mitis tox*;
3. ДНК из культуры *C. diphtheriae* var. *Gravis nontox*;
- 4-5, 9-10 ДНК из ротоглоточных смывов, в которых обнаружены токсигенные штаммы возбудителя дифтерии;
- 6,8. ДНК из ротоглоточных смывов, токсигенные штаммы не обнаружены;
7. Маркер молекулярного веса-ДНК фага  $\lambda$ , рестрицированная рестриктазой Pst 1.0.

## 5.2. Проведение анализа культур *C. diphtheriae* на токсигенность.

Материалом для такого исследования является взвесь микроорганизмов в 50%-ом этиловом спирте. Поскольку указанный материал получают из чистой культуры, в нем отсутствуют другие микроорганизмы. Положительный результат анализа культуры на токсигенность свидетельствует о потенциальной способности данного штамма к токсиносбразованию.

Подготовка и проведение ПЦР-исследования культур аналогичны процедурам подготовки и проведения ПЦР-анализа на материале ротоглоточных смывов (разделы 5.1.1...5.1.4), за исключением процедуры депротеинизации (так как незначительное количество белков клеточной стенки бактерий не мешает проведению реакции).

## 5.3. Результаты исследования.

Результат исследования данного образца на токсигенность

считается положительным, если при помещении геля после электрофореза в ультрафиолетовый свет визуально заметна полоска ярко-оранжевого света на участке данного образца в нижней половине геля. Слабо светящиеся диффузные полосы оранжевого света ниже фронта лидирующего красителя, так же, как и слабое свечение выше него, не учитываются. Положительный результат свидетельствует о способности исследуемого штамма к токсинообразованию или о присутствии в смыве токсинообразующих микроорганизмов.

#### 5.4. Завершение исследований.

После проведения электрофореза, учета результатов и фотографирования эппендорфы с остатками продуктов амплификации уничтожаются, рабочая поверхность стола, перчатки и пипетки протираются этиловым спиртом.

Вся процедура анализа от непосредственной подготовки материала до получения результатов занимает (в зависимости от количества образцов) 4-6 часов.

Данным методом обследовано 259 больных и носителей различных штаммов возбудителя дифтерии, поступивших в Одесскую городскую клиническую инфекционную больницу. Результаты исследований представлены в таблицах 3-5.

**Таблица 3.**

Степень информативности предлагаемого метода диагностики токсигенности возбудителей дифтерии на основе ПЦР по сравнению с традиционными методами бактериологической диагностики при клиническом диагнозе дифтерии.

Метод	Всего обследовано	Наличие возбудителя		
		Обнаруж. токс. возбуд.	Обнаруж. нетокс. возбуд.	Не обнаружено
Бактериология	199/100%	115/57,8%	20/10,0%	64/32,2%*
ЦПР	199/100%	167/83,9%	7/3,5%	25/12,6%**

Примечания:

\* - в 64 (32,2%) случаях бактериологическим методом возбудитель дифтерии вообще не выявлен;

\*\* - в 25 (12,6%) случаях отрицательный результат свидетельствует либо об отсутствии возбудителя, либо о его нетоксигенности.



Таблица 4.

Степень информативности предлагаемого метода диагностики токсигенности возбудителей дифтерии на основе ПЦР по сравнению с традиционными методами бактериологической диагностики при клиническом диагнозе ангины.

Метод	Всего обследовано	Наличие возбудителя		
		Обнаруж. токс. возбуд.	Обнаруж. нетокс. возбуд.	Не обнаружено
Бактериология	31/100%	---	---	31/100%
ЦПР	31/100%	12/38,7%	---	19/61,3%*

Примечание:

\* - в 19 (61,3%) случаях отрицательный результат свидетельствует либо об отсутствии возбудителя, либо о его нетоксигенности.

Таблица 5.

Степень информативности предлагаемого метода диагностики токсигенности возбудителей дифтерии на основе ПЦР по сравнению с традиционными методами бактериологической диагностики при бактерионосительстве.

Метод	Всего обследовано	Наличие возбудителя		
		Обнаруж. токс. возбуд.	Обнаруж. нетокс. возбуд.	Не обнаружено
Бактериология	29/100%	9/31,0%	20/69,0%	---
ЦПР	29/100%	15/51,7%	14/48,3%*	---

Примечание:

\* - в 14 (48,3%) случаях отрицательный результат свидетельствует либо об отсутствии возбудителя, либо о его нетоксигенности.

Таким образом, при клиническом диагнозе дифтерии точность метода геноспецифической полимеразной цепной реакции только по обнаружению возбудителя превышает точность бактериологических методов в 2,6 раз, и по выявлению токсигенных форм в 1,5 раз. Результаты исследования подтверж-

дают высокую специфичность, точность и надежность метода.

При клиническом диагнозе ангин методом ПЦР из числа обследованных выявлено более 1/3 больных дифтерией и носителей токсигенных штаммов возбудителя, что говорит о недостаточной чувствительности бактериологических методов.

Выявлено в 1,5 раза большее число токсигенных штаммов среди бактерионосителей, что позволяет применять данный метод и при скрининговых обследованиях и выявлении эпидемических групп риска по данному заболеванию.

Все вышеизложенные результаты, а также быстрота и низкая себестоимость исследования свидетельствуют о высокой надежности, точности и специфичности метода ПЦР со специфическими праймерами в экспресс-диагностике дифтерии и обуславливают возможность его широкого применения в практическом здравоохранении.

## Литература

1. Гороховский Ю.Н., Баранова В.П. Свойства черно-белых фотографических пленок. -М., "Наука", 1970.-388 с.
2. Маниатис Т., Фрич С., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование /пер.с англ./. -М., "Мир", 1986.-346 с.
3. Руководство к практическим занятиям по технике лабораторных работ./А.Я.Любина, Ю.М.Неменова, М.Э.Полеев, Г.М.Чернобельская/. -М., "Медицина", 1988.-186 с.