

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Вятский государственный университет»
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

Рекомендовано к использованию
в учебном процессе
протокол заседания кафедры
№ _____ от _____
Заведующий кафедрой,
доктор медицинских наук, профессор
_____ И.В. Дармов

И.В.Маракулин

Медицинская микробиология

Материалы к практическим занятиям

Учебно-методическое пособие

Киров 2011

Содержание

Тема №1: «Безопасность работы с микроорганизмами I-IV групп патогенности и гельминтами».....	3
Тема №2: «Порядок учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».....	14
Тема №3: «Полимеразная цепная реакция и перспективы её использования для диагностики инфекционных заболеваний».....	27
Тема №4: «Принципы организации диагностических лабораторий, использующих метод ПЦР».....	45
Тема: «Возбудители протозойных инфекций и их лабораторная диагностика».....	50

Практическое занятие №1

Тема: «Безопасность работы с микроорганизмами I-IV групп патогенности и гельминтами»

Цель практического занятия:

Представить общие принципы обеспечения биобезопасности персонала при работе с микроорганизмами I-IV групп патогенности.

Учебные вопросы:

1. Задача системы биологической безопасности и ее общие принципы в организации устройства лаборатории.
2. Инженерно-технический фактор при обеспечении биобезопасности.
3. Индивидуальный фактор при обеспечении биобезопасности.
4. Организация медицинского наблюдения за персоналом микробиологических лабораторий.

Введение

Инфекционные болезни, несмотря на прогресс в их изучении, а также разработку методов профилактики и лечения, продолжают сохранять исключительно важное значение в патологии человека. По данным ВОЗ, ежегодно в мире умирает примерно 51 млн. человек, из них 16 млн. – от инфекционных болезней.

Изучение патогенных микроорганизмов проводится в специализированных микробиологических лабораториях, которые, в зависимости от основных задач, могут быть научно-исследовательскими, диагностическими или производственными.

С момента открытия патогенных микроорганизмов и в процессе дальнейшего их изучения велась разработка и внедрение в практику методов микробиологических исследований и средств защиты персонала, обеспечивающих безопасность работающих сотрудников. На первых этапах развития микробиологии эти методы разрабатывались на эмпирической основе с использованием опыта работы медицинского персонала с инфекционными больными. Затем, постепенно, по мере накопления знаний о свойствах микроорганизмов, стали целенаправленно разрабатываться эффективные способы защиты. Мероприятия по обеспечению биологической безопасности, как правило, преследуют двойную цель, которая

заключается в защите как экспериментатора, так и эксперимента, но безопасность человека стоит, безусловно, на первом месте следует отметить, что в течении длительного периода времени в нашей стране отсутствовал системный, научный подход к организации безопасной работы с патогенными биологическими агентами в микробиологических лабораториях и только в 1987г. С.Г. Дроздовым, Н.С. Гариным, Л.С. Джиндоном и др. с учётом отечественного и зарубежного опыта была издана монография, в которой сделана попытка представить целостное и системное изложение современных научных основ профессиональной санитарии и техники безопасности при работе в микробиологических и вирусологических лабораториях.

В настоящее время при работе с ПБА в целях обеспечения биологической безопасности предусмотрено использование специальных приёмов лабораторной работы, применение защитных инженерно-технических систем, выполнение комплекса организационно-противоэпидемических мероприятий, которые в значительной мере обеспечивают предотвращение случаев внутрилабораторного заражения, но полностью исключить риск заражения персонала они не могут, что подтверждают статистические данные. Так, только за период с 1954 по 1974 годы в мире был зарегистрирован 3921 случай внутрилабораторного заражения людей различными возбудителями, в том числе и с летальным исходом. Внутрилабораторное заражение людей, вызванное микроорганизмами 1 -2 групп патогенности (лихорадка Эбола, чума, сибирская язва, лихорадка Западного Нила и др.), имели место в нашей стране и за рубежом. Регистрируются случаи заболевания и при работе с микроорганизмами 3-4 групп патогенности в клинических микробиологических лабораториях.

Исходя из выше изложенного, проблема защиты окружающей среды и персонала лабораторий при работе с возбудителями опасных и особо опасных инфекционных заболеваний остаётся и в настоящее время актуальной. При реализации мероприятий по решению этой проблемы целесообразно использовать принцип эпидемического процесса, впервые предложенный Громашевским: ИСТОЧНИК – ПУТИ ПЕРЕДАЧИ – ВОСПРИИМЧИВЫЙ ОРГАНИЗМ, т.е. для обеспечения биологической безопасности необходимо осуществить локализацию

источника микробной контаминации, прервать пути передачи и обеспечить защиту восприимчивого макроорганизма.

1 Задача системы биологической безопасности и ее общие принципы в организации устройства лаборатории

Основной задачей системы биологической безопасности при проведении работ с опасными и особо опасными возбудителями инфекционных заболеваний является создание условий для исключения контакта патогенных биологических агентов с сотрудниками лабораторий и окружающей средой.

При решении этой задачи необходимо учитывать два основных фактора, оказывающих влияние на уровень биобезопасности. Это коллективный или инженерно-технический фактор и человеческий или индивидуальный фактор биологической безопасности. Учет этих факторов предусматривает проведение комплекса инженерно-технических, организационных и медико-биологических мероприятий, осуществляемых в соответствии с современными принципами организации биологической безопасности.

Основными общими принципами устройства микробиологических лабораторий и обеспечения проведения безопасной работы с возбудителями опасных и особо опасных заболеваний являются:

1. Организация проведения работ с учетом дифференциации микроорганизмов, с которыми проводятся исследования, по степени патогенности (опасности).

2. Обеспечение движения воздушных и материальных потоков в лабораторном корпусе и микробиологической лаборатории «от менее грязного» в сторону «более грязного» и исключение при этом пересечения «чистых» и «грязных» потоков.

3. Реализация принципа зонирования помещений лабораторных корпусов, основанного на необходимости функционального, организационного и технического объединения всех помещений с одинаковым реально существующим или потенциально возможным уровнем опасности в самостоятельные зоны, разделения этих зон между собой и отделения их от внешней среды соответствующими защитными барьерами.

2 Инженерно-технический фактор при обеспечении биобезопасности

Важнейшим условием предотвращения загрязнения специфическими вредностями микробной природы рабочих помещений, присутствующего в них персонала и окружающей среды, является применение комплекса инженерно-технических мероприятий, в основе которых лежит принцип применения понятия первичных и вторичных защитных барьеров.

При этом под первичными защитными барьерами понимают материальные средства защиты персонала, непосредственно работающего с вредными или опасными материалами и находящегося в данном рабочем помещении. Первичные защитные барьеры осуществляют физическое удержание патогенных микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности в замкнутых объемах используемого оборудования или в специальных защитных устройствах. Это достигается за счет герметизации оборудования, используемого при работе с ПБА, и боксирования лабораторно – технологических процессов и операций.

Герметизация оборудования предусматривает осуществление комплекса инженерных приемов и решений, обеспечивающих способность оборудования, приборов, аппаратов препятствовать выходу микробного содержимого в среду рабочих помещений в количествах, превышающих допустимые нормы, и сохранять эту способность в течение заданного цикла работы.

Под боксированием микробиологических операций и процессов подразумевается отделение с помощью физических барьеров непосредственной рабочей зоны, где находятся микроорганизмы и биологические вредности, от работающего персонала и от рабочего помещения. Материальными средствами боксирования являются защитные боксы (биокабинеты), боксирующие устройства и замкнутые защитные боксовые линии.

Под вторичными защитными барьерами понимают конструктивные элементы зданий и отдельных рабочих помещений, а также технические устройства позволяющие изолировать источник специфического загрязнения от помещений другой зональности и внешней среды. Они обеспечивают очистку выбрасываемого вентиляционного и технологического воздуха, сбор и

дезинфекционную обработку стоков, поступающих из зонированных рабочих помещений, обработку всех материальных потоков, защиту работающих сотрудников.

К вторичным барьерам относятся инженерные системы обеспечения биологической безопасности, это:

ограждающие строительные конструкции, включающие в себя герметичные стены, пол и потолок лабораторного помещения; межэтажные и внутрискристовые герметично закрытые отверстия, через которые проходят трубы технологического оборудования; двери и т.п.;

система очистки вентиляционного воздуха с входящими в их состав вентиляторными, воздуховодами, герметичными отсекающими клапанами, вентиляционными камерами с фильтрами тонкой очистки воздуха;

система очистки технологического воздуха, включающая фильтры тонкой очистки и оборудование для защиты фильтров от замачивания, которое состоит из системы последовательно соединенных каплеотбойников, конденсатора-охладителя и воздухоподогревателя;

санитарные пропускники, включающие в себя помещения для хранения и обработки рабочей и защитной одежды, раздевалок, гигиенического душа;

передаточные устройства, к которым относятся проходные автоклавы, передаточные камеры, передаточные ванны с гидрозатворами, аэрозольные шлюзы;

система спецканализации и система сбора и обработки сточных вод включающая в себя трапы и стокоприёмники, трубопроводы и стояки спецканализации, накопительные ёмкости, аппараты обработки стоков с непрерывным или циклическим процессом, систему спецвоздушек;

система воздухообеспечения вентилируемых СИЗ, включающая вентиляторы, трубопроводы, оборудование для поддержания температуры и влажности подаваемого воздуха с оптимальными параметрами, фильтры тонкой очистки;

система приготовления и подачи дезрастворов, включающая ёмкости для приготовления и хранения дезрастворов, насосы и трубопроводы для подачи дезрастворов в лабораторные помещения.

К вторичным барьерам следует отнести также применение персоналом спецодежды и средств индивидуальной защиты. В зависимости от вида выполняемых работ используются комплекты разного типа: спецодежда - костюмы специального покроя, дополнительные средства защиты кожных покровов и органов дыхания: резиновые перчатки, фартуки, нарукавники, костюмы из пленочных материалов, респираторы, пневмошлемы, пневмокуртки, СИЗ изолирующего типа.

3 Индивидуальный фактор при обеспечении биобезопасности

К индивидуальному фактору следует отнести организационные, контрольные, медицинские мероприятия.

Организационные мероприятия включают следующие направления:

регламентация порядка и правил работы;

обучение приемам безопасной работы и аттестации персонала;

учет и расследование нарушений требований биологической безопасности, несчастных случаев.

Регламентация порядка и правил работы, совершенствование методологической базы безопасных исследований, проводимых с использованием микроорганизмов I-II групп патогенности, является важным направлением, входящим в организационные мероприятия. В целом работа регламентируется как федеральными, так и ведомственными документами.

К федеральным документам относятся: федеральные законы, постановления правительства, ГОСТы, федеральные санитарно-эпидемиологические правила, федеральные руководства, методические указания и рекомендации, приказы Минздрава.

К ведомственным документам относятся: ведомственные санитарные правила, ОСТы, строительные нормы (СНиПы) и др.

На их основе в научно-исследовательских учреждениях разрабатываются документы, детализирующие требования биологической безопасности с учетом конкретных условий, существующих в данной организации и ее подразделениях: руководство по противозидемическому обеспечению работ в НИУ, инструкции подразделений по обеспечению биологической безопасности личного состава при

выполнении работы с микроорганизмами, методики и сборники методик выполнения научных исследований.

Человек является основным звеном в работе с микроорганизмами. Его профессиональные навыки, знания, полученные в ходе обучения в среднем или высшем учебном заведении, а также при последующем обучении и повышении квалификации на соответствующих курсах и в процессе непосредственных работ с ПБА под руководством более опытных сотрудников позволяют грамотно и качественно решать как вопросы производства, так и вопросы безопасности.

Хотя, в настоящее время, к работам с микроорганизмами согласно требований санитарных правил допускаются специалисты с высшим и средним медицинским, биологическим, ветеринарным и иным образованием в соответствии с принятым каждым ведомством порядком замещения должностей, предпочтительнее привлекать к проведению непосредственных исследований с использованием микроорганизмов I-II групп патогенности только людей, имеющих базовое медицинское, биологическое и ветеринарное среднее или высшее образование, так как они имеют основы практических и теоретических знаний в области микробиологии, физиологии, биохимии, органической химии, инфекционных болезней человека и животных.

Обязательным условием обеспечения безопасной работы является специальная подготовка, тренинг для работ с ПБА и животными.

По степени базовой подготовки сотрудников, привлекаемых к работам с ПБА, можно разделить на три группы:

1. Сотрудники, обладающие достаточным опытом работы, имеющие право самостоятельной работы с ПБА и лабораторными животными.
 2. Сотрудники, работающие с микроорганизмами и лабораторными животными под руководством более опытных специалистов, входящих в первую группу.
 3. Технический персонал, обслуживающий работы с микроорганизмами и эксплуатирующий инженерно-технические системы биологической безопасности.
- С учетом уровня базовой подготовки определяется и объем допуска персонала к работе с ПБА.

Немаловажным является квалифицированное расследование всех случаев аварийных ситуаций, нарушений требований биологической безопасности и несчастных случаев. Своевременный анализ их причин и доведение необходимой информации до сотрудников позволяет исключить их повторное возникновение.

Для обеспечения биобезопасности необходимо проведение контрольных мероприятий, под которыми подразумевается:

- текущий контроль соблюдения правил работы и охраны труда;
- контроль исправности и эффективности систем обеспечения биобезопасности;
- комплексные целевые и оперативные обследования состояния обеспечения биобезопасности;
- контроль специфической чистоты материальных потоков;
- контроль специфической загрязненности рабочих помещений.

Контрольные мероприятия должны проводиться на всех уровнях, начиная от нештатных инспекторов и начальников подразделений, сотрудников специализированных отделов биологической безопасности и членов комиссии по контролю за соблюдением требований биологической безопасности и кончая руководящим составом НИУ и членов вневедомственной комиссии. Осуществление контрольных мероприятий позволяет своевременно выявить слабые места в организации биобезопасности и снизить вероятность контакта персонала со специфическими вредностями.

4 Организация медицинского наблюдения за персоналом микробиологических лабораторий

Медицинские мероприятия включают медицинскую профилактику и лечение профессиональных заболеваний.

- В понятие медицинской профилактики (медицинского наблюдения) входят:
- предварительные и периодические медицинские осмотры;
 - проведение вакцинопрофилактики с определением уровня иммунитета до и после вакцинации;
 - определение переносимости антибактериальных препаратов и специфических сывороток;

проведение медицинских осмотров и ежедневной термометрии;

введение ограничительных мероприятий на порядок обращения за медицинской помощью и выезд за пределы места жительства.

Проведение предварительного медицинского осмотра (углубленного медицинского обследования) кандидатов на трудоустройство осуществляется с целью определения соответствия состояния здоровья обследуемых лиц требованиям, предъявляемым к условиям их предстоящей работы (исключение противопоказаний к специфической профилактике и лечению, вакцинации, ревакцинации, введению антибиотиков, глобулинов и других иммунобиологических препаратов, к работе в средствах индивидуальной защите-спецодежде, средствах защите органов дыхания, изолирующих средствах защиты и т.д.). Важным компонентом медицинского освидетельствования является оценка психоэмоциональной сферы привлекаемого сотрудника. Он должен психологически адекватно реагировать на различные ситуации. В противном случае ему будет рекомендовано работать в более безопасной области.

Периодические медицинские осмотры проводятся ежегодно у всех сотрудников, с целью динамического наблюдения за состоянием их здоровья в условиях воздействия профессиональных вредностей, своевременного установления признаков заболеваний, связанных с профессиональной деятельностью, выявления общих заболеваний, препятствующих продолжению работы с ПБА. Конкретные сроки проведения периодических медицинских осмотров определяются приказом начальника НИУ. Периодические медицинские осмотры персонала проводятся в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России от 12 апреля 2011 г. № 302н. Данные, полученные при проведении медицинских осмотров, фиксируются в медицинских книжках работающих. По результатам осмотров делается заключение о возможности допуска сотрудников к работам с ПБА.

Сотрудников, по роду работы соприкасающихся с биологическим материалом I-II групп патогенности или посещающих зонированные помещения корпусов, вакцинируют. Контингент прививаемых лиц и общий порядок проведения вакцинопрофилактики определен в «Руководстве по организации вакцинопрофилактики...», разрабатываемом в каждом учреждении. Вакцинация

сотрудников проводится персоналом инфекционного отделения специализированного медицинского учреждения в соответствии с «Календарем профилактических прививок». Перед вакцинацией и после ее проведения у вакцинируемого сотрудника проводится определение уровня специфического иммунитета принятыми методами. Лица, не прошедшие в установленные сроки вакцинацию (ревакцинацию), от работ в зонированных помещениях отстраняются. В исключительных случаях допуск к работам сотрудников без прохождения вакцинации может быть разрешен приказом начальника НИУ.

Определение переносимости антибиотиков и специфических сывороток проводится у всех сотрудников как при поступлении на работу, так и периодически (не реже 1 раза в 2 года). При поступлении на работу отбираются также пробы крови сотрудников, которые помещаются в банк сывороток, хранящийся в организации.

Осуществляется ежедневный контроль за состоянием здоровья персонала. В рабочие дни под контролем штатного медицинского персонала или нештатных сотрудников проводится двукратное измерение температуры тела у сотрудников, опрос о состоянии здоровья, осмотр видимых кожных покровов и слизистых. В выходные и праздничные дни температура сотрудниками измеряется самостоятельно. При работе с аэрозолями микроорганизмов I-II групп патогенности медосмотр проводится штатными сотрудниками инфекционного отделения. При наличии ссадин, царапин и других нарушений целостности кожных покровов персонал в зонированные помещения не допускается.

Для лиц, работающих с микроорганизмами I-II групп патогенности, предусмотрено введение ограничительных мероприятий на порядок обращения за медицинской помощью и выезд за пределы места жительства.

Сотрудники, при возникновении заболеваний, обязаны обращаться за медицинской помощью только в специализированное медицинское учреждение, обслуживающее данное микробиологическое учреждение. При заболевании дома сотрудник должен, по возможности, ограничить контакты с окружающими людьми и вызвать врача из своего специализированного медицинского учреждения.

Выезд за пределы места жительства сотрудников, работающих с микроорганизмами I-II групп патогенности, допускается только после прохождения обсервации.

Лечение профессиональных заболеваний должно осуществлять в инфекционном отделении специализированного медицинского учреждения. Профилактическое лечение должно начинаться срочно, не дожидаясь окончания инкубационного периода и появления симптомов. Выбор схем и методов лечения осуществляется с учетом возможных путей и дозы заражения.

Использованная литература.

1 Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.1285-03. Минздрав России. М., 2003. (в ред. Изменений и дополнений № 1, утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 12.05.2010 № 55.

2 Юрин Е.А./Юрин Евгений Александрович/ Факторы биологической безопасности. Журн. биозащита и биобезопасность, 2010 № 3-4.

3 Дроздов С.Г, Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. – М.: Медицина, 1987. – 256 с.

4 Старицын Н.А., Волков В.Я., Тюрин Е.А., Стеганцев Н.П., Дьякова Т.А., Маринин Л.И. Физическая и биологическая безопасность на объектах, работающих с опасными и особо опасными патогенами. Сборник докладов I Российского симпозиума по биологической безопасности.

5 Ставский Е.А. Совершенствование системы обеспечения безопасности работ с вирусами I-II групп патогенности. Дисс. на соиск. уч. ст. доктора мед. наук. Кольцово, 2008.

6 Приказ Минздравсоцразвития России «Об утверждении перечней вредных и (или) опасных производственных факторов и работ, при выполнении которых проводятся предварительные и периодические медицинские осмотры (обследования), и Порядка проведения предварительных и периодических медицинских осмотров (обследований) работников, занятых на тяжелых работах и на работах с вредными и (или) опасными условиями труда» от 12 апреля 2011 г. № 302н.

Практическое занятие №2

Тема: «Порядок учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности»

Цель занятия:

Ознакомить обучаемых с классификацией патогенных микроорганизмов и особенностями их учёта и хранения .

Учебные вопросы:

- 1.Классификация микробных культур возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний, используемая в РФ и за рубежом.
- 2.Требования к порядку учёта, хранения ПБА I-IV групп патогенности.

1. Классификация микробных культур возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний, используемая в РФ и за рубежом

Микроорганизмы – возбудители инфекционных заболеваний человека согласно классификации разделены на 4 группы с учётом их патогенности (опасности) для человека:

I группа – микроорганизмы, обладающие высокой индивидуальной и общественной опасностью (высокая контагиозность, отсутствие эффективного лечения и профилактики, тяжелое течение заболевания, высокая летальность);

II группа – микроорганизмы, обладающие высокой индивидуальной и общественной опасностью, но не обладающие контагиозностью (возможность распространения инфекции ограничена);

III группа – микроорганизмы, обладающие низкой индивидуальной опасностью и невысокой опасностью для окружающих;

IV группа – условно-патогенные микроорганизмы (как правило они редко вызывают заболевания у работающих с ними лиц, но при определённых условиях могут вызывать у человека заболевание).

В ветеринарной практике в РФ используется классификация микроорганизмов, основанная на степени их опасности для животных.

При определении уровня защиты персонала биологических учреждений , работающих с ПБА, необходимо руководствоваться классификацией микроорганизмов по степени их патогенности для человека. Отечественная

классификация патогенных микроорганизмов отличается от классификаций, принятой в ВОЗ, в США и в ряде других зарубежных стран, где наиболее опасные микроорганизмы отнесены к IV группе, а наименее опасные к I группе патогенности. Нумерация групп патогенности в зарубежных странах и ВОЗ по отношению к российской классификации «перевернута». В классификации ВОЗ и США к I группе риска относятся малопатогенные микроорганизмы, в России малопатогенные микроорганизмы относятся к IV группе патогенности (опасности).

Классификация микроорганизмов по группам риска в ВОЗ.

Группа риска I (отсутствие или низкая индивидуальная и общественная опасность). Микроорганизмы, которые потенциально не являются возбудителями болезней у человека или у животных, но при определённых условиях могут вызывать у человека заболевание.

Группа риска II (умеренная индивидуальная опасность, низкая общественная опасность). Патогенные микроорганизмы, которые могут вызвать заболевание у человека или животных, но не представляет серьезного риска для лабораторного персонала, населения, домашнего скота или окружающей среды. Неосторожность работы с этими микроорганизмами в лаборатории может вызвать серьезную инфекцию у людей, однако существуют эффективные лечебные и профилактические меры и риск распространения этой инфекции ограничен.

Группа риска III (высокий индивидуальный и низкий общественный риск). Патогенный агент, который обычно вызывает серьезное заболевание у человека или у животных, однако, как правило, не распространяется от больного человека к здоровому. Существуют эффективные лечебные и профилактические меры.

Группа риска IV (высокий индивидуальный и общественный риск). Патогенный агент, который обычно вызывает серьезные заболевания у человека или у животных и легко распространяется от больного к здоровому прямо или опосредованно. Эффективных лечебных и профилактических мер в большинстве случаев нет.

Классификация микроорганизмов в ряде зарубежных стран более приближена к классификации микробных культур США и ВОЗ, чем к принятой в РФ. Перечень патогенных биологических агентов, принятый в ряде зарубежных стран разделен условно на 3 категории: патогенные для людей, для животных и для

растений. Патогенные микроорганизмы из категории «для людей» и из категории «для животных» имеют по четыре группы риска.

Категория микроорганизмов «для растений» имеет три группы риска.

Биологические агенты, воздействующие на человека, по классификации ВОЗ и США, перечисленные в группе риска I, имеют низкий индивидуальный и низкий общественный показатель воздействия. Агенты группы риска II имеют умеренный индивидуальный и общественный показатель риска. Агенты группы риска III имеют высокий индивидуальный и общественный показатель риска. Вещества группы риска IV являются экзотическими для данных стран и имеют высокий индивидуальный и высокий общественный показатель воздействия.

По российской классификации к I группе патогенности (опасности) отнесён возбудитель чумы, по классификации ВОЗ возбудитель чумы отнесён к III группе. В IV группе риска у США только возбудители заболеваний, для которых в настоящее время не существует эффективного специфического лечения или эффективных превентивных средств (вакцин).

Биологические агенты, воздействующие на животных, по классификации ряда стран, например, Республики Куба, разделены на четыре группы риска, классификация их близка к классификации ВОЗ.

Группа риска I – агенты не имеют риска распространения, а также влияния на социально-экономическую среду и здоровье населения.

Группа риска II - имеют небольшой риск распространения. Влияние на социально-экономическую среду и здоровье населения не является серьезным.

Группа риска III - являются причиной значимых заболеваний с точки зрения социально-экономической среды и здоровья населения. При этих инфекциях могут вводиться ограничения на международную торговлю животными и их продуктами.

Группа риска IV - являются экзотическими для страны, оказывают серьезное влияние на экономику и здоровье населения, а также вводятся международные торговые ограничения.

Биологические агенты, воздействующие на растения подразделены на 3 группы риска.

Группа риска I – микроорганизмы обитают на всей территории страны, приводят к неблагоприятным экономическим последствиям для страны, но не влекут за собой экспортных ограничений.

Группа риска II – патогенные микроорганизмы, которые являются экзотическими для страны, склонны к медленному распространению, и не влияют на национальную и международную торговлю.

Группа риска III – высоко патогенные микроорганизмы, официально не зарегистрированы в стране, влекут за собой серьезные экономические последствия, трудно идентифицируемые, мер, ограничивающих их распространение, не существует.

Классификация микроорганизмов по группам риска (ВОЗ, США) и группам патогенности (опасности) России приведены в таблице.

Таблица – Классификация микроорганизмов

Группы риска		Группы патогенности	Степень патогенности микроорганизмов
ВОЗ	США	Россия	
I	I	IV	Малопатогенные
II	II	III	Умеренно патогенные
III	III	II	Патогенные
IV	IV	I	Высоко патогенные

2. Требования к порядку учёта, хранения, отпуска и транспортирования ПБА I-IV групп патогенности.

Требования к порядку учёта, хранения ПБА I-IV групп патогенности изложены в санитарных правилах СП 1.2.036-95, утверждённых постановлением Госкомсанэпиднадзора России 28.08.95г №14. Правила подготовлены в соответствии с «Положением о Государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании», утверждённым постановлением Правительства РФ от 05.06.94г. №625 и устанавливают требования к порядку учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности. В документах, определяющих правила безопасной работы с патогенными микроорганизмами, порядок их учёта, хранения, передачи и уничтожения используется аббревиатура

ПБА- патогенные биологические агенты. Это понятие включает бактерии, вирусы, риккетсии, грибы, простейшие, микоплазмы, токсины и яды биологического происхождения или материал, подозрительный на их содержание, а также любые микроорганизмы, включающие фрагменты генома названных ПБА и представляющих опасность для человека.

Требования правил обязательны для выполнения всеми организациями на территории России независимо от их ведомственной принадлежности и формы собственности, а также юридическими и физическими лицами, проводящими работы с использованием ПБА I-IV групп.

Правила устанавливают единый порядок учёта, хранения, передачи ПБА и направлены на обеспечение личной и общественной безопасности при их транспортировании, а также исключение несанкционированной передачи и безучётного хранения.

Работу с ПБА I-IV групп патогенности проводят только в организациях, имеющих разрешение на право работы с ними, выданные в соответствии с Санитарными правилами-СП 1.2.006-93.

Работа с ПБА I-II групп патогенности должна проводиться в соответствии с СП 1.2.011-94- «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности».

Работа с микроорганизмами III-IV групп должна проводиться в соответствии с СП 1.3.2322-08- «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Работа предприятий по производству бактериальных и вирусных препаратов определяется «Правилами техники безопасности, производственной санитарии и санитарно-противоэпидемического режима для предприятий по производству бактериальных и вирусных препаратов».

В подразделениях, изготавливающих вакцины, обслуживающих водопроводы, пищевые предприятия, а также предприятия, продукцию медицинского назначения (антибиотики, лекарственные и косметические средства и другие коммерческие препараты), запрещается иметь ПБА I-IV групп и проводить микробиологические исследования, связанные с изучением первично выделенных культур, подозрительных на наличие возбудителей I-IV групп.

Производственным подразделениям предприятий, контролирующим готовую продукцию, разрешается иметь только коллекцию типовых культур, предусмотренных нормативно-технологической документацией.

ПБА I-IV групп, выделенные при диагностических и иных исследованиях в лабораториях, не имеющих права на работу с ними, должны быть переданы в специализированные организации, определяемые соответствующими министерствами и ведомствами.

В организациях, систематически работающих с ПБА I-IV групп, разрешается иметь коллекции типовых, авторских и депонированных штаммов для научной работы, производства и диагностических целей.

Для централизованного учёта, хранения и депонирования штаммов микроорганизмов, имеющихся в организациях на территории России, министерства и ведомства определяют научно-исследовательские институты, на базе которых организуются специализированные с информационными функциями. (Отдельные специализированные коллекции перечислены в приложении 5.5).

О выделении всех ПБА I-II групп и атипичных ПБА III-IV групп необходимо информировать соответствующие специализированные коллекции и по согласованию с их руководителями передавать эти ПБА в коллекции.

ПБА I-II групп, не подлежащие передаче в коллекции, уничтожают по распоряжению руководителя организации, а ПБА III-IV групп - руководителя подразделения.

Варианты ПБА, полученные в ходе выполнения НИР, хранят в специализированных коллекциях как охраноспособные (объект патентования) или авторских (имеющих научное значение).

Производственные и эталонные ПБА I-IV групп разрешается получать только в специализированных коллекциях.

Ответственным за хранение коллекционных ПБА является лицо, назначаемое руководителем организации (приказом по организации).

Требования к учёту и хранению ПБА

Подразделения, проводящие диагностические исследования по выделению ПБА I-IV групп или работающие с ними, должны вести учёт движения и хранения ПБА по формам, представленным в Санитарных правилах.

Движение ПБА I-IV групп регистрируют в форме №514 а/у (514/у): для I-II групп- по каждому виду отдельно, а для III-IV-суммарно по роду.

Штаммы, используемые для диагностических целей, а также вакцинные и производственные учитывают по форме 514 а/у.

Окончательное обозначение поступившим штаммам присваивают только после передачи их в коллекцию. Под особым обозначением в соответствующей графе журнала (форма 3515/у) и карте (форма №517/у) указывают название и номер, под которым штамм поступил в данную коллекцию.

Присвоенное коллекционному штамму обозначение (номер, код) не должно меняться при его передаче.

В случае уничтожения штамма его обозначение запрещается присваивать вновь поступившим штаммам.

Уничтожение штамма ПБА I-II групп во всех подразделениях и III-IV групп в коллекциях следует оформлять актом (форма №522/у).

Все журналы по учёту ПБА I-IV групп должны быть пронумерованы постранично, прошнурованы, скреплены печатью и храниться у лица, ответственного за их ведение.

Записи в журналах должны соответствовать другой документации: актам уничтожения ПБА, передачи и др.

Все оконченные журналы учётных форм должны храниться в подразделении (организации) в течение 3 лет. Формы №№514 а/у и 520/у необходимо уничтожать с составлением акта. В диагностических и исследовательских лабораториях формы №№512/у, 513/у и 518/у и журналы идентификации необходимо сдавать в архив. Сроки хранения журналов в архиве устанавливаются приказом Госкомсанэпиднадзора России.

Ёмкости, содержащие ПБА должны иметь чёткие, несмываемые надписи или прочно наклеенные этикетки с обозначением названия ПБА (вид микроорганизма) номер штамма и лиофилизации (пересева).

На ёмкостях с токсинами должна быть дополнительная маркировка красным цветом правого нижнего угла этикетки.

ПБА I-IV групп в коллекциях должны храниться в лиофилизированном в ампулах или замороженном состоянии, на плотных или в жидких питательных средах, а также в виде суспензий органов и тканей в консерванте.

В подразделениях НИИ допускается хранение в лиофилизированном виде ПБА III-IV групп (бактерии, риккетсии), II-IV групп (вирусы), а также хранение авирулентных, комиссионно проверенных ПБА I-II групп, список которых утверждает руководитель организации.

Вскрытие ампул с лиофилизированными ПБА I-II групп оформляется актом (форма №521/у).

ПБА следует хранить в холодильнике или в сейфе отдельно по группам. Совместное хранение ПБА различных групп допускается при условии хранения их в отдельных небьющихся ёмкостях с закрывающейся крышкой. Ёмкости опечатывают, снаружи или внутри их помещают список с перечнем и количеством хранящихся ПБА.

Все ПБА, в том числе патогенные и непатогенные, токсины и яды биологического происхождения, рекомбинантные молекулы ДНК, трансгенные организмы и материалы, подозрительные на их содержание, подлежат учёту. Строгому учёту подлежат пробы, подозрительные на зараженность микробными культурами, разведения микробных культур и лабораторная посуда с остатками ПБА до стерилизации, зараженные животные, куриные эмбрионы, культуры клеток и тканей, насекомые.

Учёт и хранение микробных культур осуществляют сотрудники, имеющие соответствующий допуск к работе с ПБА, который оформляют приказом начальника учреждения один раз в 2 года после комиссионной проверки правил обращения с ПБА.

Контроль за выполнением правил учёта, хранения, передачи и транспортировки ПБА осуществляют заместители начальника учреждения, начальники научно-исследовательских управлений и подразделений, а также сотрудники отдела контроля ББ. В учреждении должны разрабатываться частные инструкции по порядку учёта, хранения, передачи и транспортировки ПБА с

учётом конкретных особенностей работы каждого учреждения. Перечень ПБА и их количество, находящихся у исполнителей, определяется выполняемой тематикой НИР. Расходование ПБА оформляется в журналах с протоколами опытов и в журналах учета движения микробных культур. Уничтожение ПБА в случае прекращения работы с ними проводится на основании распоряжения начальника учреждения комиссионно с составлением акта. Укупорки с ПБА могут храниться в хранилищах корпусов, лабораторий, музеев, имеющих охранную сигнализацию, выведенную на пульт под круглосуточное наблюдение дежурного. Перечень микробных культур, которые могут находиться в нерабочее время в лабораториях и виварии, не оснащенных охранной сигнализацией, определяется начальником подразделения и должен быть ограничен потребностями конкретного эксперимента.

В начале рабочего дня ответственный за хранилище микробных культур вскрывает его и выдает ответственным исполнителям укупорки с микробными культурами. В конце рабочего дня принимает их на хранение. В хранилищах микробных культур допускается выделение отдельных секций (ячеек, отсеков), которые закрепляются за ответственными лицами.

В отсутствие ответственного за хранилище секция может быть вскрыта по разрешению начальника подразделения комиссией в составе не менее двух человек, о чем составляется акт в инвентарной книге хранилища.

По окончании работы с ПБА все помещения и хранилища ПБА проверяют, запирают на замки, опечатывают и сдают под охрану дежурному. Ключи от входных дверей лабораторий (помещений) и хранилищ ПБА в опечатанных пеналах сдают дежурному. Сотрудники, проводящие исследования с ПБА, должны вести учет их движения и наличия. Учет ПБА должен отражать фактическое наличие их у исполнителей по укупоркам (пробиркам, чашкам, флаконам, матрацам). Учет биологических препаратов и концентрированных суспензий при массе нетто в укупорке более 100 г ведется по весу. Расфасовка в более мелкие укупорки оформляется актом, который сохраняется до очередной годовой проверки наличия микробных культур.

Все записи по учету и расходованию ПБА в журналах учёта движения ПБА заверяются подписью ответственного исполнителя, а при передаче ПБА –

подписью лица, которому он передан. Сотрудники, имеющие в своем распоряжении ПБА, обязаны ежедневно контролировать их наличие, обеспечивать правильный учет и сохранность. Начальники подразделений обязаны еженедельно лично проверять состояние учета, расходования и хранения микробных культур, контролировать правильность их расходования по протоколам опытов (работ) и лично заверять записи в журналах учета исполнителей.

Состояние учета микробных культур и их наличие проверяется два раза в год (в мае и в ноябре) комиссией, назначаемой приказом начальника учреждения. Обо всех нарушениях правил учёта ПБА председатель комиссии обязан немедленно поставить в известность начальника подразделения и начальника отдела контроля биологической безопасности.

Передача ПБА внутри подразделения от одного сотрудника другому осуществляется по письменному разрешению начальника подразделения, которое оформляется в журнале учета микробных культур исполнителя, передающего микробные культуры. При передаче микроорганизмов I-II групп патогенности оформляется акт в журнале учёта движения микробных культур сотрудника, их передающего.

Передача микроорганизмов I-II групп патогенности из одного подразделения в другое осуществляется по письменному разрешению начальника учреждения. Все разрешения на передачу микробных культур между подразделениями согласуются с заместителем начальника учреждения по режиму.

Перенос микробных культур из хранилища в рабочее помещение осуществляется в герметично закупоренных, влагонепроницаемых контейнерах персоналом, одетым в рабочую одежду. Перед выносом укупорок с ПБА из лабораторных помещений для закладки на хранение или последующей передачи контейнеры с микробными культурами подвергают дезобработке. Контроль за передачей ПБА за пределы организации и в зарубежные страны должен соответствовать требованиям «Положения об осуществлении контроля за внешнеэкономической деятельностью в отношении возбудителей (патогенов) человека, животных и растений, генетически измененных микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий» и Указа Президента РФ от 08.08.2001 г. № 1004.

Учет и работа с ПБА, получаемыми в процессе культивирования, сепарирования и сушки, фиксируется ответственным сотрудником в журналах учета движения микробных культур, по сменам в соответствующих технологических блоках.

В этих журналах должны быть в отдельных разделах приведены:

- перечень аппаратов, установок с указанием их производительности и времени загрузки по сменам, их нумерация;
- получаемые по сменам микробные культуры;
- используемая в работе с микробными культурами посуда;
- акты расфасовки микробных культур;
- акты уничтожения некондиционных микробных культур.

Взвешивание должно проводиться на весах, имеющих поверительное клеймо, технические паспорта или формуляры. Весы и гири должны подвергаться проверке не реже одного раза в год. Установку, техническое обслуживание, эксплуатацию и хранение весов и разновесов осуществляют в соответствии с техническими паспортами.

Взвешивание микробных культур и гермотары массой от 0,1 до 10 кг проводят на лабораторных весах 3-4 класса при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ (температуре эксплуатации весов). Масса нетто микробных культур определяется разницей массы заполненной и пустой тары, которая определяется как среднее арифметическое по трем взвешиваниям. Тара после взвешивания снабжается биркой (этикеткой), на которой указываются: «Опасно» красным цветом или «Не опасно» синим цветом, название микробных культур, номер партии, дата изготовления, номер тары, масса тары, масса брутто, тип весов, использованных при взвешивании, фамилии ответственного лица (владельца).

Прием укупорок с микробными культурами в музей, доставленных из других учреждений или выделенных сотрудниками НИО, проводится по акту комиссией, включающей начальника подразделения, представителя службы режима и ответственного за музей. Акт утверждается начальником учреждения. Аналогично проводится изъятие микробных культур из музея или их уничтожение. Акт уничтожения утверждает начальник учреждения. На основании акта проводится списание микробных культур с учета.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Указ Президента РФ от 08.08.2001 г. № 1004 «Об утверждении Списка возбудителей (патогенов) человека, животных и растений, генетически измененных микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю».

2. Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I-IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами. СП 1.3.1318-03: Минздрав России. М., 2003.

3. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). СП 1.3.1285-03. Минздрав России. М., 2003.

4. Порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I-IV групп патогенности. СП 1.2.036-95: Минздрав России. М., 1995.

5. Положение об осуществлении контроля за внешнеэкономической деятельностью в отношении возбудителей заболеваний (патогенов) человека, животных и растений, генетически измененных микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий. Утв. Постановлением Правительства РФ от 29.08.01г. № 634.

6. Безопасность работы с микроорганизмами I-IV групп патогенности (опасности) в научно-исследовательских организациях биологической защиты войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации. ВСП 261-04. М., 2004.

Практическое занятие №3

Тема: «Полимеразная цепная реакция и перспективы её использования для диагностики инфекционных заболеваний»

Вопросы:

1. Введение
2. Механизмы полимеразной цепной реакции
3. Подготовка исследуемой пробы для ПЦР-анализа
4. Методика постановки полимеразной цепной реакции
5. Детекция продуктов полимеразной цепной реакции
6. Предупреждение ложно-положительных результатов ПЦР
7. Альтернативные ПЦР-методы амплификации нуклеиновых кислот

1. Введение

В настоящее время для диагностики инфекционных заболеваний широко используется метод амплификации ДНК посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР), разработанный американским исследователем К.В.Муллис в 1985 г. Этот метод до сих пор является основным как для целей медицинской диагностики, так и для решения задач молекулярной генетики и биологии, особенно в связи с созданием такого варианта ПЦР, как "лонг-ПЦР", позволяющего копировать последовательности ДНК, превосходящие по своей длине геном ВИЧ 1 более чем в 4 раза (W.M.Barnes, 1994). Однако в последние 5 лет был предложен ряд методов амплификации как ДНК, так и РНК, альтернативных ПЦР, в том числе амплификации специфических ДНК-зондов и РНК-зондов. Некоторые из этих методов оказались менее затратными, более чувствительными и быстрыми.

До изобретения ПЦР и других методов амплификации нуклеиновых кислот для выявления ДНК возбудителей инфекционных заболеваний использовали ДНК-зондовую детекцию, основанную на гибридизации меченных радиоактивным изотопом или флуоресцентным веществом специфических олигонуклеотидных зондов с образцом выделенной ДНК. Однако ДНК-зондовая диагностика имеет существенные ограничения как по своей чувствительности, так и по трудоемкости и длительности проведения анализа: для ее осуществления необходимо выделить достаточно интактную ДНК из не менее чем 10.000 клеток, а сам процесс гибридизации не может

быть полностью автоматизирован. Предварительная быстрая амплификация *in vitro* (полимеразная цепная реакция) позволяет выявлять в анализируемых пробах единичные микробные клетки и, в большинстве случаев, делает необязательным применение для детекции ДНК-гибридизацию. Амплифицированная ДНК без предварительного клонирования может быть подвергнута секвенированию для выявления точечных мутаций.

Основные преимущества метода ПЦР-анализа при выявлении возбудителей инфекционных заболеваний

1. Метод прямой и позволяет достичь предельно возможной чувствительности: от нескольких копий до одного возбудителя в пробе.

2. Специфичность метода равна 100%.

3. Для ПЦР-анализа пригоден любой материал, в том числе и гистологические препараты.

4. Количество исследуемого материала, как правило, составляет несколько десятков микролитров, но при низкой концентрации возбудителя может быть увеличено в сотни и тысячи раз за счет выделения и концентрирования ДНК и РНК.

5. Метод позволяет определять число копий возбудителя в пробе и тем самым контролировать вирусемию или бактеремию в процессе лечения.

6. Исследуемый материал может быть обеззаражен специальными методами после его забора, и, следовательно, исключается возможность инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР.

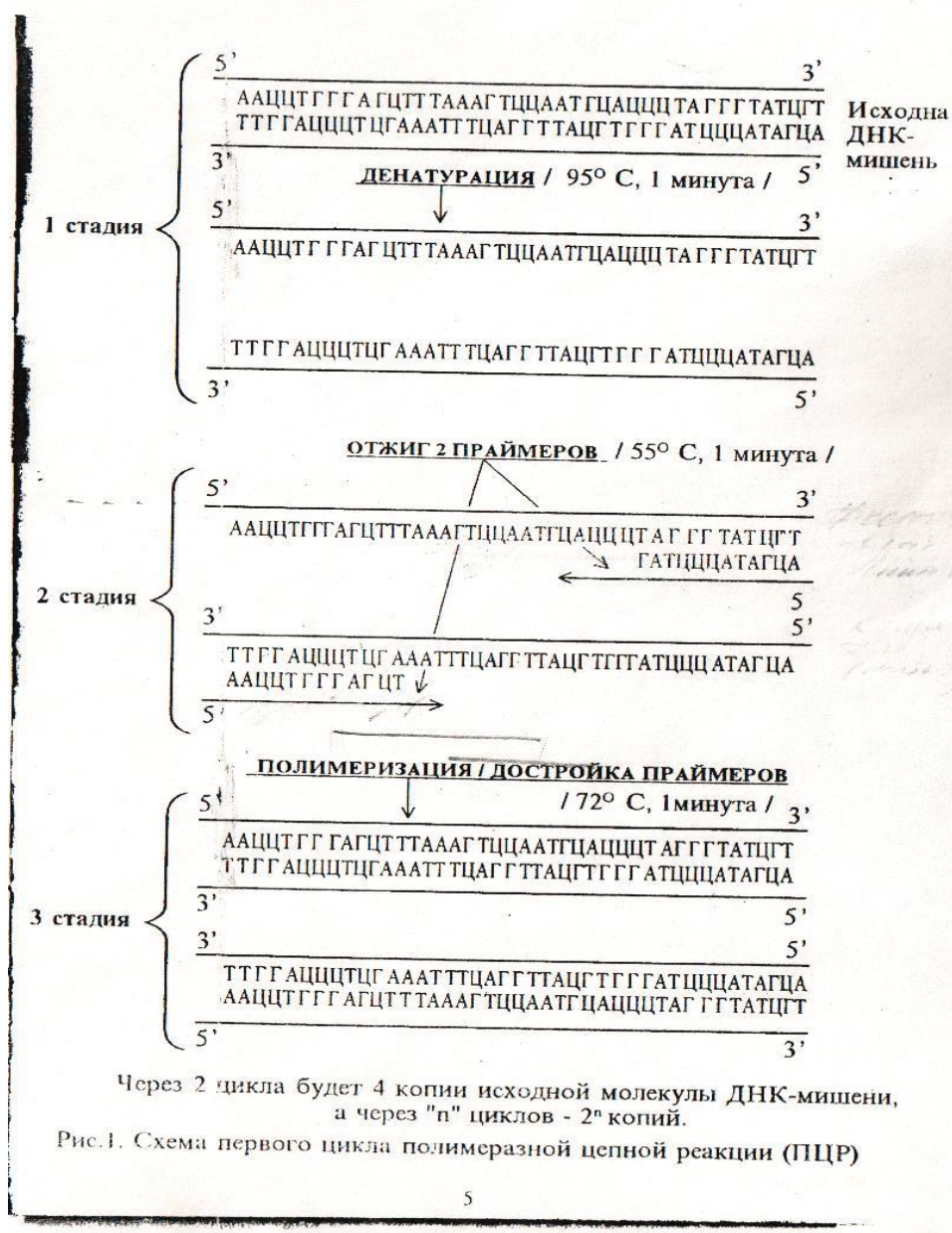
7. Простота исполнения анализа и возможность его полной автоматизации.

8. Экспрессность анализа-результаты получают через несколько часов, то есть, в течение одного рабочего дня.

2. Механизмы ПЦР

Изолированное умножение гена или его фрагмента называют амплификацией. ПЦР позволяет осуществлять амплификацию в пробирке при помощи фермента термостабильной ДНК-полимеразы из 4 дезоксинуклеозидтрифосфатов, являющихся структурными элементами всякой ДНК и коротких олигонуклеотидных 20-30-членных затравок (праймеров), комплементарных 3'-концевым последовательностям антипараллельных цепей ДНК гена. Повторяя 3 стадии (денатурация, отжиг и полимеризация), изображенные на рисунке 1, 30-35 раз за 2-3 часа получают

миллионы копий специфического участка ДНК вируса, бактерии или клеток крови.



Постановка ПЦР-анализа состоит из 3 основных этапов: подготовки исследуемой пробы, которая в большинстве случаев сводится к выделению ДНК или РНК (1), собственно ПЦР (2) и детекции продукта ПЦР (амплифицированной ДНК) (3).

Пятью основными компонентами ПЦР являются следующие:

- а) фермент Taq-ДНК-полимераза;
- б) пара олигонуклеотидных праймеров;
- в) 4 типа дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ);
- г) копируемая ДНК;
- д) ионы Mg^{+2} .

Вспомогательными компонентами являются буферный раствор и минеральное масло. Краткое описание компонентов, используемых при формировании реакционной смеси:

Фермент Таq-ДНК-полимераза при оптимальных условиях ПЦР содержится в 50-100мкл реакционной смеси в количестве 0,5-2 единицы. Она и синтезирует цепь ДНК до 1000 пар оснований в минуту. Увеличивая время полимеризации и подбирая новые разновидности Таq- ДНК-полимеразы, обладающие и экзонуклеазной. (редактирующей) активностью, вырезающей ошибочные (некомплементарные) нуклеотиды, W.M.Barnes удалось получить очень длинные амплифицированные ДНК до 42000 пар оснований (Лонг-ПЦР). Большой избыток Таq-ДНК-полимеразы увеличивает образование неспецифических продуктов ПЦР.

Праймеры - это короткие, длиной 20-30 оснований, одноцепочечные ДНК (дезоксиолигонуклеотиды), комплементарные 3'-концам цепей копируемой ДНК-матрицы, благодаря которым ограничивается фрагмент ДНК, который будет миллионы раз скопирован ферментом Таq-ДНК-полимеразой, присоединяющейся к 3'-концам праймеров и достраивающей их до заданной длины в несколько сот или тысяч пар оснований. Поскольку праймеры каждый раз встраиваются в амплифицируемые фрагменты ДНК-матрицы (амплификоны), то они в реакционной смеси ПЦР должны присутствовать в избытке: концентрация их составляет 0,5-1,0мкМ. Специфичность получаемого продукта ПЦР в значительной степени определяется так называемой температурой отжига праймеров, при которой они взаимодействуют с комплементарными участками ДНК-матрицы, образуя двухцепочечные структуры. Температура отжига определяется длиной праймера и содержанием ГЦ-пар и рассчитывается по следующей формуле:

$$T = [(A+T) \times 2] + [(G+C) \times 4] - 5 \text{ } (K.Itakura \text{ et al}).$$

При отклонениях в температуре плавления внутри одной пары праймеров выбор температуры отжига будет менее строгим. Как правило, праймеры для ПЦР-идентификации разных видов микроорганизмов создают на консервативные участки их ДНК, которые редко подвергаются генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

Дезоксинуклеозидтрифосфаты (дНТФ): дАТФ, дТТФ, дГТР и дЦТР в реакционной смеси содержатся в эквивалентных концентрациях от 200 до 500мкМ, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов в ПЦР.

Магний необходим для функционирования фермента Taq-ДНК-полимеразы, но оптимальная концентрация его устанавливается путем титрования, поскольку концентрация свободных ионов Mg зависит не только от добавленного его количества, но и от концентраций нуклеиновых кислот, праймеров и дНТФ, которые связывают ионы магния. Средние величины концентрации Mg в реакционной смеси составляют около 2-3мМ.

Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента. Наиболее распространен Трис-НСl-буфер, который удерживает рН во время ПЦР между 6,8 и 7,8, содержит желатин или бычий сывороточный альбумин и неионные детергенты для стабилизации фермента, 50 мМ KCl.

Минеральное масло наслаивают на поверхность реакционной смеси в количестве 30-40мкл для предотвращения испарения воды в процессе ПЦР.

Длина амплификонов, начиная с третьего цикла, становится стандартной, то есть соответствует числу пар нуклеотидов фрагмента ДНК-матрицы между 3'-концами смыслового и антисмыслового праймеров (рисунок 2, таблица 1).

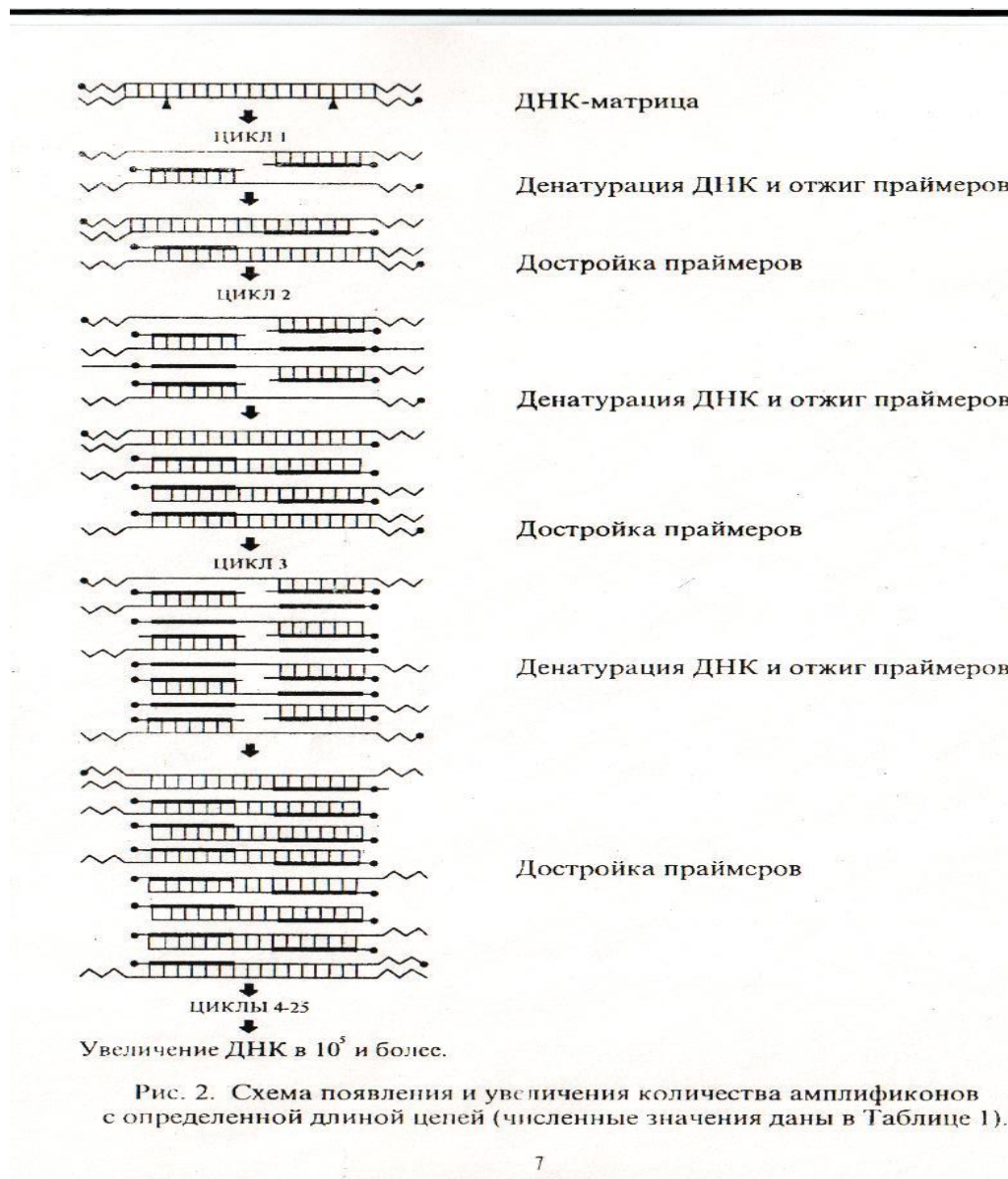


Таблица №1.- Теоретическое число амплифицированных в ПЦР двухцепочечных молекул ДНК с неопределенной длиной и коротких со строго определенным числом пар оснований (амплификонов)

х - число копий молекул ДНК- матрицы = 1; эффективность амплификации принята за 100 %.

Число циклов	Число молекул ДНК с неопределенной длиной	Число молекул ДНК с определенной длиной -	Общее число молекул ДНК
(n)	$x(2^n - 2)$	$(2^n - 2) \cdot x$	$2^n \cdot x$
0	0	0	1
1	0	0	2
2	2	0	4
3	4	2	8
4	6	8	16
5	8	22	32
6	10	52	64
7	12	114	128
8	14	240	256
9	16	494	512
10	18	1004	1024
20	38	1048538	1024^2
30	58	$1,1 \times 10^9$	1024^3
40	78	$1,1 \times 10^{12}$	1024^4
50	98	$1,1 \times 10^{15}$	1024^5

Примечание: Если объем ПЦР-пробирки = 100 мкл, то число 10^{15} амплифицированных молекул будет составлять 1,7 п. mol, а концентрация 17×10^{-6} М (A.Rolfs, I.Schuller, U.Finckh, 1.Weber-Rolfs " PCR: clinical diagnostics and research" Springer-Verlag, 1991 >

Кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе (20-25 циклов), после чего начинается выход на плато (после 40-45 циклов) в силу истощения дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ), праймеров и нарастающего температурного повреждения Taq-ДНК-полимеразы, конкуренции за фермент амплификонов, когда их число начнет превышать число молекул Taq-ДНК-полимеразы. При содержании в реакционной смеси около 10 молекул ДНК-матриц, как правило, достаточно 35 циклов.

3. Подготовка исследуемой пробы для ПЦР-анализа

При отсутствии в пробе ингибиторов Taq-ДНК-полимеразы, например,

Таблица 2

Содержание ДНК в некоторых клетках, грибах, бактериях и вирусах, размер их геномов и число копий в 1 мкг (1 kb=1.1 ag)

Название клеток, грибов, бактерий, вирусов	Содержание ДНК в геноме	Размер генома (пар оснований)	Число копий генома в 1 мкг
Диплоидная клетка человека	около 7 pg	6.6×10^9	14×10^8
Выпавший волос человека	0.3 мкг		
Дрожжи пивные	22 fg	2×10^7	0.5×10^8
E. coli	4.6 fg	4.2×10^6	2.2×10^8
MTV	2.75 pg	2.5×10^9	16×10^8
HBV	3.52 ag	3.2×10^9	2.8×10^8
CMV	0.25 fg	2.3×10^5	4×10^9
HSV	0.17 fg	1.5×10^5	5.9×10^9

гемоглобина или других органических и неорганических соединений, и наличия в исследуемой пробе не менее десятка копий ДНК-матрицы, подготовка пробы может быть полностью исключена. Например, вирус гепатита В в сыворотке крови или возбудителей инфекционных менингитов в спинномозговой жидкости, можно детектировать методом ПЦР без проведения этапа пробоподготовки и без предварительного выделения из микроорганизмов, находящихся в пробе, ДНК. В большинстве случаев из микроорганизмов, находящихся в исследуемых пробах крови, сыворотки, лейкоцитов, биоптатов, мочи, мокроты для исключения ложно-отрицательного результата следует выделять ДНК тем или иным способом. Как показано в таблице 2, содержание ДНК в геномах клеток человека, грибов, бактерий и вирусов различается в десятки раз.

Благодаря этапу пробоподготовки и выделению ДНК из микроорганизмов, находящихся в исследуемых пробах происходит удаление ингибиторов Taq-ДНК-полимеразы и концентрирование ДНК-матрицы в малом объеме. В последние годы ряд фирм производит наборы для быстрой экстракции ДНК или РНК из различных материалов, подвергаемых анализу методом ПЦР. Общее количество ДНК, вносимой в пробирку для ПЦР, не должно превышать 1 мкг, поскольку большой избыток неспецифической ДНК снижает специфичность и чувствительность ПЦР-анализа. Подготовка пробы (выделение ДНК или РНК) должна проводиться в условиях, исключающих перекрестное загрязнение исследуемых проб выделяемыми нуклеиновыми кислотами. Для исключения ложно-положительного результата ПЦР-анализа необходимо обязательное использование чистых перчаток, одноразовых пробирок и наконечников к автоматическим пипеткам, проведение

предварительной ультрафиолетовой обработки помещения и рабочих поверхностей столов и приборов.

Следует подчеркнуть, что ДНК эукариотических клеток, вирусов и бактерий при нейтральной и слабощелочной рН при условии инактивации ДНК-азы (замораживание, высушивание, температурная или химическая денатурация белков, добавка ингибиторов ДНК-аз) пригодны для ПЦР-анализа в течение длительного времени (десятки, сотни и даже тысячи лет).

РНК-матрицы клеток вирусов и бактерий менее устойчивы: быстро гидролизуются очень активными эндогенными и экзогенными РНК-азами, при щелочных и кислых значениях рН, поэтому материал для анализа методом РТ-ПЦР должен подвергаться немедленному исследованию или храниться при температуре минус 70°C в присутствии ингибиторов РНК-аз.

4. Методика постановки полимеразной цепной реакции

Специфичность и чувствительность ПЦР-анализа могут значительно варьировать в зависимости от концентрации и качества 5 основных компонентов реакционной смеси (ДНК-матрицы, Taq-полимеразы, праймеров, дезоксинуклеозидтрифосфатов и ионов Mg) и температурного режима ПЦР. Типичный состав и концентрации компонентов смеси ПЦР в объеме 100 микролитров:

1. ПЦР буфер x 10 (десятикратный) 10мкл
2. Раствор 4 дезоксинуклеозидтрифосфатов в воде, рН 7,0 (по 8мкл каждого):
 - дАТФ - 10мМ
 - дГТФ – 10мМ
 - дЦТФ – 10мМ
 - дТТФ – 10мМ
3. Праймер 1 (5 наномолей в 200мкл) – 1-5мкл;
4. Праймер 2 (5 наномолей в 200мкл) – 1-5мкл;
5. Taq-ДНК полимеразы 5 ЕД/1мкл – 0,5мкл;
6. MgCl (25мМ) 4-16мкл;
7. Амплифицируемая ДНК-матрица-не более 1мкг на пробирку;
8. Дистиллированная вода-до конечного объёма 100мкл.

В таблице 3 приведены диапазоны вариаций основных параметров ПЦР для получения максимальной специфичности и чувствительности ПЦР. Даже при оптимальных концентрациях фермента Taq-ДНК полимеразы, ионов Mg, праймеров и дезоксинуклеозидтрифосфатов специфичность и чувствительность ПЦР-анализа очень сильно зависит от температуры отжига праймеров (2-я стадия цикла ПЦР): неспецифичность ПЦР-амплификации повышается при снижении температуры отжига ниже оптимальной и при повышении концентраций праймеров и дезоксинуклеозидтрифосфатов выше оптимальных, а при повышении температуры отжига выше оптимальной

Стратегия оптимизации ПЦР-амплификации

Варьируемые параметры	Диапазон вариаций	Градиент вариаций
Температура отжига	45-62 ^a С	2-3 ^o С
Количество единиц Taq-ДНК-полимеразы на пробирку	0,5-3,0 ед.	0,5 ед./100 мкл
Концентрация Mg ⁺²	1,25-3,00 мм	0,25 мМ
Концентрация каждого праймера	0,2-2,0 мкМ	0,5 мкМ

снижается выход специфической амплифицируемой ДНК до полной остановки реакции (при значениях температуры отжига, когда праймеры не в состоянии взаимодействовать с ДНК-матрицей).

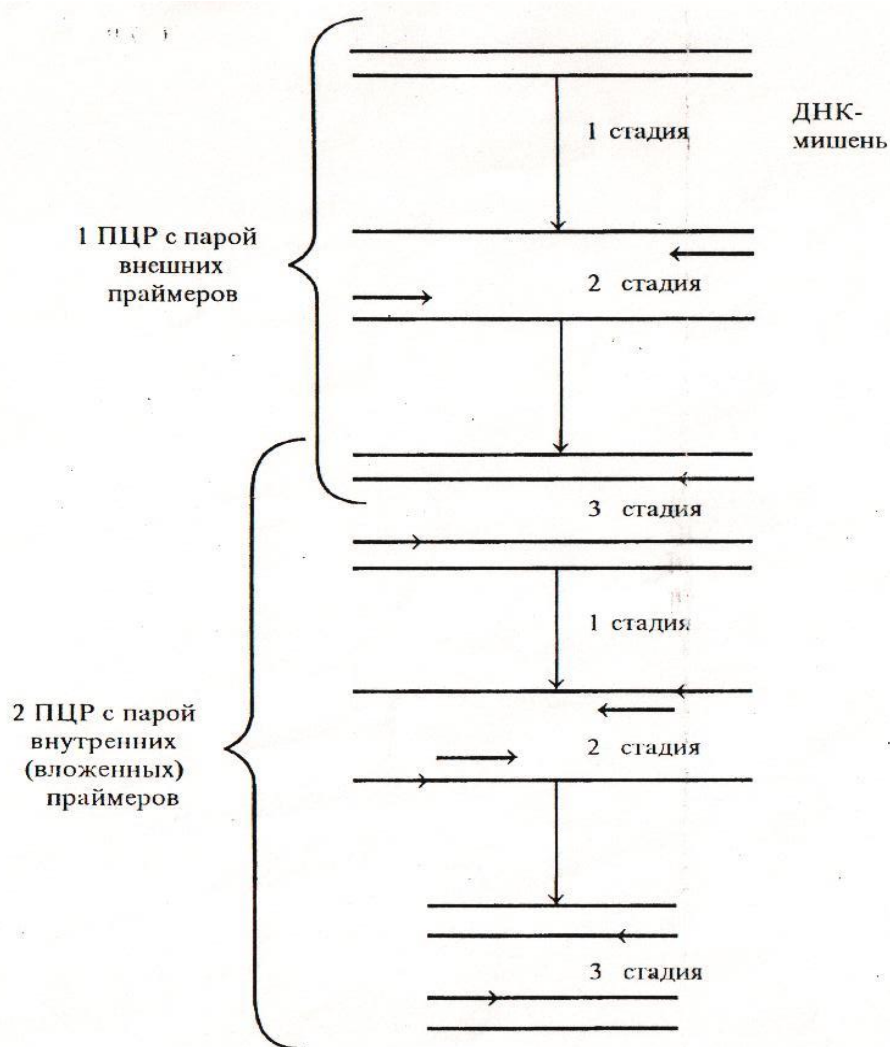


Рис. 3. Принцип ПЦР с вложенными праймерами (nested - PCR)

Дополнительные возможности повышения специфичности и чувствительности ПЦР-анализа дает так называемая "Nested-PCR", проводимая с 2

парами праймеров: первый раз с внешними праймерами, второй - с внутренними (nested) праймерами, как показано на схеме (рис.3). Такой вариант ПЦР значительно повышает как специфичность, так и чувствительность ПЦР-анализа.

В последние годы при разработке диагностических тест-систем, основанных на полимеразной цепной реакции, широко используется такой методический прием, как "горячий старт ПЦР". Этот методический подход заключается в том, что предварительно формируют реакционную смесь без внесения в неё Taq-ДНК-полимеразы. Реакционную смесь в микропробирке заливают сверху парафином либо другим легкоплавким веществом. В таком виде пробирки с реакционной смесью можно хранить в течение длительного времени. Перед постановкой ПЦР-анализа в микропробирку вносят ДНК исследуемой пробы и Taq-полимеразу и помещают в амплификатор. Перед началом циклов амплификации пробирки с реакционной смесью прогревают при температуре 95°C в течение 3-5 минут. Парафин плавится и компоненты реакционной смеси перемешиваются. Затем запускается программа амплификации ДНК-мишени. Такой методический прием предупреждает амплификацию неспецифических ДНК-фрагментов вследствие низкотемпературного, неспецифического связывания праймеров с ДНК-мишенью.

Существует шесть основных способов, при помощи которых можно повысить количество амплифицированной ДНК (усилить ПЦР-сигнал) при низкой концентрации ДНК-матрицы (вируса, бактерии, мутантных генов):

1. Усиление денатурации ДНК-матрицы: денатурировать ДНК при температуре 94-99°C до начала ПЦР или увеличить время начальной денатурации до 3-5 минут;

2. Увеличение специфичности праймеров: при длине 18-30 пар нуклеотидов содержание Г+Ц - пар должно составлять около 50%, а комплементарность по 3'-и 5'-концам праймеров должна быть исключена;

3. Подбор оптимальных концентраций реагентов и температуры отжига: подобрать оптимальные концентрации Taq -полимеразы, праймеров и ионов магния, повысить температуру отжига праймеров;

4. Применение технологии "горячий старт": произойдет увеличение выхода специфического продукта ПЦР;

5. Увеличение продолжительности ПЦР до 40 циклов и использование ПЦР с "вложенными" праймерами (технология nested-PCR): увеличение чувствительности и специфичности ПЦР;

6. Применение более чувствительной гибридационно-ферментной детекции амплифицированной ДНК. Этой методологией владеть

необходимо, так как концентрации идентифицируемых микробных культур, особенно в первично отобранных из объектов окружающей среды пробах, варьируют в широких пределах, и по этой причине ПЦР-результаты могут быть отрицательными даже при оптимальных условиях ее проведения. Знание этих способов позволяет получить дополнительную уверенность в достоверности результатов, полученных при идентификации микроорганизмов.

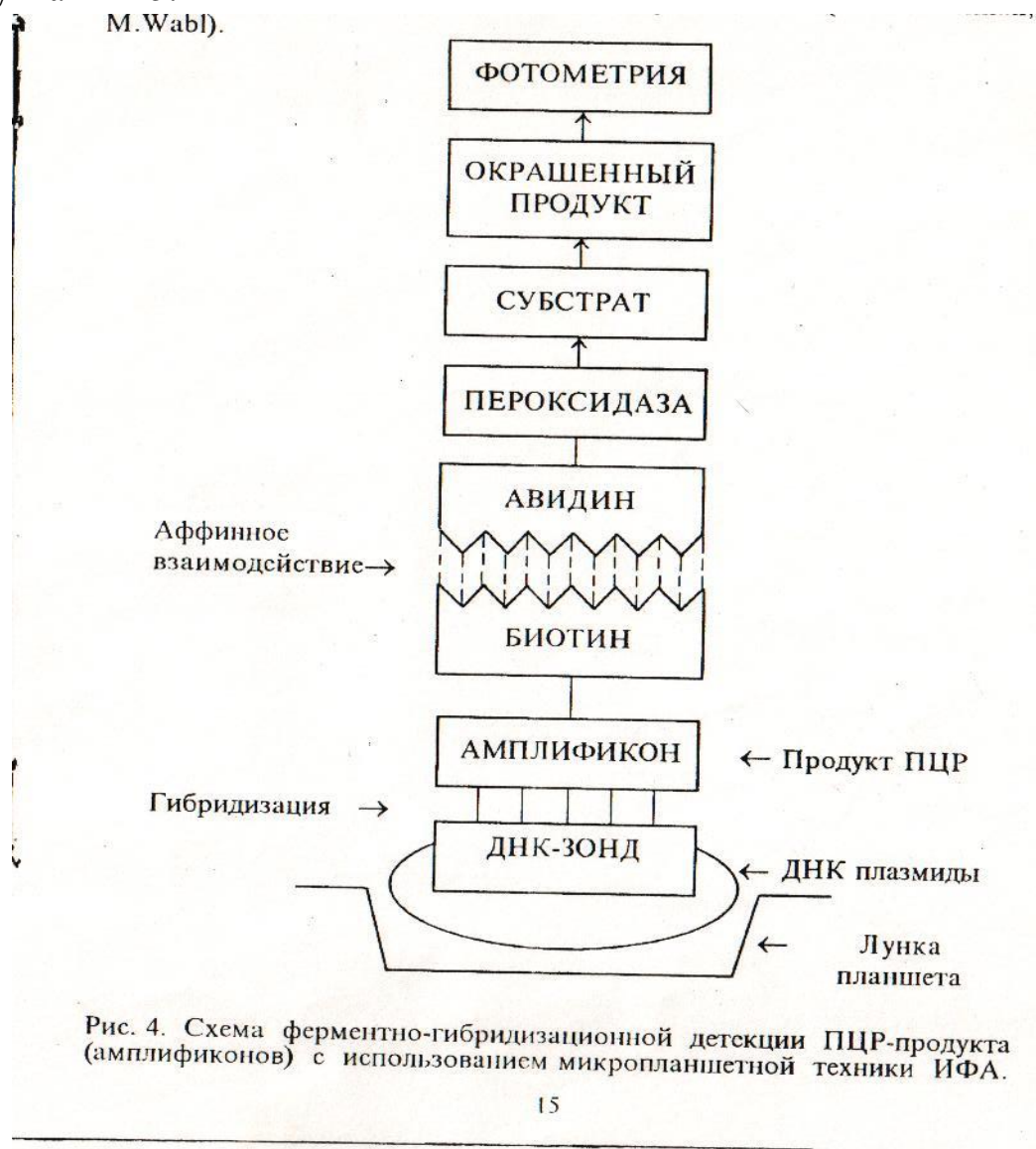
При использовании РНК в качестве матриц для ПЦР предварительно на этой РНК-матрице посредством фермента РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратная транскриптаза, ревертаза) синтезируют комплементарную ДНК (кДНК), которая затем используется в качестве матрицы в ПЦР. В середине 90^х-годов была получена термостабильная Taq -полимераза из бактерии *Thermus thermophilis*, так называемая Tth-ДНК-полимераза, которая наряду с ДНК-полимеразной активностью обладает и обратной-транскриптазной активностью, что позволило эти две реакции совместить и проводить одновременно в одной и той же пробирке. ОТ-ПЦР широко применяют для детекции РНК-содержащих вирусов, определения экспрессии вирусных, бактериальных и клеточных генов по их РНК.

5. Детекция продуктов полимеразной цепной реакции

Присутствие специфического ПЦР-продукта (амплификона) в реакционной смеси после завершения всех циклов амплификации в подавляющем большинстве случаев детектируют электрофоретическим методом путём разделения продуктов амплификации в агарозном или полиакриламидном гелях с последующей окраской бромистым этидием. Для электрофоретического разделения необходимо не менее 20нг ДНК. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждается ее положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам и ДНК-стандарту. Дополнительные доказательства специфичности амплификона можно получить путем расщепления специфическими рестриктазными ферментами или путем гибридизации со специфическим радиоактивным или флуоресцентным олигонуклеотидным зондом. При жидкостно-фазной гибридизации зонд добавляют к амплификату, а затем проводят электрофорез в геле. При твердофазной гибридизации амплификат фиксируют на мембране, а затем гибридизуют с зондом. Такое подтверждение специфичности в практической диагностике проводят редко, по обстоятельствам.

Прямое секвенирование амплифицированного участка ДНК является также надежным методом доказательства специфичности анализа, но применяется в основном для идентификации точечных мутаций в генах.

Для детекции и одновременно количественной оценки амплифицированной ДНК часто применяют гибридизационно-ферментный метод на микропланшетах. Вариант такого метода схематично показан на рисунках 4 и 5.



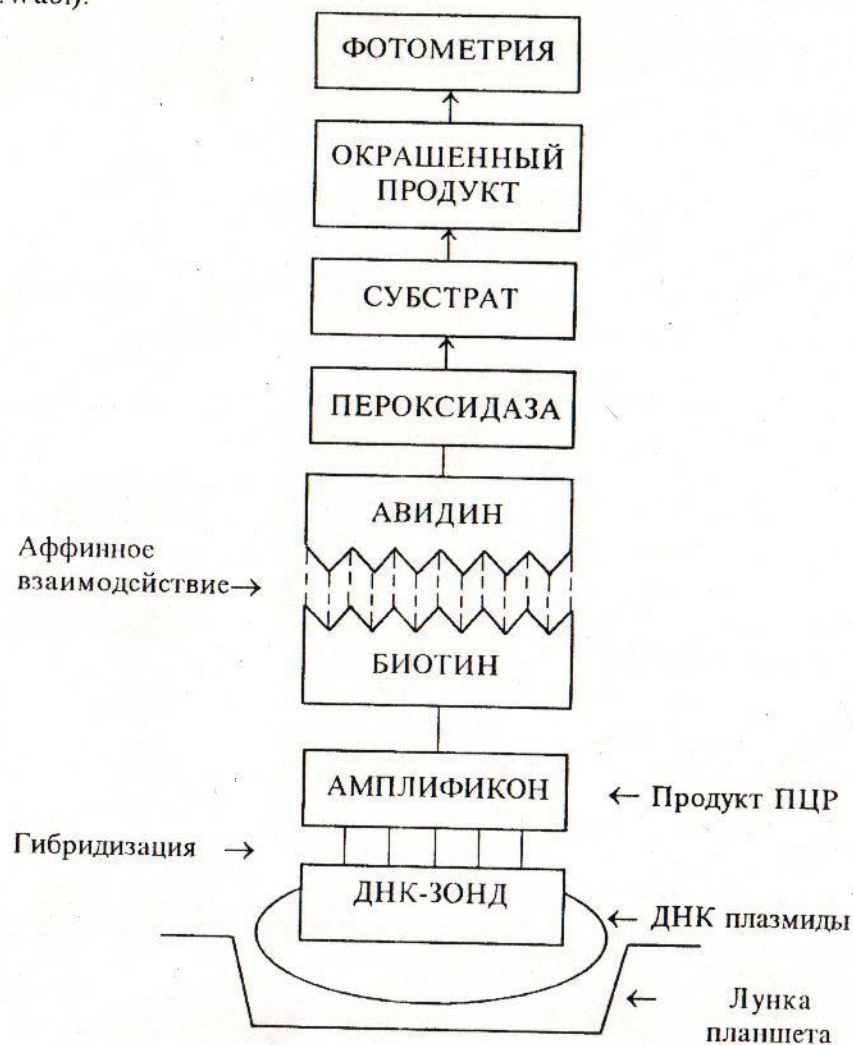


Рис. 4. Схема ферментно-гибризационной детекции ПЦР-продукта (амплификонов) с использованием микропланшетной техники ИФА.

15

Но существуют и другие варианты, в которых применяется олигонуклеотидный зонд, меченный дигоксигенином или флуоресцеином с последующим проявлением моноклональными антителами к дигоксигенину или флуоресцеину, а также применяют меченные ферментами моноклональные антитела к двуцепочечной ДНК и, наконец, электрохемилюминесцентный метод, в котором применяется зонд, меченный рутением.

6. Предупреждение ложно-положительных результатов ПЦР

Чувствительность ПЦР-анализа очень высокая, поэтому существует высокая степень опасности получения ложно-положительного результата в следствие контаминации реакционной смеси или отдельных реагентов как самой детектируемой ДНК (реже), так и амплификонами (очень часто),

получаемыми в больших количествах во многих пробирках в процессе ежедневной работы. В связи с этим разработаны специальные требования к планировке и режиму работы ПЦР-генодиагностической лаборатории. Причиной получения ложно-положительных результатов являются следующие 3 вида контаминации:

1. Перекрестная контаминация разных проб (в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложно-положительных результатов;

2. Контаминация рекомбинантными плазмидами (ДНК-положительный контроль), содержащими клонированные последовательности детектируемого гена;

3. Контаминация реагентов реакционной смеси продуктами амплификации (амплификонами) является наиболее частой причиной ложно-положительных результатов, поскольку в процессе ПЦР-генодиагностики амплификоны накапливаются в больших количествах и очень легко переносятся с аэрозолями и через расходные материалы (наконечники для автоматических пипеток, микропробирки и др.) и средства индивидуальной защиты (резиновые перчатки, одежду). Поэтому детекция продуктов ПЦР должна проводиться в изолированной комнате сотрудником, не производящим обработку клинических образцов и не готовящим реактивы для ПЦР. Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы должны храниться и использоваться в небольших порциях.

Необходимо постоянно использовать собственные лабораторные контроли периодически применять зашифрованные отрицательные и положительные контрольные образцы для оценки специфичности и чувствительности ПЦР-генодиагностических исследований.

Неуклонно выполняя эти требования и применяя при каждом проведении анализа отрицательные контроли: при проведении пробоподготовки, с буферным раствором, праймерами, можно практически исключить ложно-положительные результаты ПЦР.

В настоящее время хорошо апробированы и применяются в ПЦР-генодиагностике методы ферментативного и химического предупреждения ложно-положительных результатов от контаминации амплификонами.

Суть ферментативного метода заключается в том, что вместо одного из 4-х дезоксинуклеотидтрифосфатов, а именно вместо дезокситимидинтрифосфата (дТТФ), вводится его аналог дезокси-уридинтрифосфат (дУТФ), который, включившись в амплификон вместо дТТФ, делает этот амплификон чувствительным к ферменту урацил-гликозилазе,

которая также вводится в реакционную смесь. И если в пробирку с реакционной смесью были занесены амплификоны (произошла контаминация), содержащие дезокси-уридин-трифосфат, то они будут расщеплены этим ферментом. Некоторые коммерческие ПЦР-тест-системы содержат эти компоненты, и поэтому гарантируют выявление ложноположительных результатов при контаминации реакционной смеси.

В качестве химического способа выявления ложноположительных результатов ПЦР-анализа при контаминации амплификонами используют псорален-соединение, делающее амплификоны легко повреждаемыми ультрафиолетовыми лучами.

7. Альтернативные ПЦР-методы амплификации нуклеиновых кислот

Назовем только те, которые апробированы на клиническом материале и имеют реальные перспективы дальнейшего развития.

1. Лигазная цепная реакция (ЛЦР). Принцип аналогичен ПЦР, но вместо Taq-ДНК-полимеразы и дезоксинуклеотидтрифосфатов используют термостабильную лигазу и 4 специфических олигонуклеотида, которые добавляют в реакционную смесь в избытке. Каждые 2 олигонуклеотида комплементарны к детектируемому специфическому фрагменту цепи ДНК-матрицы и непосредственно примыкают друг к другу, одновременно они комплементарны и другой паре олигонуклеотидов. После денатурации ДНК-матрицы при 95°C олигонуклеотиды связываются специфическими фрагментами цепей ДНК-матрицы и лигируются при + 50°C. Далее эти две стадии цикла повторяются много раз, в результате чего происходит экспоненциальное возрастание соединенных ковалентной связью олигонуклеотидов. Для быстрого количественного обнаружения лигированных олигонуклеотидов применяют 2 метки: биотин на одном конце, а флуоресцеин - на другом конце лигированных олигонуклеотидов, поэтому они связываются антифлуоресцеиновыми антителами на поверхности мембраны или микропланшета. Антибиотиновые антитела, конъюгированные со щелочной фосфатазой, также будут количественно взаимодействовать с образовавшимся фиксированным комплексом и после добавления субстрата давать окрашенный продукт. Нелигированные олигонуклеотиды с флуоресцеиновой меткой будут фиксироваться антифлуоресцеиновыми антителами на поверхности, но они лишены биотина, который содержат другие нелигированные олигонуклеотиды, не фиксирующиеся на поверхности, и поэтому они детектироваться не будут.

2. Каталитическая амплификационная система, или циклическая зондовая технология (ЦЗТ), является противоположной ЛЦР, поскольку принцип состоит не в сшивании двух олигонуклеотидных зондов, а напротив, в расщеплении рибонуклеотидной комплементарной вставки при помощи фермента РНК-азы и получении из одного длинного ДНК-РНК-ДНК-зонда двух коротких ДНК-овых олигонуклеотидов, которые затем детектируются одним универсальным дезоксирибонуклеотидным зондом, конъюгированным с маркерным ферментом. Достоинства метода заключаются в изотермальности реакции, исключении возможности перекрестной контаминации, быстроте проведения (менее 1 часа) и, наконец, в возможности полной автоматизации проведения анализа. Метод разработан канадской фирмой ID Biomedical Corporation (8855 Northbrook Court, Burnaby BC V5J5G1, Canada).

3. Фирма Gen-Trak разработала автоматическую систему для детектирования инфекционных агентов путем амплификации специфического РНК-вого зонда со специфической вторичной структурой (это короткие молекулы РНК, появляющиеся в инфицированных РНК-овыми фагами E.coli). Выделенная специфическая Q-beta-репликаза из T7 фаг-инфицированных E.coli экспоненциально реплицирует такие короткие РНК с разветвленной вторичной структурой очень быстро: 100.000.000 копий менее, чем за 15 секунд.

P.M.Lizardi и F.R.Kramer создали рекомбинантную молекулу РНК, которая в составе MDV-1 РНК содержала 30-нуклеотидную вставку-зонд, комплементарную РНК HIV-I, способную реплицироваться Q-beta-репликазой в количестве, пропорциональном количеству присутствующих копий HIV-1. Показана линейная зависимость между числом копий HIV-1 и временем, необходимым для синтеза 1,6нг РНК.

Практическое занятие №4

Тема: «Принципы организации диагностических лабораторий, использующих метод ПЦР»

Вопросы:

1. Необходимость соблюдения строгих правил при работе в лабораториях, использующих метод ПЦР.
2. Планировка помещений и основные принципы организации работы ПЦР-диагностических лабораторий.
3. Требования, которые необходимо соблюдать при проведении ПЦР-анализа.
4. Использование физических и химических методов борьбы с контаминацией реакционной смеси при проведении ПЦР-анализа.
5. Оценка качества работы ПЦР-диагностической лаборатории.

1. Необходимость соблюдения строгих правил при работе в лабораториях, использующих метод ПЦР.

Принципы организации диагностических лабораторий, использующих метод ПЦР регламентируются «Методическими рекомендациями по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции», утверждёнными Госкомсанэпиднадзором 22 июня 1995г.

Данный документ предназначен для учреждений здравоохранения и санэпиднадзора, использующих метод полимеразной цепной реакции в целях диагностики инфекционных заболеваний.

Благодаря высокой специфичности и чувствительности метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) находит широкое применение в диагностике возбудителей инфекционных заболеваний. Однако ПЦР-диагностика инфекций связана с проблемой, обусловленной высокой чувствительностью метода, - возможностью контаминации.

Попадание в реакционную пробирку следовых количеств «положительной ДНК» (специфических продуктов амплификации ДНК - ампликонов; ДНК-стандарта, используемой в качестве положительного контроля; ДНК клинического образца) приводит к амплификации в процессе

ПЦР специфического фрагмента ДНК и, как следствие, к появлению ложно-положительных результатов.

Сотрудник, занимающийся ПЦР-диагностикой, в своей работе сталкивается с двумя видами контаминации:

1) перекрестная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки клинических образцов или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложно-положительных результатов;

2) контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и является идеальными продуктами для реамплификации.

Контаминация следовыми количествами ампликонов посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхностей лабораторных столов или даже поверхности кожи сотрудников лаборатории приводит к появлению систематических ложно-положительных результатов.

Как правило, определить источник контаминации бывает очень трудно и требуются значительные затраты времени и средств.

Накопленный к настоящему моменту опыт работы лабораторий, использующих полимеразную цепную реакцию для диагностики инфекционных заболеваний (ПЦР-диагностические лаборатории) позволяет сформулировать основные требования к планировке таких лабораторий и проведению самих анализов. Соблюдение этих требований обеспечивает исключение контаминации и получения ложно-положительных результатов.

2. Планировка помещений и основные принципы организации работы ПЦР-диагностических лабораторий.

1). Лаборатория должна быть разделена на зоны (комнаты) для каждой из стадий (операций) ПЦР-диагностики. Следует иметь не менее двух изолированных помещений:

- пре-ПЦР-помещение, в котором проводится сортировка клинических образцов, выделение ДНК из содержащихся в пробах микроорганизмов, приготовление реакционной смеси для ПЦР и постановка ПЦР (при наличии условий два последних этапа рекомендуется также проводить в отдельном помещении); в этих помещениях запрещается проводить все другие виды работ с инфекционными агентами (микробиологический анализ, ИФА, и другие диагностические тесты), ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории;

-пост-ПЦР-помещение, в котором проводится детекция продуктов амплификации; в этом помещении допускается использовать другие методы выявления возбудителей, с которыми работают в данной лаборатории.

2) Помещение, в котором проводится детекция продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение) следует располагать на максимальном удалении от пре-ПЦР-помещений.

3) Следует исключить движение воздушных потоков из помещений, в которых проводится детекция продуктов амплификации, в помещения, где проводят работу с поступившими на анализ пробами и формируют реакционную смесь.

4) В комнате приготовления реакционной смеси и в комнате обработки клинических образцов должны быть установлены настольные боксы с ультрафиолетовыми лампами.

5) Работа в лаборатории должна быть организована в одном направлении: от пре-ПЦР-помещений к пост-ПЦР-помещениям.

6) В каждом помещении ПЦР-диагностической лаборатории должен быть свой набор реагентов, комплект автоматических пипеток, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток, используемых только в данном помещении. Переносить их в другие помещения ПЦР-лаборатории категорически запрещено. Всё оборудование, материалы и инвентарь в каждом помещении должны иметь соответствующую маркировку.

7) Стирка рабочей одежды из разных помещений ПЦР-лаборатории должна производиться отдельно.

8) Перчатки следует использовать однократно как в помещении, где проводится обработка клинических образцов, так и в помещении приготовления реакционной смеси и постановки ПЦР.

9) Необходимо однократно использовать пластиковые микропробирки и наконечники для автоматических пипеток (все расходные материалы). Обязательно менять наконечники при переходе от одной пробы к другой с целью предотвращения перекрестной контаминации в процессе выделения ДНК или при раскапывании реакционной смеси.

10) При обработке клинических образцов, а также при внесении выделенной ДНК в реакционную смесь необходимо использовать наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным фильтром.

11). Каждый сотрудник лаборатории должен иметь персональный набор автоматических пипеток и реагентов.

12) В помещениях, где проводятся работы с поступившими на анализ образцами, и в помещениях, в которых осуществляют регистрацию полученных результатов ПЦР-анализа, должны работать разные сотрудники.

13) Клинические образцы, поступившие на анализ, должны храниться отдельно от реагентов, используемых для проведения ПЦР-анализа (в разных холодильниках).

14) В лаборатории не рекомендуется использовать водяные бани, т.к. заполняющая их вода, просачиваясь в недостаточно плотно закрытые пробирки, может стать источником контаминации; следует использовать суховоздушные термостаты.

15) При исследовании материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I-IV групп патогенности, работа должна проводиться с соблюдением требований "Санитарных правил СП 1.2.011-94 (Безопасность работы с микроорганизмами I-IV групп патогенности)".

16) Необходимо постоянно поддерживать чистоту на рабочем месте:

- каждое помещение должно иметь свой отдельный набор инвентаря для обработки и уборки рабочего места (ватно-марлевые тампоны, пинцет, 70⁰ этанол, дезинфицирующий раствор и т.д.), и источники ультрафиолетового излучения, которые аффективно инактивируют ДНК-матрицы;

- при манипуляциях с клиническим материалом рабочую поверхность до и после работы обрабатывают дезинфицирующий раствором (рекомендованным для возбудителя, с которым проводятся работы), а затем – 70⁰ этанолом;

- в помещении, где осуществляют сборку реакционной смеси, до начала работы следует обрабатывать рабочую поверхность столов 70⁰ этанолом с целью борьбы с пылью.

17). Следует полностью исключить проведение в ПЦР-диагностической лаборатории работ, связанных с получением (клонированием) и выделением рекомбинантных плазмид, содержащих последовательности ДНК или фрагментов генов возбудителей которые диагностируются в данной лаборатории.

18). Персонал, работающий в ПЦР-диагностической лаборатории должен пройти соответствующее обучение.

3. Требования, которые необходимо соблюдать при проведении ПЦР-анализа.

3.1. Обработка клинических образцов.

1) Забор клинических образцов необходимо производить только в одноразовые пластиковые пробирки или в стеклянные пробирки, предварительно обработанные в течение 1 часа хромовой смесью, тщательно промытые дистиллированной водой и прокаленные в сухожаровом шкафу.

2). Работать можно только в одноразовых перчатках.

3). Необходимо использовать одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным фильтром.

4). Обязательно менять наконечники при переходе от одной пробы к другой.

5). Использованные пробирки и наконечники должны сбрасываться в одноразовые контейнеры или в специальную ёмкость с 1Н раствором соляной кислоты.

3.2. Постановка ПЦР.

1) Работать можно только в одноразовых резиновых перчатках

2) Следует готовить смесь реактивов для ПЦР в объёме, рассчитанном на все пробы, включая контрольные, и только затем раскупывать реакционную смесь по пробиркам.

3) Использовать только автоматические пипетки с переменным объемом и одноразовые наконечники.

4) При выполнении отдельной операции работать следует только с одной пробиркой.

5) При проведении ПЦР-анализа следует обязательно ставить отрицательные и положительные контроли в соответствии с рекомендациями инструкций по применению конкретных диагностических наборов.

6) Подготовленные к анализу методом ПЦР исследуемые образцы должны вноситься в реакционные смеси одноразовыми наконечниками с аэрозольным фильтром в последнюю очередь, использованные наконечники следует сбрасывать в ёмкость с 1Н раствором HCl.

3.3. Детекция продуктов амплификации.

1) . Анализ продуктов ПЦР должен производиться в изолированном помещении сотрудником лаборатории, не работающим с клиническими образцами и реактивами, используемыми для приготовления реакционной смеси.

2) . Работать следует только в одноразовых перчатках.

3) Оборудование, реактивы, халаты, перчатки, а также инвентарь, предназначенный для уборки помещения, используемые в комнате, где

осуществляется детекция продуктов ПЦР, должны находиться только в этой комнате и не должны переноситься в другие помещения.

4) Работать разрешается только в сменной одежде, включая обувь.

4. Использование физических и химических методов борьбы с контаминацией реакционной смеси при проведении ПЦР-анализа.

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

2) Использованные наконечники для автоматических пипеток, пробирки и другие загрязненные ДНК материалы необходимо обрабатывать реагентами, вызывающими деградацию ДНК (1Н HCl, 10% раствором гипохлорита натрия или 10% раствором хлорной извести).

5. Оценка качества работы ПЦР-диагностической лаборатории.

1) Для оценки качества работы ПЦР-диагностической лаборатории следует периодически применять зашифрованные контрольные ДНК-положительные и ДНК-отрицательные образцы.

2) Следует периодически проводить оценку чувствительности диагностических наборов, использующих метод ПЦР, с помощью суспензий с разной концентрацией целевых микроорганизмов.

Практическое занятие №5

Тема: «Возбудители протозойных инфекций и их лабораторная диагностика».

Вопросы

1. Возбудители протозойных инфекций.
2. Лабораторная диагностика малярии.

1. Возбудители протозойных инфекций

Малярия- антропонозная протозойная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи. Характеризуется циклическим течением, сменой лихорадочных приступов и межприступных состояний, спленомегалией, анемией.

Введение термина «малярия» приписывают итальянцу Ланцизи (1717г). он связывал малярию с ядовитыми испарениями болот (от исп. Mala aria- дурной, испорченный воздух). В 1880г французский врач Лаверан в Алжире открыл возбудителя малярии человека.

По данным ВОЗ, малярия до настоящего времени остаётся одним из самых распространённых заболеваний на Земном шаре. Примерно 90 стран (из 180) являются эндемичными по малярии. Более 250млн человек ежегодно болеют малярией, из которых 1,5-2,7 млн умирают.

Возбудители малярии – простейшие (*Protozoa*), относящиеся к классу споровиков (*Sporozoa*), семейству *Plasmodiae*, роду *Plasmodium*. У человека паразитируют 4 вида плазмодиев: *Plasmodium vivax*- возбудитель трехдневной малярии, *Plasmodium ovale*- возбудитель малярии овале, *Plasmodium falciparum* - возбудитель тропической малярии, *Plasmodium malariae*- возбудитель четырехдневной малярии.

Развитие возбудителей малярии происходит со сменой хозяев: половой цикл (спорогония) совершается в организме комара, бесполой (шизогония) –

в организме человека. Комары рода *Anopheles* (опасный, вредный) заражаются от больного малярией человека или паразитоносителя при кровососании. С кровью в желудок насекомого попадают половые формы плазмодиев-мужские и женские **гаметоциты**. В теле комара происходит их оплодотворение с последующим делением, которое ведёт к образованию **спorozоитов** (спорогония), способных заразить человека. Такой комар становится заразным для человека в течение 1-1,5 месяцев.

В организм человека **спorozоиты** попадают при укусе инфицированного комара со слюной и быстро проникают в кровь. В результате многократного деления из одного **спorozоита** в печени образуются десятки тысяч тканевых **мерозоитов**.

Диагностика: микроскопия мазков крови больного, окрашенных по методу Романовского - Гимза. Серодиагностика - реакция иммунофлюоресценции, пассивной гемагглютинации, ИФА.

Токсоплазмы

Возбудителем токсоплазмоза является единственный вид - *Toxoplasma gondii*. Токсоплазмоз - хроническая, протозойная инфекция, проявляющаяся поражением нервной системы, печени, селезенки, скелетных мышц и миокарда.

Toxoplasma gondii- внутриклеточный паразит длиной 4-7 мкм, напоминает дольку апельсина или вытянутую луковицу (от греч. *toxos*- лук+*plasma*-имеющий форму). Заражение человека происходит алиментарным путем при проникновении **ооцист** или тканевых **цист** (при употреблении сырых или плохо проваренных мясных продуктов, немытых овощей и фруктов) или трансплацентарно. Заболевание распространено повсеместно, инфицированность населения разных стран составляет 4- 68%.

Первичные и основные хозяева —домашние кошки и другие представители семейства кошачьих. Промежуточные хозяева - человек, многие дикие и домашние животные, птицы.

Жизненный цикл состоит из стадий полового и бесполого размножения.

Половым путём токсоплазмы размножаются в организме кошачьих; бесполом путём-как в основных, так и в промежуточных хозяевах. В организме любого теплокровного животного токсоплазмы могут достигать стадии тканевых **псевдоцист**, в которых бесполом путём образуются **цистозоиты**. Первичное заражение кошек происходит при поедании мяса промежуточных хозяев (мышей). Паразиты проникают в клетки кишечника и превращаются в **трофозоиты**, размножающиеся бесполом путём. В клетках слизистой оболочки кишечника происходит половое размножение паразита. Размножившиеся **цистозоиты** разрушают эпителиальные клетки и проникают в подлежащие слои кишечной стенки, где и трансформируются в **гаметоциты**. После слияния разнополых гаметоцитов образуется **зигота-ооциста**. Из организма основных хозяев ооцисты выделяются с испражнениями. Они хорошо сохраняются в почве, при их заглатывании происходит заражение промежуточных хозяев. Из **ооцист** выходят **спорозоиты**, активно поглощаемые макрофагами, но фагоцитоз носит незавершённый характер, благодаря чему **спорозоиты** диссеминируют по лимфотоку. В цитоплазме макрофагов начинается первый этап **шизогонии** (размножение). На более поздних этапах шизогонии макрофаги погибают, и высвободившиеся паразиты (**тахизоиты**) инвазируют клетки организма.

Диагностика: исследуют кровь, спинно-мозговую жидкость, пунктаты лимфатических узлов, остатки плодных оболочек.

Возможно выделение токсоплазм из биоптатов и биологических жидкостей заражением 7-8 суточных куриных эмбрионов или клеток HeLa.

Наибольшую ценность имеет выделение токсоплазм от животных, заражённых клиническим материалом. Для этого мышам, хомякам или кроликам внутрибрюшинно или интрацеребрально вводят кровь лиц, подозрительных на наличие токсоплазм. После внутрибрюшинного заражения образуется экссудат, содержащий большое количество паразитов.

2. Лабораторная диагностика малярии

Обнаружение малярийных паразитов в крови больного имеет исключительно важное значение в диагностике и терапии малярии, является неотъемлемой частью проведения эпидемиологических обследований для установления интенсивности распространения малярии и выявления паразитоносителей, а также для организации и проведения комплекса противомалярийных мероприятий.

Лабораторное исследование крови на малярию производится на предметном стекле методами мазка и толстой капли.

Для изготовления мазка или толстой капли требуется незначительное количество крови, которая получается с помощью любых колющережущих инструментов (иглы, оспопрививательные перья, скальпели). Более усовершенствованным инструментом для кровопускания является игла-Франка, в которой вращательным движением гильзы заранее регулируется длина лезвия, которым делается укол. Перед употреблением инструменты для взятия крови протираются ватой, смоченной спиртом, или обжигаются в пламени спиртовой горелки.

До начала работы на лабораторном столике должно быть все подготовлено для взятия крови и изготовления препарата: 1) стаканчик с кусочками стерильной ваты; 2) пинцет; 3) чистые предметные стекла, обезжиренные спиртом и эфиром. Перед взятием крови стекла протирают чистой тряпочкой или марлей; 4) шлифованное, предметное стекло с отточенными углами или покровные стекла для производства мазков крови; 5) флакончики со спиртом, эфиром и бензином; 6) игла Франка или другой инструмент; 7) капельница с готовой краской Романовского; 8) чашка с мостиком для окраски препарата; 9) промывалка с дистиллированной водой; 10) двойная чашка Петри (для готовых мазков или капель); 11) карандаш по стеклу; 12) журнал для регистрации.

Техника приготовления мазка и толстой капли.

Кровь для исследования берут из мякоти четвертого пальца левой руки или из мочки уха. У маленьких детей кровь берут из толстого пальчика ножки. Место укола очищают ватным тампончиком, смоченным в спирте или эфире, и после того как спирт или эфир испарится, мягкие ткани с обеих сторон намеченного укола сдавливают между большим и указательным пальцами и нажимом на боковой рычажок взведенной иглы Франка производят укол. Укол считается правильным, если после снятия иглы и при легком сдавливании мякоти появляется кровь. Первую выступившую каплю

крови вытирают сухой чистой ватой и выдавливают последующие капли, которые берут для приготовления мазка.

Правильный мазок получается на обезжиренных и хорошо промытых стеклах без следов кислот и щелочей. Выдавлив из мякоти каплю крови, помещают ее, прикладывая к поверхности предметного стекла по средней линии, ближе к одному концу; затем поворачивают предметное стекло каплей крови кверху, касаются узким краем шлифованного или покровного стекла, которое предварительно устанавливают на середине предметного стекла перед каплей под углом 45° . Если стекло хорошо обезжирено, то капля крови быстро растекается между двумя стеклами. Затем не слишком быстрым движением вперед и влево делается мазок. Правильно сделанный мазок равномерно покрывает предметное стекло без просветов. На высушенном мазке, простым карандашом, или иглой записывают порядковый номер, фамилию и дату забора. Затем мазок фиксируют одним из фиксаторов; этиловым $95\text{—}98^\circ$ спиртом (10—15 минут), метиловым (2—3 минуты), ацетоном (5 минут), смесью равных частей абсолютного спирта и эфира (10—15 минут). Фиксатор хранят в банке с притертой пробкой, куда погружают предметные стекла в вертикальном положении. После фиксации стекла вынимают из банки с помощью пинцета.

Если же фиксация на месте забора крови не производится, стекла складывают десятками с бумажными перекладками между ними и заворачиваются в бумагу. На завернутой бумаге указывают номера стекол и дату забора.

Приготовление толстой капли. Предметным стеклом прикасаются к выступившей из мякоти капле крови. Чистым углом другого стекла или другим инструментом осторожно размазывают каплю крови в виде кружка диаметром примерно в 1 см.

При массовом обследовании иногда практикуют по несколько капель на одном предметном стекле.

Окраска мазков. Окраску препарата крови производят после просушки и фиксации краской Романовского. Она разводится из расчета 1—2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды. Краску наливают на 25—30 минут на мазок, положенный на мостик.

После окончания окраски мазка раствор Романовского смывают сильной струей дистиллированной воды, затем препарат ставят на подставку в вертикальном положении для просушки.

Толстую каплю можно красить через 2—3 часа после взятия крови. Для окраски на каплю крови, после того как она подсохла, наливают обычный раствор краски. Через некоторое время, когда происходит гемолиз

эритроцитов, краску сливают и заливают свежей. Продолжительность окраски 45—50 минут.

По окончании окраски каплю осторожно ополаскивают дистиллированной водой и ставят для просушки.

Окраску и смывание толстой капли следует проводить с большой осторожностью, чтобы капля не смылась со стекла.

При окраске краской Романовского ядра паразитов окрашиваются в вишнево-красный цвет, протоплазма — в темно-голубой.

Виды малярийных паразитов. В настоящее время известны четыре вида рода плазмодиум, вызывающих заболевание человека малярией. Каждый вид малярийного возбудителя вызывает особую форму малярии: *Plasmodium vivax* — трехдневную, *Plasmodium malariae* — четырехдневную, *Plasmodium falciparum* — тропическую и *Plasmodium ovale* — малярию типа трехдневной.

Описание отдельных видов малярийных паразитов. Развитие *Plasmodium vivax* в эритроцитах от мерозонта до полного созревания морулы продолжается 48 часов. Мерозонты представляют собой образования круглой или овальной формы, величиной 1—2 мкм, состоящие из ядра и комочка протоплазмы. Молодые кольцевидные шизонты по величине соответствуют 1/3—1/4 диаметра эритроцита. Амебовидные шизонты имеют неправильную форму с изрезанными контурами благодаря хорошо развитым псевдоподиям. По мере роста паразита шизонты занимают все большую часть эритроцита. Взрослые амебовидные шизонты заполняют пораженный эритроцит почти полностью. В амебовидных шизонтах видны зернышки темно-бурого пигмента, число которых увеличивается по мере роста паразита. На ранних стадиях развития амебовидных шизонтов зерна пигмента разбросаны по плазме паразита, а по мере их роста пигмент собирается в рыхлые кучки. Шизонты перед делением бывают несколько крупнее нормального эритроцита и имеют круглую или овальную форму с правильными, ровными контурами, без псевдоподий и без вакуолей с большим количеством пигмента. Зрелая морула *Plasmodium vivax* состоит из 12—18 мерозонтов, расположенных беспорядочно вокруг одной компактной кучки пигмента.

Половые формы (гамонты) *Plasmodium vivax* имеют круглую или слегка овальную форму, одно ядро, без вакуоли и без псевдоподии.

По мере роста гамонты увеличиваются и почти полностью заполняют пораженный эритроцит, который к этому периоду и сам увеличивается. Диаметр зрелого гамонта *Plasmodium vivax* может превосходить диаметр нормального эритроцита. Зерна пигмента в гамонтах более грубые, чем в

шизонтах и распределены всегда более или менее равномерно по плазме паразита.

По мере развития паразитов, эритроциты, в которых они находятся, изменяются: увеличиваются в размерах, часть из них деформируется, обесцвечивается, появляется обильная мелкая зернистость, которая при окраске по Романовскому окрашивается в красновато-фиолетовый цвет (зернистость Шюфнера).

Развитие *Plasmodium malariae* В эритроцитах продолжается 72 часа. Как и при трёхдневной малярии, все стадии развития паразита можно обнаружить в обычных препаратах крови.

Кольцевидные шизонты паразита занимают примерно 1/3 диаметра эритроцита и очень сходны с кольцевидными шизонтами паразита трёхдневной малярии. Молодые шизонты *Plasmodium malariae* имеют амёбовидную форму с небольшой вакуолью и слабо выраженными широкими псевдоподиями. Часть шизонтов *Plasmodium malariae* имеет лентовидную форму, в виде полосок, лежащих поперёк эритроцита. Ширина полоски зависит от возраста паразита. Молодые лентовидные шизонты вытянуты поперёк эритроцита в виде узкой ленты; взрослые занимают почти весь эритроцит и принимают форму квадрата с двумя противоположными, слегка закруглёнными краями. Ядро в лентовидных шизонтах вытянуто по длине и расположено у края ленты. Вакуолей в таких шизонтах не бывает. Когда шизонты вырастают и занимают почти весь эритроцит, у них начинает делиться ядро. В делящемся шизонте образуется 6—12, чаще всего — 8 ядер. Мерозоиты в виде правильной розетки расположены вокруг пучка пигмента. Гамонты *Plasmodium malariae* несколько меньше *Plasmodium vivax*.

Эритроциты, пораженные *Plasmodium malariae*, не изменяются, не увеличиваются и окрашиваются, как нормальные, не пораженные эритроциты.

Возбудитель тропической малярии *Plasmodium falciparum* отличается от *Plasmodium vivax* и *Plasmodium malariae* тем, что в периферической крови встречаются только кольца — молодые стадии паразита и гамонты; стадии шизогонии при исследовании периферической крови не встречаются.

Молодые кольца *Plasmodium falciparum* очень мелкие. Диаметр их равен 1/5—1/6 диаметра эритроцита.

Морула *Plasmodium falciparum* состоит из 12—24 мерозоитов, расположенных беспорядочно вокруг кучки пигмента.

Гамонты *Plasmodium falciparum*, имеющие характерную полулунную форму, попадают в периферическую кровь через 7—10 дней после первого приступа. При рецидивах гамонты могут быть обнаружены в крови с первого дня заболевания.

Эритроциты, как и при *Plasmodium malariae*, не увеличиваются и окрашиваются, как нормальные эритроциты.